



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



UNIDAD ACADÉMICA DE
DESARROLLO
BIOTECNOLÓGICO



INSTITUTO DE HIGIENE
Prof. Arnoldo Berta
FACULTAD DE MEDICINA

Evaluación de la respuesta inmune inducida por la vacuna trivalente inactivada estacional contra Influenza adyuvada con ISCOM- matrices en un modelo de ratón envejecido

Br. Florencia García

florenciagarcia@higiene.edu.uy

Tesis de grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Tutor: Dr. Fernando Silveira

*Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de
Medicina, Udelar. Montevideo, Uruguay, 2025*

Tabla de contenido

Resumen	4
Abreviaturas	5
1 Introducción	7
1.1 <i>Influenza estacional: virología, epidemiología e impacto global</i>	<i>7</i>
1.2 <i>Utilización de vacunas como estrategia principal para la prevención de la gripe</i>	<i>9</i>
1.3 <i>Estrategias para mejorar la eficacia de las vacunas: utilización de adyuvantes</i>	<i>11</i>
1.4 <i>Adyuvantes basados en saponinas: inmunogenicidad, seguridad y formulación.....</i>	<i>11</i>
2 Objetivo general	16
3 Objetivos específicos.....	16
4 Materiales y Métodos	17
4.1 <i>Inmunización, Obtención de muestras y Desafío</i>	<i>17</i>
4.1.1 <i>Ratones hembras C57BL/6</i>	<i>17</i>
4.1.2 <i>Ratones hembras BALB/c</i>	<i>17</i>
4.2 <i>Evaluación de la Respuesta Humoral</i>	<i>19</i>

4.3	<i>Puesta a punto de la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación y determinación del título hemaglutinante en sueros de ratones</i>	20
4.4	<i>Dosis Infectante del 50 % de los Cultivos de Tejidos (Tissue Culture Infectious Dose 50)</i>	21
5	Resultados y Discusión	23
5.1	<i>La administración subcutánea de TIV-IMXQB indujo un aumento significativo en los títulos de anticuerpos y de inhibición de la hemaglutinación en las cepas BALB/c y C57BL/6</i>	23
5.2	<i>La administración subcutánea de TIV-IMXQB confirió protección efectiva disminuyendo la replicación viral en pulmón de ratón para la cepa BALB/C...</i>	28
5.3	<i>La vacunación subcutánea con TIV-IMXQB confirió protección frente al desafío letal por el virus A/Uruguay/897/2018 (H1N1) pdm09 en ratones C57BL/6.....</i>	31
6	Conclusión	33
7	Referencias Bibliográficas	34

Resumen

Las vacunas constituyen la herramienta más eficaz en salud pública para prevenir las enfermedades infecciosas. Mejorar la eficacia de las vacunas contra virus respiratorios es especialmente crucial en adultos mayores, ya que son más susceptibles a infecciones graves debido a condiciones de salud subyacentes y al envejecimiento de su sistema inmunológico. La adición de adyuvantes basados en saponinas es un enfoque prometedor para aumentar la efectividad de las vacunas. En este estudio evaluamos el uso de ISCOM-matrices, un complejo inmunoestimulante autoensamblado que combina saponinas de *Quillaja brasiliensis* con colesterol y fosfatidilcolina (IMXQB), como adyuvante para la vacuna trivalente estacional contra la Influenza (TIV) en un modelo de ratón envejecido.

Ratones hembras envejecidas BALB/c y C57BL/6 se dividieron en 3 grupos y fueron inmunizados dos veces (días 0 y 14) por vía subcutánea con TIV adyuvada con IMXQB (TIV-IMXQB), TIV sola o solución salina. Se recolectaron muestras de sangre en los días 14 y 28 previo a la inoculación. Un mes después de la primera vacunación, todos los animales fueron desafiados con el virus A/Uruguay/897/2018 (H1N1 de tipo pdm09). Los ratones fueron monitoreados diariamente durante 14 días después de la infección, evaluando pérdida de peso y otros signos clínicos de enfermedad inducida por el virus. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA unidireccional y la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples frente al grupo control.

La vacuna adyuvada promovió títulos más altos de IgM, IgG (e isotipos) y de inhibición de la hemaglutinación (IHA), menor carga viral en pulmones y una mejor tasa de supervivencia después del desafío letal con el virus H1N1 de tipo pdm09 en comparación con la vacuna comercial en el modelo de ratón envejecido. En general, TIV-IMXQB mejoró la inmunogenicidad en comparación con TIV al potenciar la inmunidad sistémica en ratones envejecidos, lo que resultó en una recuperación más rápida después del desafío viral. De este modo, proponemos que los ISCOM-matrices basados en saponinas de *Q. brasiliensis* representan una plataforma prometedora para vacunas virales de próxima generación.

Abreviaturas

ANOVA: Análisis de varianza

BALB/c: Cepa de ratón de laboratorio

C57BL/6: Cepa de ratón de laboratorio

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, EE.UU.

CPE: Efecto citopático

cGAMP: Cyclic GMP-AMP

CpG: Oligodesoxinucleótidos que contienen secuencias citosina-guanina

DMO: Dimetilsulfóxido

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

FRS: Fracción Rica en Saponinas

HA: Hemaglutinina

IHA: Inhibición de la hemaglutinación

HRP: Peroxidasa de rábano picante

IgG/IgM: Inmunoglobulinas G y M

IMXQB: ISCOM-matrices basados en saponinas de *Quillaja brasiliensis*

ISCOMs: Complejos inmunoestimulantes

MDCK: Células renales caninas Madin-Darby

NA: Neuraminidasa

NPs: Nanopartículas

O.N.: Overnight

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

RDE: Enzima destructora de receptores

SBA: Adyuvantes basados en saponinas

SF: Solución salina

TCID₅₀: Dosis infectante de cultivos tisulares al 50 %

Th1/Th2: Subpoblaciones de linfocitos T colaboradores (T helper 1 y 2)

TIV: Vacuna trivalente inactivada contra influenza

TMB: *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TPCK: Tosylamide Phenylethyl Chloromethyl Ketone

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1 Introducción

1.1 *Influenza estacional: virología, epidemiología e impacto global*

La gripe estacional es una infección aguda que afecta principalmente las vías respiratorias, pudiendo ocasionar hospitalizaciones que algunas veces desencadenan la muerte. Existen cuatro tipos de virus de la influenza: A, B, C y D, sin embargo, solo los tipos A y B pueden causar epidemias estacionales en humanos. La influenza A también puede provocar pandemias globales mediante cambios genéticos en contextos de zoonosis, donde virus de influenza A que circulan en animales saltan de reservorio infectando y propagándose en humanos (por ejemplo, las pandemias de influenza de 1918 y 2009). El virus de la influenza B no tiene un reservorio animal natural identificado por lo que se considera que afecta exclusivamente humanos, y tiende a causar una enfermedad menos grave que la influenza A, además de brotes más limitados. Los virus de la influenza A se clasifican además en subtipos según las glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Actualmente, los subtipos A(H1N1) y A(H3N2) son los que circulan en poblaciones humanas. Los virus de la influenza B, por su parte, pueden subdividirse en linajes, perteneciendo a los linajes B/Yamagata o B/Victoria [1]. Para estos virus, las proteínas más estudiadas y relevantes por su patogenicidad son la HA (hemaglutinina) y la NA (neuraminidasa), esenciales para la capacidad infectiva del virus en las células hospederas. La HA media la unión a los receptores de ácido siálico en las células huésped y la posterior fusión entre el virus y las membranas del huésped, mientras que el NA es responsable de la liberación de la progenie del virus [2].

Se estima que las epidemias anuales de gripe estacional causan de 3 a 5 millones de casos graves y 290. 000 a 650. 000 muertes[3] . En Estados Unidos, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estiman que, entre 2010 y 2023, la influenza causó anualmente entre 9,3 y 41 millones de casos de enfermedad, de 100.000 a 710.000 hospitalizaciones, y entre 4.900 y 51.000 muertes [4]. Estos datos reflejan el significativo impacto epidemiológico de esta enfermedad a nivel poblacional.

En el contexto europeo, diversos estudios sobre la carga de enfermedades transmisibles han demostrado que, antes de la aparición de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), la influenza se posicionaba como la enfermedad infecciosa con mayor impacto en términos de morbilidad y mortalidad, afectando predominantemente a la población de adultos mayores. Este grupo etario presenta particular vulnerabilidad debido a la mayor frecuencia de comorbilidades y al deterioro progresivo del sistema inmunológico asociado al envejecimiento. El virus de la influenza no solo produce efectos agudos durante el periodo de infección, sino que también parece aumentar el riesgo de desarrollar complicaciones posteriores. Entre estas destacan los eventos vasculares agudos, como infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares, así como enfermedades invasivas causadas por bacterias oportunistas, particularmente *Streptococcus pneumoniae*. Estas complicaciones secundarias contribuyen sustancialmente a incrementar la carga global de la enfermedad, generando mayores requerimientos de atención médica y hospitalizaciones prolongadas, con el consiguiente impacto en los sistemas de salud [1].

1.2 Utilización de vacunas como estrategia principal para la prevención de la gripe

La manera más eficaz y de menor costo para prevenir la gripe consiste en la vacunación anual [5]. De este modo, se puede prevenir o minimizar la infección siendo principalmente importante en la población más vulnerable a la enfermedad como son las embarazadas, niños menores de 5 años, los ancianos, los pacientes con enfermedades crónicas o inmunodeprimidos.

Las vacunas disponibles contra la gripe estacional iniciaron su desarrollo en la década de 1940 y hoy presentan variaciones en su composición. Hasta ahora se han aprobado distintas formulaciones vacunales, entre ellas vacunas de virus inactivados, de subunidades, recombinantes de subunidad inactivadas y atenuadas.

La vacuna de subunidad inactivada trivalente (TIV) es la más utilizada para inmunizar a la población. Está compuesta principalmente por las proteínas HA y NA purificadas provenientes de dos subtipos de virus A y un linaje de virus B. Los subtipos y el linaje elegidos para la formulación vacunal son los más representativos de los circulantes para cada estación. Sin embargo, estas vacunas confieren protección limitada principalmente debido a que: los subtipos circulantes pueden no ser los mismos que los que se utilizaron para formular la vacuna, la respuesta de anticuerpos no perdure en el tiempo ó que ocurran cambios antigénicos de HA y NA [6]. Así mismo, la inmunización es menos eficaz en las personas mayores de 65 años debido a la inmunosenescencia. El deterioro de la función inmunológica y el aumento de comorbilidades asociadas a la edad

hacen que los adultos mayores tengan mayor probabilidad de ser hospitalizados o morir por influenza en comparación con grupos de menor edad. La inmunosenescencia es un proceso fisiológico natural que genera cambios en el sistema inmunitario a causa del envejecimiento. Estos cambios predisponen a padecer enfermedades infecciosas, cáncer, autoinmunidad y respuestas inmunológicas disminuidas tras la administración de vacunas [7]. Esto hace que individuos mayores muestren una respuesta menos efectiva a la vacuna en comparación con la población adulta [8].

Los niños también son identificados como grupo de alto riesgo para influenza, siendo los menores los especialmente vulnerables a desarrollar la enfermedad, con mayores tasas de hospitalización y complicaciones. Los niños con influenza además contribuyen a la carga de enfermedad en todos los grupos etarios debido a su prolongada excreción viral y alta capacidad de contagio (diseminación del virus) [9].

Además de los adultos mayores y niños pequeños, otros grupos con mayor riesgo de complicaciones por influenza incluyen: mujeres embarazadas, personas con condiciones médicas crónicas, individuos con condiciones o tratamientos inmunosupresores (como virus de inmunodeficiencia humana (VIH), quimioterapia, uso de esteroides o malignidades), y trabajadores de la salud y cuidadores [1].

1.3 *Estrategias para mejorar la eficacia de las vacunas: utilización de adyuvantes*

Con objeto de mejorar la respuesta a la vacuna antigripal en individuos mayores se han propuesto diversas estrategias, tales como: aumentar la cantidad del antígeno en la formulación, la producción de vacunas tetravalentes (que presentan dos subtipos del virus tipo A y dos variantes de los linajes B [10]) el uso de adyuvantes (por su efecto inmunoestimulador) [8], vías de administración alternativas ó el uso de vacunas atenuadas en lugar de inactivadas [11,12].

Las vacunas formuladas con adyuvantes, mejoran la magnitud, persistencia y amplitud de la respuesta inmunitaria debido a que promueven la estimulación de la respuesta inmune ya sea tanto humoral como celular.

Los principales adyuvantes utilizados en las vacunas contra la gripe han sido las sales de aluminio y los adyuvantes oleosos (MF59 y ASO3), para los cuales su mecanismo de acción está parcialmente dilucidado. Se ha reportado que las sales de aluminio generan una respuesta humoral robusta asociada a un perfil Th2 (del inglés, *T helper 2*). Por otro lado, MF59 y ASO3 son más efectivos en generar una respuesta combinada a un perfil Th1 (*T helper 1*) y Th2 (*T helper 2*). Sin embargo, todos tienen la desventaja de generar una respuesta celular de corto plazo [6].

1.4 *Adyuvantes basados en saponinas: inmunogenicidad, seguridad y formulación*

Las saponinas emergen como una alternativa prometedora a los adyuvantes clásicos en la formulación de vacunas, especialmente para potenciar antígenos proteicos de baja inmunogenicidad. El término «saponina» tiene su origen en la palabra latina *sapo* ('jabón'), en referencia a la propiedad espumante que generan las hojas y cortezas de ciertas plantas al mezclarse con agua. Estos compuestos

representan uno de los grupos más abundantes y variados de metabolitos secundarios en el reino vegetal, donde cumplen una función defensiva como barrera química contra patógenos, parásitos y herbívoros. Su presencia es particularmente notable en tejidos vegetales expuestos a amenazas microbianas o al ataque de insectos [13].

Desde hace décadas, una mezcla parcialmente purificada de saponinas extraídas de la corteza del árbol de *Quillaja saponaria*, llamada Quil A® es el más utilizado en vacunas veterinarias [14]. Sin embargo, el uso de Quil A® en vacunas humanas se ha restringido debido a efectos secundarios no deseados como reacciones locales, actividad hemolítica y eventos ocasionales de toxicidad sistémica [13]. Estos adyuvantes tienen la habilidad de desencadenar respuestas mixtas Th1/Th2, caracterizadas por una respuesta inflamatoria leve en el sitio de inoculación que se resuelve a los pocos días. Además, desencadenan la producción de anticuerpos de tipo IgG2a, IgG2b e IgG1 por los linfocitos B de ratón, así como también, la generación de células T citotóxicas necesarias para combatir patógenos intracelulares como los virus[14,15].

Como alternativa a estas saponinas de *Q. saponaria*, nuestro grupo de investigación ha reportado que fracciones ricas en saponinas, extraídas de las hojas del árbol de *Quillaja brasiliensis* (FRS), poseen potencial adyuvante en niveles comparables a los de Quil A® y además son menos tóxicas. Más aún, tanto FRS como Quil A, demostraron tener patrones similares de inducción de anticuerpos (IgG y subclases) y la estimulación de la inmunidad celular mediante la generación de respuestas polarizada de tipo mixto Th1/Th2 con activación de

células T citotóxicas [16–18]. En este sentido, desde hace más de una década este equipo de investigación trabaja evaluando la toxicidad que caracteriza a las FRS, así como también la respuesta inmune que desencadenan. Aunque prometedoras, las saponinas enfrentan importantes desafíos que incluyen bajos rendimientos de extracción, procesos de purificación complejos, disponibilidad natural restringida, toxicidad dependiente de la dosis e inestabilidad molecular. Una solución innovadora para superar estas limitaciones implica la formulación de complejos nanoparticulados, como ISCOMs (complejos inmunoestimulantes) o liposomas, mediante la combinación de saponinas con esteroides (colesterol) y fosfolípidos. Esta estrategia de encapsulación previene la interacción directa entre las saponinas y el colesterol de las membranas celulares, inhibiendo así la formación de poros no selectivos y consecuentemente reduciendo su toxicidad [19,20].

Los adyuvantes basados en saponina (SBA del inglés, Saponin-based adjuvants) de *Quillaja saponaria* como los ISCOMs y los liposomas surgen como una alternativa a los adyuvantes tradicionales. Actualmente se utilizan en varias vacunas autorizadas por su seguridad y la estimulación de respuestas inmunes sesgadas a Th1 con la activación de células T CD8+, eficaces para combatir patógenos intracelulares. Recientemente, Novavax, Inc. desarrolló la vacuna NVX-CoV2373 contra COVID-19, que utiliza la proteína “spike” recombinante de SARS-CoV-2, adyuvada con complejos inmunoestimulantes denominados Matrix-M™. Esta vacuna es segura, proporciona protección duradera y es menos reactogénica que las vacunas de ARNm [21]. Asimismo, las vacunas contra la malaria Mosquirix™ [22,23] y el virus de la varicela zóster Shingrix® [24] desarrolladas por Glaxo Smith Kline (GSK) están formuladas con el adyuvante AS01. Este sistema adyuvante en

liposoma incluye en su formulación saponinas y han demostrado un perfil de seguridad adecuado [25]. En particular, Shingrix® cuenta con aprobación internacional para adultos mayores de 65 años, demostrando una protección sostenida durante años. Su uso está especialmente indicado en pacientes mayores de 70 años, grupo donde muestra particular efectividad [24,25].

Nuestro equipo de investigación ha reportado que la toxicidad inherente a las FRS de *Q. brasiliensis* se ha reducido e incluso eliminado al formular los ISCOMs o ISCOM-matrices que mejoran además la performance del adyuvante [20]. Los ISCOMs basados en saponinas de *Q. brasiliensis* son nanopartículas (NPs) tipo caja de 40-60 nm de diámetro constituidos por saponinas, esteroides (colesterol y fosfatidilcolina) y antígenos que se evidencian mediante microscopía electrónica (MET)[20,26].

Por otro lado, éstas NPs también pueden formularse sin el antígeno, siendo denominadas ISCOM-matrices (IMXQB) [27,28] (**Figura 1**). Los IMXQB presentan las mismas características que los ISCOMs en cuanto a tamaño, estabilidad y capacidad inmunogénica. Sin embargo, los IMXQB se agregan inmediatamente antes de la vacunación y de esa forma tenemos la formulación vacunal adyuvada [19,26,28,29].

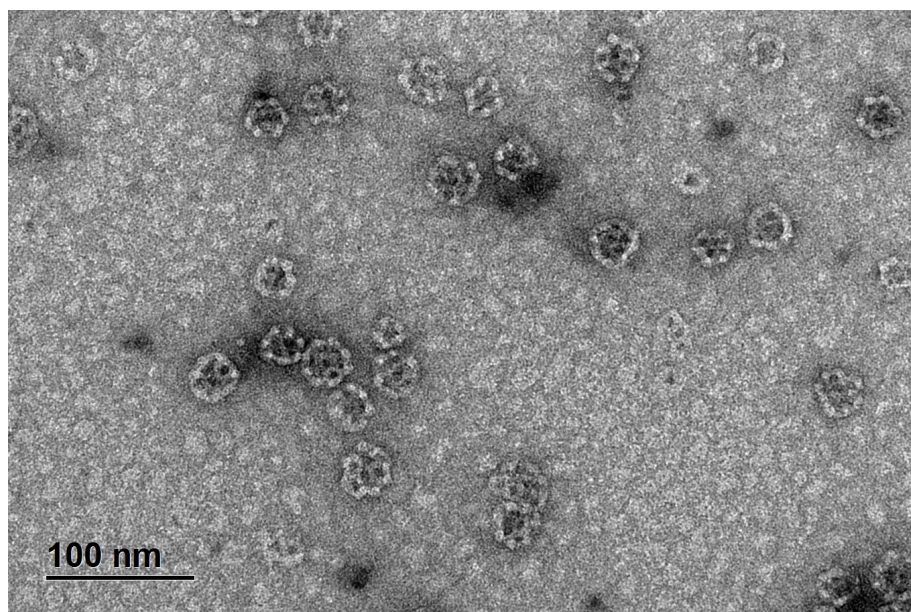


Figura 1. ISCOM-matrices derivadas de *Quillaja brasiliensis* (IMXQB). La formulación de las ISCOM-matrices resultan de la combinación de la fracción rica en saponinas con colesterol y fosfolípidos, lo que da lugar a nanopartículas, como se visualiza mediante esta microscopía electrónica de transmisión [28]. Se siembra la muestra de ISCOM-matrices sobre rejillas de carbono formvar (malla 300), se tiñen negativamente con acetato de uranilo al 2 % y se examinan con un TEM JEM-2100 operado a un voltaje de aceleración de 200 kV. Imagen: Álvaro D. Olivera del Laboratorio de Alta Resolución, Depto. Desarrollo Tecnológico, Centro Universitario Regional Este, Universidad de la República (CURE, Udelar).

Esta característica los ha posicionado como una alternativa a los adyuvantes convencionales para el desarrollo de nuevas vacunas [21,31] .

En este estudio nos planteamos evaluar la eficacia de la vacuna trivalente contra influenza adyuvada con nanopartículas IMXQB en ratones envejecidos de las cepas BALB/c y C57BL/6. Se valorarán especialmente los anticuerpos IgG e isotipos, la capacidad de estos anticuerpos de promover inhibición de la hemaglutinación (IHA) [32] y se determinará la Dosis infectante del 50 % de los cultivos de tejidos (TCID₅₀) del sobrenadante de pulmón de los ratones desafiados con una cepa A/Uruguay/ 897/2018(H1N1) de tipo pdm

09.

2 **Objetivo general**

Determinar la eficacia de la vacuna estacional trivalente inactivada contra influenza adyuvada con IMXQB en la inducción de inmunidad humoral y protección frente al desafío en ratones envejecidos.

3 **Objetivos específicos**

1. Evaluar la respuesta inmune adaptativa inducida por la inmunización subcutánea en ratones BALB/c y C57BL/6 con tres formulaciones diferentes: vacuna trivalente comercial (TIV), TIV adyuvada con ISCOM-matrices (TIV-IMXQB) y solución salina (SF), mediante el análisis de anticuerpos, utilizando el ensayo de ELISA.
2. Optimizar la técnica de Inhibición de la hemaglutinación (IHA) y determinar el título de IHA obtenido para los grupos de ratones del experimento en las cepas BALB/c y C57BL/6.
3. Evaluar el título viral de muestras de sobrenadantes de pulmón de la cepa BALB/C, luego de la infección con el virus A/Uruguay/ 897/2018 (H1N1) pdm09.
4. Analizar la eficacia de las formulaciones vacunales mediante el desafío de los animales de la cepa C57BL/6 con el virus A/Uruguay/ 897/2018 (H1N1) de tipo pdm09 evaluando la sobrevida y el peso retenido.

4 Materiales y Métodos

4.1 *Inmunización, Obtención de muestras y Desafío*

4.1.1 *Ratones hembras C57BL/6*

Ratones hembras C57BL/6 de 15 meses de edad recibieron dos inmunizaciones (días 0 y 14) en este estudio (**Figura 2**). Se conformaron tres grupos denominados según la formulación vacunal a utilizar: Salino (n=10), TIV (n=8) y TIV-IMXQB (n=8). Las tres formulaciones se inocularon de forma subcutánea en la región interescapular. Se inocularon 100 µL de los siguientes preparados TIV (7,5 µg/dosis de HA total), TIV-IMXQB (7,5 µg/dosis de HA total más 5.0 µg/dosis de IMXQB) y Salino (**Tabla 1**). Las sangrías de la cepa C57BL/6 para la obtención de suero, se realizaron los días 14 y 28 luego de la primera inmunización (**Figura 2**).

Treinta y dos días después de la primera inmunización, todos los animales de la cepa C57BL/6 fueron anestesiados con Ketamina-Xilazina e infectados vía intranasal con 1×10^6 TCID₅₀ virus A/Uruguay/897/2018 (H1N1) de tipo pdm09 en 50 µL de solución salina. Se observaron durante 14 días después de la infección y se monitorizaron diariamente para detectar pérdida de peso y otros signos clínicos (pelaje erizado y letargo). Los animales fueron sacrificados si la pérdida de peso superaba el 20 % del peso corporal inicial.

4.1.2 *Ratones hembras BALB/c*

Ratones hembras BALB/c de 12 meses de edad fueron inmunizados en un estudio anterior [33] siguiendo el mismo esquema que la cepa C57BL/6, se colectaron los

sueros a los días 14 y 28 luego del priming y luego del desafío viral se colectaron los pulmones. Los sueros se congelaron a -20 C y los pulmones a -80 C hasta su utilización en este estudio. Brevemente, luego del desafío viral con 1×10^6 TCID₅₀ virus A/Uruguay/897/2018 (H1N1) de tipo pdm09, se extrajeron los pulmones al día 5, se congelaron como se dijo anteriormente. En este estudio, los pulmones se homogeneizaron en 1 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), se clarificaron por centrifugación a 2500 rpm (Sorvall Legend™ RT) durante 10 min y se titularon en placas de 96 pocillos en monocapas de células renales canina Madin-Darby (MDCK) [29]. Los títulos virales se determinaron mediante TCID₅₀ en células MDCK mediante el método de Reed-Muench [29].

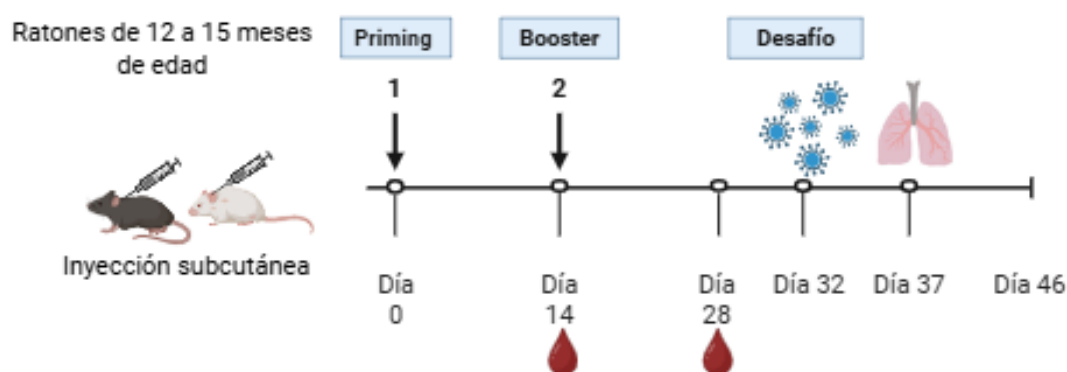


Figura 2. Diseño experimental. Ratones hembra BALB/c y C57BL/6 fueron vacunados por vía subcutánea en los días 0 (Priming) y 14 (Booster) con TIV-IMXQB ó con la vacuna TIV comercial sin adyuvante. Se representan sangrados, desafío con A/Uruguay/897/2018(H1N1) de tipo pdm09 y colección de pulmón.

Grupos	Salino	TIV (µg/dosis)	TIV + IMXQB (µg/dosis)
Inyección subcutánea (100 µL)	SF	7.5	7.5 + 5.0

Tabla 1. Composición de las formulaciones vacunales utilizadas en este estudio.

Se expresan en microgramos/dosis de TIV y de IMXQB utilizado.

4.2 Evaluación de la Respuesta Humoral

Para cuantificar los niveles de anticuerpos en los tres grupos de ambas cepas de ratones, se utilizó la técnica de ELISA previamente descrita [20], efectuando las mediciones a los 14 y 28 días posteriores al priming. La titulación abarcó anticuerpos IgM, IgG y sus isotipos específicos (IgG1, IgG2b e IgG2c), tal como fue documentado por nuestro equipo en un estudio anterior [29].

Brevemente, placas de ELISA de 96 wells (Greiner Bio-One, Darmstadt, Alemania) fueron sensibilizadas con 100 µL de una disolución de la vacuna comercial en PBS al 1% con una concentración final de 1 µg/mL, se incubó a 4 °C overnight (O.N) en cámara húmeda. Se lavaron las placas tres veces con 200 µL de solución de lavado Tween® 20 (Sigma-Aldrich, p1379) en PBS al 0,05 %. Se bloqueó con 200 µL de una solución de Tween® 20 en PBS al 1 % y se volvió a incubar en cámara húmeda por 2 hs. Se lavaron nuevamente las placas 3 veces. Se hicieron distintas diluciones de los sueros según su título (para luego poder interpolar los resultados de la medición en una curva de calibración) comenzando en 1:500 y hasta 1:40000 en un buffer de Tween® 20 en PBS al 0,1 % se sembraron (100 µL por pocillo) y se incubaron durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Las placas se lavaron 3 veces

nuevamente. Luego se agrega el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa a una dilución 1:10000 (100 µL por pocillo), se incuba en cámara húmeda por 1 h. Nuevamente, se lavaron las placas 3 veces. Tras el lavado, la placa es secada por volcado y se añadió a cada pocillo 100 µL de solución reveladora, preparada con TMB (5,5'-tetrametilbencidina) a 6 mg/mL en DMSO, Buffer de acetato de sodio 0,1 M (pH 5,5), utilizando peróxido de hidrógeno al 1 % como sustrato. La placa se incubó durante 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, y con la intención de frenar la reacción, se agregó 30 µL/pocillo de ácido sulfúrico 1 N. Se midió la densidad óptica (DO) en una absorbancia de 450 nm en un espectrofotómetro de placas (Mini Elisa Plate Reader). Los títulos de anticuerpos se expresaron en unidades arbitrarias (UA) con referencia a una curva de calibración estándar preparada con un grupo de sueros positivos.

4.3 Puesta a punto de la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación y determinación del título hemaglutinante en sueros de ratones

Para determinar los títulos hemaglutinantes se siguió el protocolo de la OMS [34]. Brevemente, se eliminaron los inhibidores inespecíficos de los sueros obtenidos luego de dos dosis de vacunación, evaluando por lo tanto los sueros obtenidos 28 días después del priming. Como se indicó anteriormente los grupos de ratones formados para este estudio fueron: TIV, TIVIMX y SF. En un tubo de 0,5 mL se depositaron 5 µL de cada suero y se mezclaron con 15 µL de Enzima Destructora de Receptores (RDE; filtrado de cólera, Sigma-Aldrich, C8772). Se dejaron actuar las enzimas por 24 hs a 37 °C. Posteriormente se Inactivó la mezcla en baño de agua a 56 °C. Luego, se realiza una dilución 1:20 de estos sueros (partiendo de 1:4).

En los pocillos del 1 al 10 de la fila A a la H de una placa de fondo en U se agregan 25 µL de suero fisiológico. Luego, se añadió 25 µL de suero de ratón por duplicado en la columna 1 (A1 a H1). Se hicieron diluciones seriadas de los sueros comenzando en 1/40 transfiriendo 25 µL del primer pocillo de la columna 1 a los pocillos sucesivos descartando los últimos 25 µL luego de la fila 10. La fila 11 se utilizó como control de UHA de la vacuna y control de suero y la fila 12 como control de glóbulos rojos. Se agregaron 25 µL de la vacuna con una concentración de 4 UHA a los pocillos 1 a 10 (A al H). Se mezcló suavemente el contenido de las placas agitando manualmente y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente. Se añadió una suspensión de glóbulos rojos de cobayo en PBS al 1 % y se dejó incubar durante 45 min más. El título de inhibición hemaglutinante se calculó a partir de la mayor dilución del suero que fue capaz de inhibir la hemaglutinación (formar botón) [29].

4.4 *Dosis Infectante del 50 % de los Cultivos de Tejidos (Tissue Culture Infectious Dose 50)*

El ensayo de TCID₅₀ realizado en este estudio permitió cuantificar la carga viral en el tracto respiratorio inferior de cada ratón de la cepa BALB/c posterior a la inmunización y al desafío con la cepa viral A/Uruguay/897/2018 H1N1 de tipo pdm09 realizado en otro estudio [33]. Brevemente, se cultivaron células MDCK en placas de 96 wells. Se colocaron 4×10^4 células MDCK, NBL-2 ATCC® CCL-34™ por well en placas de cultivo de 96 wells con medio DMEM (código DMEM-HPSTA, Capricorn Scientific) complementado con 10 % de SFB (código FBS-11A Capricorn

Scientific) y 1x Estreptomicina-Penicilina (código PS-B, Capricorn Scientific) durante 24-48 hs hasta formar una monocapa confluyente, incubando a 37 °C y 5 % CO₂. En condiciones estériles, se colocaron las muestras de pulmón en tubos con 1 mL de PBS 1x y Estreptomicina-Penicilina 2x manteniendo las muestras en hielo. Se homogeneizó el tejido de pulmón con un disruptor mecánico hasta obtener una suspensión uniforme. Se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min a 4 °C para sedimentar restos celulares y debris. Se recuperó el sobrenadante y se desechó el pellet. Se Infectó con el sobrenadante a titular, de la siguiente manera: se descartó el medio DMEM complementado de las placas y se colocaron 200 µL por well de PBS 1x libre de Ca²⁺ y Mg²⁺. Se retiró el PBS, por volcado, bajo flujo laminar, sin apoyar la placa. Se colocó 180 µL por well de medio DMEM y Tosilamida Feniletil Clorometil Cetona (TPCK) [1 µg/mL] para evitar la degradación de proteínas virales por proteasas celulares. Se sembró 20 µL de virus a titular en los Wells A1, B1, C1 Y D1. Con pipeta multicanal, se homogeneizó y se realizaron las diluciones seriadas partiendo de una dilución 1:10 (10⁻¹) del virus en medio de cultivo hasta 10⁻⁸ usando cuatro réplicas por dilución. Las últimas dos columnas se utilizaron como control negativo, en estas se colocaron 20 µL por well de medio DMEM. Se incubó 4 días a 37 °C y 5 % CO₂. Se registró el número de pocillos que mostraban efecto citopático de las cuatro réplicas por cada dilución. El título viral se calculó utilizando el método de Reed y Muench utilizado anteriormente por nuestro equipo de investigación [29]. Se expresó el resultado como TCID₅₀/mL.

5 Resultados y Discusión

5.1 *La administración subcutánea de TIV-IMXQB indujo un aumento significativo en los títulos de anticuerpos y de inhibición de la hemaglutinación en las cepas BALB/c y C57BL/6*

Se administró TIV o TIV-IMXQB por vía subcutánea a ratones de las cepas BALB/c ó C57BL/6 de 12 y 15 meses de edad respectivamente; un grupo control recibió solución salina (Salino) por la misma ruta. El diseño experimental se esquematiza en la **Figura 2**.

La evaluación mediante ELISA de anticuerpos IgM anti-TIV mostró diferencias significativas entre los grupos vacunados con TIV-IMXQB y TIV en el día 14 para los ratones BALB/c (**Figura 3A**, $p < 0.01$). Sin embargo, para la cepa C57BL/6 no se encontró diferencia significativa al evaluar los anticuerpos IgM anti-TIV para el grupo TIV y el TIV-IMXQB (**Figura 4A**). Por otro lado, se cuantificaron anticuerpos IgG anti-TIV al día 28 posterior al priming. Como era de esperar, la respuesta inmune en los grupos vacunados se potenció tras la segunda dosis, mostrando el efecto “booster”. Los niveles de IgG anti-TIV fueron significativamente mayores en el grupo TIV-IMXQB, en comparación a TIV en ambas cepas de ratón (**Figura 3B y Figura 4B**). Para la cepa BALB/C, evaluamos los niveles de isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b que también mostraron títulos significativamente mayores en el grupo TIV-IMXQB en relación a TIV (**Figura 3C, D y E**, $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$ y $***p < 0.001$, respectivamente). Es de destacar que los niveles de IgG2a observados para el grupo inmunizado con TIV-IMXQB en ratones BALB/C aumentaron de forma pronunciada, esto es especialmente importante por su asociación con las

respuestas inmunes de tipo Th1, que son críticas para la defensa contra infecciones intracelulares[28,29,35]. Los perfiles de inducción de isotipos IgG2a e IgG1 observados en este estudio son consistentes con los reportes previos de nuestro grupo de investigación en ratones adultos. Estos hallazgos coinciden con los patrones documentados para vacunas formuladas con antígenos del virus Zika[19,26] y de influenza[29,36], adyuvadas con IMXQB.

El ensayo de IHA que se optimizó en este estudio y que se utiliza como correlato de protección en la vacunas contra la influenza [32], demostró que TIV y TIVIMXQB indujeron altos títulos de anticuerpos (**Figura 3F y Figura 4C**) con capacidad para neutralizar la hemaglutinina viral, debido a que un título de anticuerpos de 1/40 en la prueba de IHA es suficiente para indicar protección contra influenza [37].

No obstante, las vacunas adyuvadas con diferentes adyuvantes muestran títulos de IHA superiores a las no adyuvadas como resultó en este estudio donde, la vacuna adyuvada con IMXQB exhibió un mayor título de actividad inhibitoria de la hemaglutinación en comparación con su contraparte no adyuvada en ambas cepas de ratones (**Figura 3F y Figura 4C**).

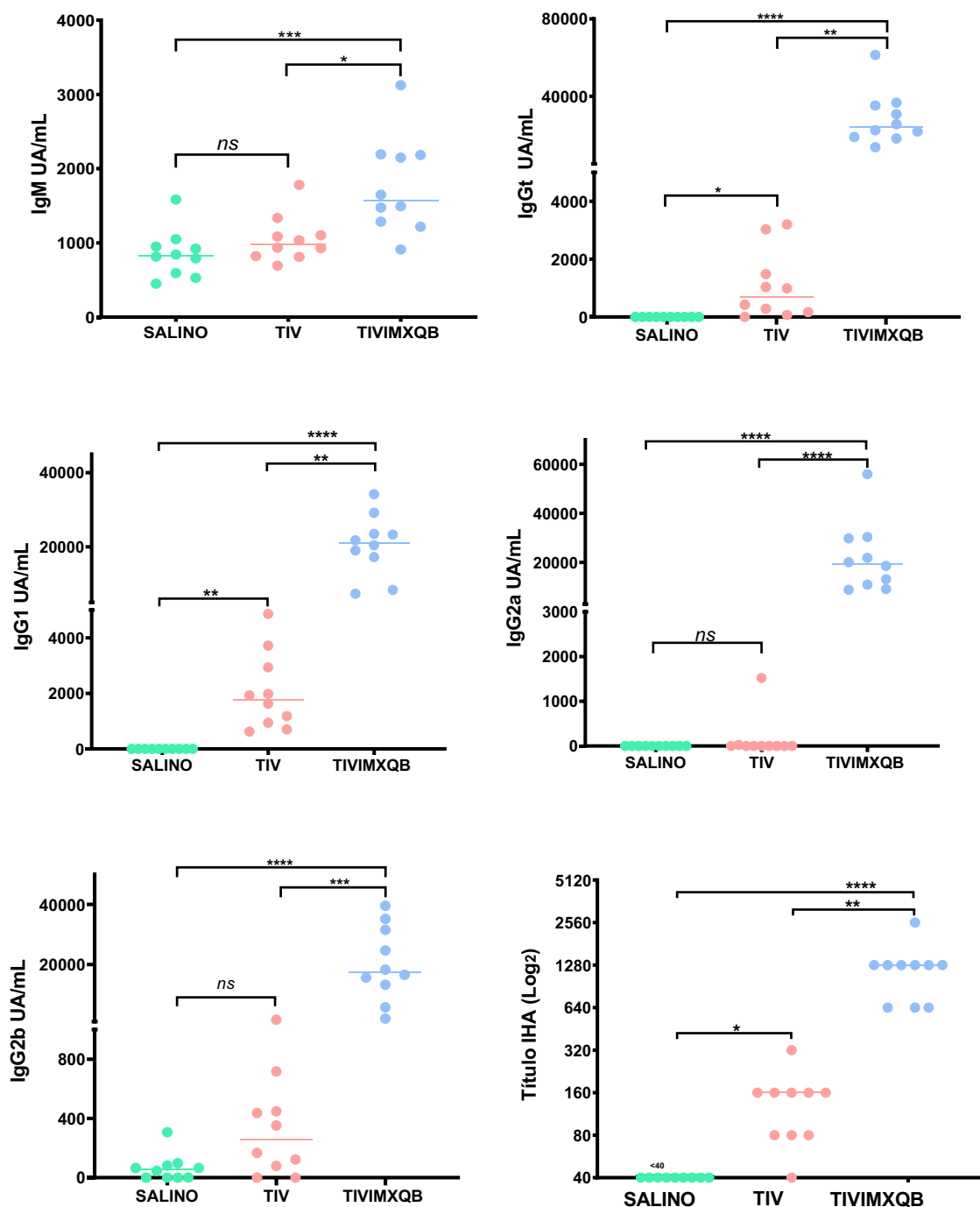


Figura 3. La inoculación con la vacuna trivalente adyuvada contra la influenza (TIV-IMXQB) generó niveles de anticuerpos protectivos más altos que la vacuna comercial no adyuvada (TIV) en ratones BALB/C. Ratones BALB/C (n=10 animales por grupo) hembras y envejecidas fueron vacunadas por vía subcutánea en los días 0 (priming) y 14 (booster) con TIV-IMXQB o con la vacuna no adyuvada (vacuna comercial). Se representan los niveles de IgM anti-TIV (A) en el día 14 e IgGt (B), IgG1 (C), IgG2a (D) e IgG2b (E) a los 28 días post-vacunación. Evaluación de los títulos de inhibición de la hemaglutinación al día 5 post desafío (F). La mediana se indica con una línea y los puntos representan valores individuales. Los análisis

estadísticos se realizaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn sin corregir, comparando el grupo TIV-IMXQB con el grupo TIV. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

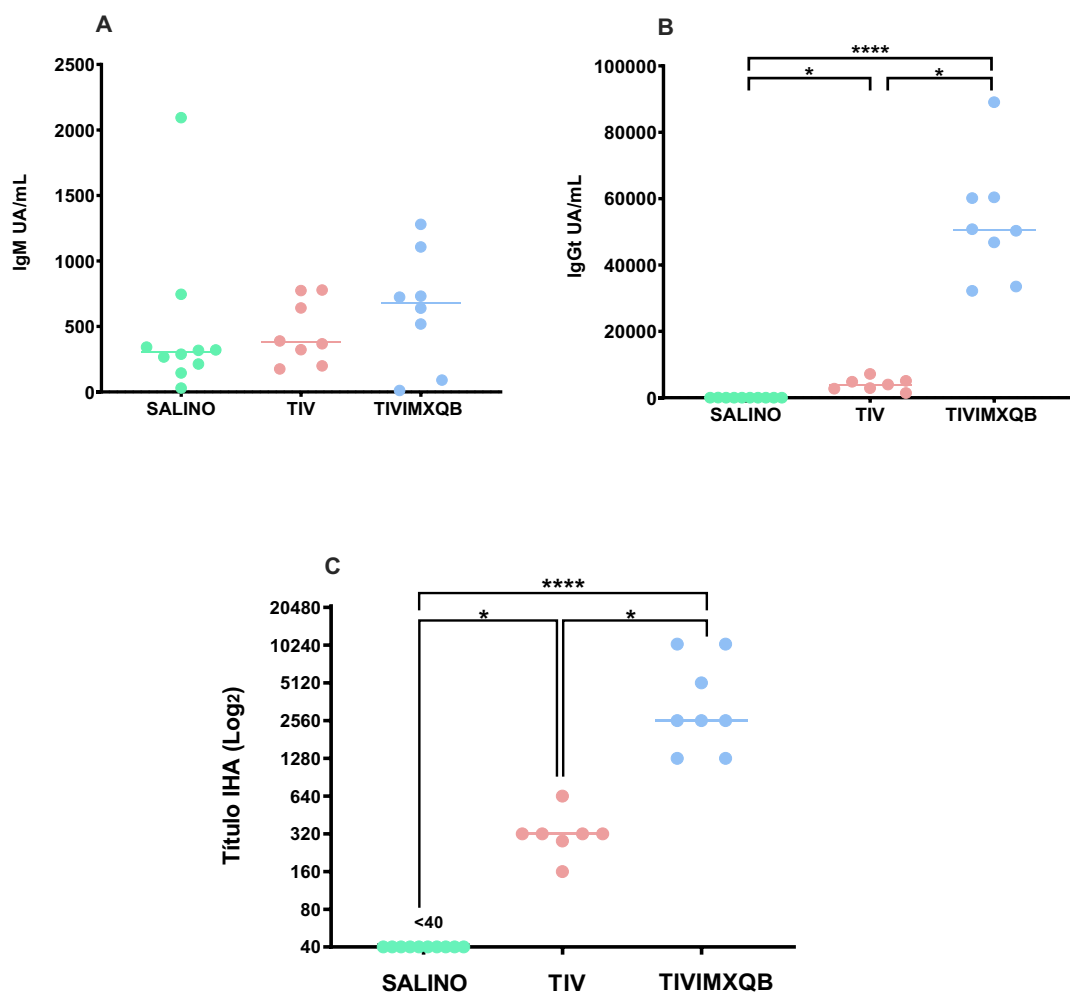


Figura 4. La inoculación con la vacuna trivalente adyuvada contra la influenza (TIV-IMXQB) generó niveles de anticuerpos y de IHA más altos que la vacuna comercial no adyuvada (TIV) en ratones C57BL/6. Ratones C57BL/6 hembras y envejecidas fueron vacunadas por vía subcutánea en los días 0 (priming) y 14 (booster) con TIV-IMXQB o con la vacuna no adyuvada (vacuna comercial). Se representan los niveles de IgM anti-TIV (A) en el día 14 e IgGt (B) en el día 28. Los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se midieron a los 28 días post priming, utilizando n = 10, n = 6 y n=7 animales por grupo (Salino, TIV, TIV-IMXQB respectivamente). TIVIMXQB mostró mayores títulos de inhibición hemaglutinante en comparación a la vacuna sin adyugar (C, $p < 0.05$). En los gráficos correspondientes, una línea representa el valor de la mediana mientras que los puntos individuales muestran los valores obtenidos para cada animal. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn sin corregir. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

5.2 *La administración subcutánea de TIV-IMXQB confirió protección efectiva disminuyendo la replicación viral en pulmón de ratón para la cepa BALB/C.*

En un experimento anterior de inmunización de BALB/c [33] se reportó que el peso retenido y la sobrevivencia de estos animales fue mayor para TIV-IMXQB en comparación a TIV demostrando la mayor capacidad protectora de la vacuna adyuvada frente al desafío viral. Sin embargo, se carecía de información sobre el título viral en pulmón luego del desafío con el virus A/Uruguay/897/2018 (H1N1) de tipo pdm09.

La infección por partículas virales induce alteraciones morfológicas características en la monocapa celular, conocidas como efecto citopático (CPE, por sus siglas en inglés: *Cytopathic Effect*), cuya intensidad se correlaciona con la carga viral. El CPE característico del virus de Influenza al infectar una monocapa de células MDCK, es la formación de placas en el tejido como resultado de la lisis celular.

En este estudio mostramos que luego del desafío viral los animales inmunizados con TIV-IMXQB mostraron una protección mayor frente a la infección disminuyendo el título viral 100 veces en comparación con su versión no adyuvada (**Figura 5**), mientras que el grupo Salino y TIV mostraron cargas virales elevadas similares, demostrando que TIV resultó insuficiente para controlar la replicación viral. La disminución de la carga viral observada en el grupo TIV-IMXQB sugiere que el adyuvante potenció la respuesta inmunitaria generando anticuerpos capaces de neutralizar la infección por el virus.

Otros grupos de investigación también han probado estrategias con adyuvantes para mejorar la protección de la vacuna inactivada contra la influenza en modelos

de ratones envejecidos. Vassilieva et al. [38,39] encontraron que la combinación de cGAMP y Quil A® indujo una protección más efectiva en ratones envejecidos BALB/c, administrada por vía intradérmica o intramuscular, aunque la mejora no fue tan potente como en ratones adultos. Datos de nuestro equipo reportados muestran que los ratones envejecidos [40] vacunados con TIV-IMXQB también tuvieron una respuesta menor en comparación con ratones adultos [29,36] que recibieron la vacuna adyuvada con IMXQB, [29,36] pero en ambos casos se observaron altos títulos de IHA y reducción de la morbilidad tras el desafío viral.

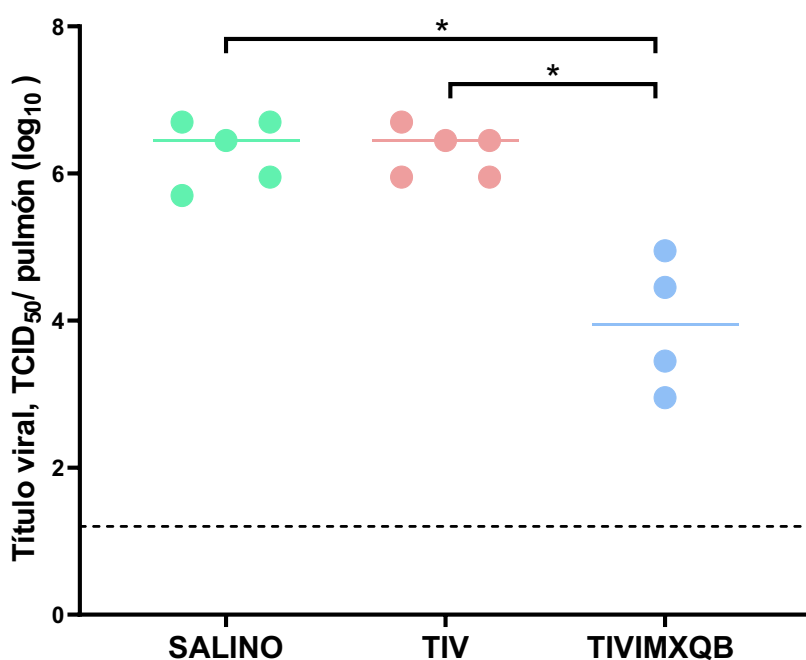


Figura 5. Ratones BALB/C inmunizados con TIV-IMXQB mostraron reducción de la carga viral en pulmones luego del desafío con influenza A(H1N1) de tipo pdm09. Se utilizaron cinco ratones por grupo para determinar los títulos virales en los pulmones al quinto día después del desafío con 1×10^6 TCID₅₀ virus A/Uruguay/897/2018 (H1N1) de tipo pdm09. En los ratones BALB/c inoculados con la solución salina (Salino) y con TIV, los títulos promedio fueron de $10^{6.45}$ TCID₅₀/pulmón mientras que los ratones que recibieron TIV-IMXQB mostraron una reducción de más de dos órdenes de magnitud de virus de desafío: ($10^{3.95}$ TCID₅₀/pulmón). La mediana se indica con una línea y los puntos representan los

valores individuales. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis con una prueba post hoc de Dunn sin corregir para comparaciones múltiples, y cada grupo se comparó con el grupo control TIV. La línea horizontal punteada en la figura representa el límite inferior de detección. Las diferencias significativas se indican como: * $p < 0,05$.

5.3 *La vacunación subcutánea con TIV-IMXQB confirió protección frente al desafío letal por el virus A/Uruguay/897/2018 (H1N1) pdm09 en ratones C57BL/6*

Treinta y dos días luego de la primera vacunación, ratones C57BL/6 de 16 meses de edad, fueron desafiados con una dosis letal del virus A/Uruguay/897/2018 (H1N1) de tipo pdm09 (**Figura 6**). Tanto el grupo TIV como TIV-IMXQB perdieron un 10 % de su peso corporal al cuarto día, y comenzaron a recuperarse al día 6 (TIV-IMXQB) ó 7 (TIV) (**Figura 6A**). Estos grupos no mostraron diferencias significativas con respecto a la pérdida de peso y a la sobrevida luego del desafío letal. Sin embargo en la curva de sobrevida existen diferencias apreciables sobre la mortalidad. En el grupo TIV la mortalidad alcanzo un 80 % muy similar al grupo control (Salino), mientras que para el grupo TIV-IMXQB solo represento un 40 %. Esto evidencia que la formulación adyuvada con las nanopartículas basadas en *Q. brasiliensis* promovieron una protección más efectiva (**Figura 6B**).

En la literatura se reportan múltiples intentos de mejorar la inmunogenicidad de vacunas inactivadas contra la influenza mediante adyuvantes en modelos murinos envejecidos, Ramírez et al. reportaron que la vacuna Fluzone® adyuvada con CpG administrada por vía intramuscular en ratones envejecidos C57BL/6J generó altos títulos de IgG pero bajos títulos de IHA y no previno la mortalidad y morbilidad [41]. Estos hallazgos contrastan con los obtenidos en nuestro estudio y el de estudios anteriores donde se muestra que los ratones envejecidos vacunados con TIV-IMXQB presentaban títulos más altos de IHA e IgG y reducción de la morbilidad y mortalidad en comparación a TIV tras el desafío viral [40].

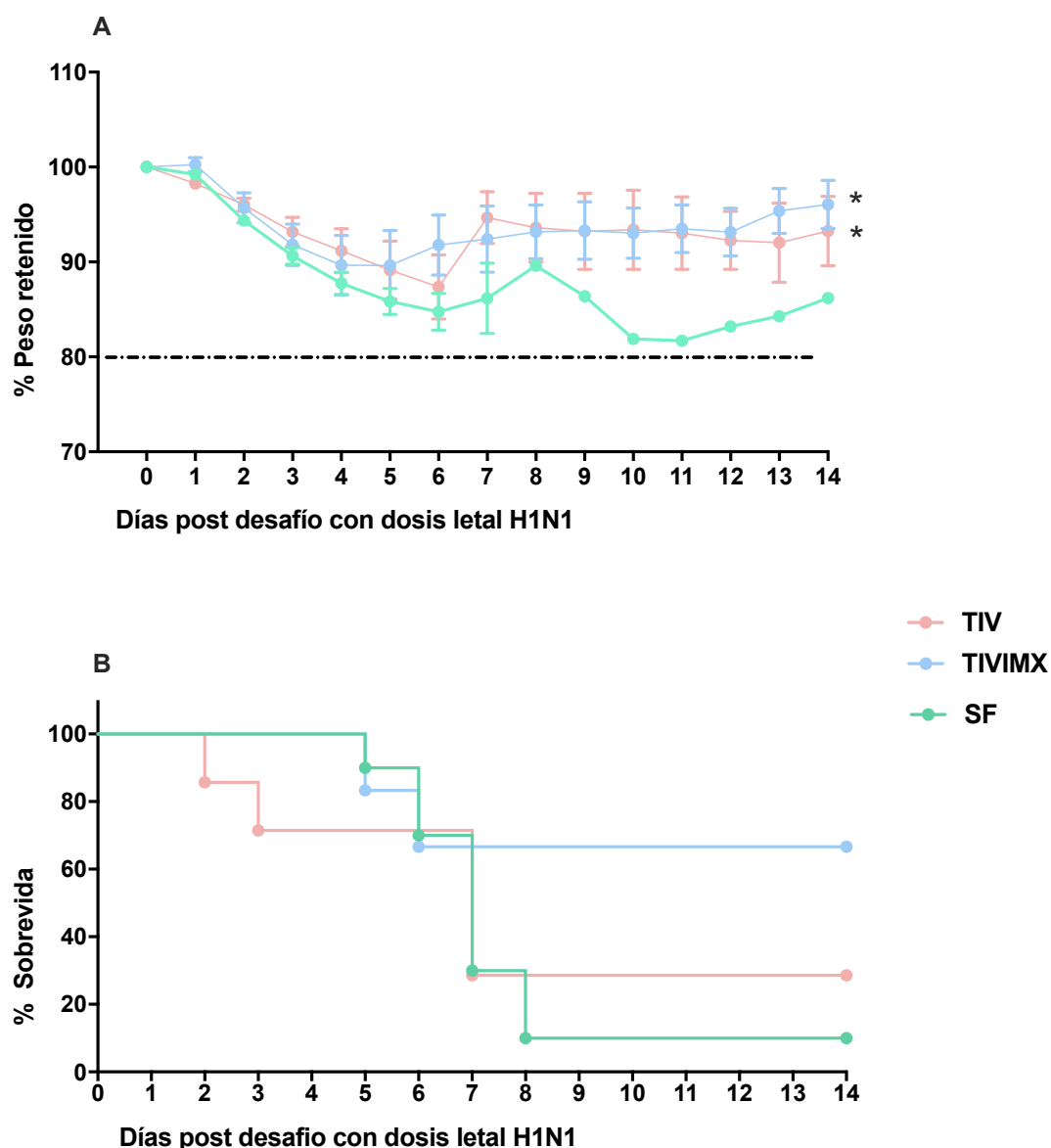


Figura 6. La administración subcutánea de la vacuna TIV adyuvada con IMXQB indujo una protección superior en comparación a la formulación no adyuvada TIV en la cepa C57BL/6. A los 32 días post priming, todos los animales de cada grupo; n = 10, n = 6 y n = 7 (Salino, TIV, TIVIMX respectivamente) fueron desafiados por vía intranasal con 1×10^6 TCID₅₀ (Dosis infectante del 50 % de los cultivos de tejidos) del virus Influenza A/Uruguay/897/2018 (H1N1) de tipo pdm09 y monitoreados durante 14 días. Se registraron y analizaron la pérdida de peso corporal (mostrada como media $\pm$ error estándar, **A**) y el porcentaje de supervivencia (**B**) en función del tiempo transcurrido tras el desafío. La comparación de los porcentajes de supervivencia entre grupos se efectuó mediante el test de log-rank (Mantel-Cox). A pesar de no haber diferencias estadísticas significativas entre estos dos grupos, posiblemente por el n utilizado, estos resultados sugieren que la adyuvancia con IMXQB potencia la respuesta protectora de la vacuna TIV frente al desafío viral.

6 Conclusión

Al analizar la respuesta de anticuerpos en ratones envejecidos inmunizados dos veces con la vacuna antigripal trivalente (TIV) comercial, con y sin nanopartículas basadas en saponinas de *Q. brasiliensis*, demostramos que la formulación adyuvada mejoró la respuesta humoral contra los antígenos de la vacuna. Los anticuerpos generados por TIV-IMXQB para ambas cepas de ratones tienen un mayor título de anticuerpos capaces de inhibir la hemaglutinación en comparación con TIV.

En ratones de la cepa BALB/c se observó una disminución de la carga viral en sobrenadante de pulmón en el grupo TIV-IMXQB en comparación a TIV. Por otra parte, los ratones C57BL/6 vacunados con TIV-IMXQB superaron mejor el desafío de una dosis letal del virus A/Uruguay/897/2018 (H1N1) tipo pdm09 en comparación con TIV.

Aunque se requieren estudios adicionales, los hallazgos obtenidos sugieren que las ISCOM-matrices basados en saponinas derivadas de *Quillaja brasiliensis* podrían representar una estrategia adyuvante prometedora para mejorar la eficacia inmunogénica de vacunas antigripales estacionales, particularmente en poblaciones envejecidas.

7 Referencias Bibliográficas

- [1] Fisman D, Pérez-Rubio A, Postma M, Smith DS, Mould-Quevedo J. Maintaining the value of influenza vaccination—the shift from quadrivalent to trivalent vaccines: an expert review. *Expert Rev Vaccines* 2025;24:499–508. <https://doi.org/10.1080/14760584.2025.2515597>.
- [2] Laursen NS, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza viruses. *Antiviral Res* 2013;98. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.021>.
- [3] Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet* 2018;391. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2).
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/flu-burden/php/about/faq.html>. Datos sobre la carga estimada de gripe 2024.
- [5] Nowak GJ, Sheedy K, Bursey K, Smith TM, Basket M. Promoting influenza vaccination: Insights from a qualitative meta-analysis of 14 years of influenza-related communications research by U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Vaccine* 2015;33:2741–56. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2015.04.064>.
- [6] Tregoning JS, Russell RF, Kinnear E. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2018;14. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1415684>.
- [7] Sambhara S, McElhaney JE. Immunosenescence and influenza vaccine efficacy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009;333. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92165-3_20.

- [8] Shichinohe S, Watanabe T. Advances in Adjuvanted Influenza Vaccines. *Vaccines* (Basel) 2023;11. <https://doi.org/10.3390/vaccines11081391>.
- [9] Glass LM, Glass RJ. Social contact networks for the spread of pandemic influenza in children and teenagers. *BMC Public Health* 2008;8. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-8-61>.
- [10] Reed C, Meltzer MI, Finelli L, Fiore A. Public health impact of including two lineages of influenza B in a quadrivalent seasonal influenza vaccine. *Vaccine* 2012;30. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.098>.
- [11] Kim YH, Hong KJ, Kim H, Nam JH. Influenza vaccines: Past, present, and future. *Rev Med Virol* 2022;32. <https://doi.org/10.1002/rmv.2243>.
- [12] Tripp RA. Understanding immunity to influenza: implications for future vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2023;22. <https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2266033>.
- [13] Faizal A, Geelen D. Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochemistry Reviews* 2013;12:877–93. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9322-4>.
- [14] Read Kensil C, Kammer R. QS-21: A water-soluble triterpene glycoside adjuvant. *Expert Opin Investig Drugs* 1998;7. <https://doi.org/10.1517/13543784.7.9.1475>.
- [15] Wenbin Tuo DZ. QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Nat Prod Chem Res* 2015;03. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000e113>.
- [16] Magedans YVS, Yendo ACA, Costa F De, Gosmann G, Fett-Neto AG. Foamy matters: An update on Quillaja saponins and their use as immunoadjuvants. *Future Med Chem* 2019;11. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0438>.
- [17] Silveira F, Cibulski SP, Varela AP, Marqués JM, Chabalgoity A, de Costa F, et al. *Quillaja brasiliensis* saponins are less toxic than Quil A and have similar properties

- when used as an adjuvant for a viral antigen preparation. *Vaccine* 2011;29:9177–82. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.137>.
- [18] Cibulski S, Rivera-Patron M, Suárez N, Pirez M, Rossi S, Yendo AC, et al. Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis* enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines. *Vaccine* 2018;36. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.030>.
- [19] Cibulski S, Teixeira TF, Varela APM, de Lima MF, Casanova G, Nascimento YM, et al. IMXQB-80: A *Quillaja brasiliensis* saponin-based nanoadjuvant enhances Zika virus specific immune responses in mice. *Vaccine* 2021;39:571–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.12.004>.
- [20] Cibulski SP, Mourglia-Ettlin G, Teixeira TF, Quirici L, Roehe PM, Ferreira F, et al. Novel ISCOMs from *Quillaja brasiliensis* saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine* 2016;34:1162–71. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.029>.
- [21] Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, et al. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* 2021;385. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2107659>.
- [22] Nadeem AY, Shehzad A, Islam SU, Al-Suhaimi EA, Lee YS. Mosquirix™ RTS, S/AS01 Vaccine Development, Immunogenicity, and Efficacy. *Vaccines (Basel)* 2022;10. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050713>.
- [23] Stanisic DI, Good MF. Malaria Vaccines: Progress to Date. *BioDrugs* 2023;37. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00623-4>.
- [24] Syed YY. Recombinant Zoster Vaccine (Shingrix®): A Review in Herpes Zoster. *Drugs Aging* 2018;35. <https://doi.org/10.1007/s40266-018-0603-x>.

- [25] Roman F, Burny W, Ceregido MA, Laupèze B, Temmerman ST, Warter L, et al. Adjuvant system AS01: from mode of action to effective vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2024;23:715–29. <https://doi.org/10.1080/14760584.2024.2382725>.
- [26] Cibulski S, Varela APM, Teixeira TF, Cancela MP, Sesterheim P, Souza DO, et al. Zika Virus Envelope Domain III Recombinant Protein Delivered With Saponin-Based Nanoadjuvant From *Quillaja brasiliensis* Enhances Anti-Zika Immune Responses, Including Neutralizing Antibodies and Splenocyte Proliferation. *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.632714>.
- [27] Morelli AB, Maraskovsky E. ISCOMATRIX Adjuvant in the Development of Prophylactic and Therapeutic Vaccines. *Immunopotentiators in Modern Vaccines: Second Edition*, Elsevier Inc.; 2017, p. 311–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00016-5>.
- [28] Rivera-Patron M, Cibulski SP, Miraballes I, Silveira F. Formulation of IMXQB: Nanoparticles Based on *Quillaja brasiliensis* Saponins to be Used as Vaccine Adjuvants. *Methods in Molecular Biology*, vol. 2469, Humana Press Inc.; 2022, p. 183–91. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2185-1_15.
- [29] Silveira F, Rivera-Patron M, Deshpande N, Sienra S, Checa J, Moreno M, et al. *Quillaja brasiliensis* nanoparticle adjuvant formulation improves the efficacy of an inactivated trivalent influenza vaccine in mice. *Front Immunol* 2023;14:1163858. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1163858>.
- [30] Mohsen MO, Gomes AC, Cabral-Miranda G, Krueger CC, Leoratti FM, Stein J V., et al. Delivering adjuvants and antigens in separate nanoparticles eliminates the need of physical linkage for effective vaccination. *Journal of Controlled Release* 2017;251:92–100. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.031>.

- [31] Bigaeva E, van Doorn E, Liu H, Hak E. Meta-analysis on randomized controlled trials of vaccines with QS-21 or IScomatrix adjuvant: Safety and tolerability. PLoS One 2016;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154757>.
- [32] Ohmit SE, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Monto AS. Influenza hemagglutination-inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection. Journal of Infectious Diseases 2011;204. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir661>.
- [33] Rivera-Patrón, M. (2022.). Estudio de la respuesta inmune desencadenada por adyuvantes basados en saponinas de *Quillaja brasiliensis*. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.
- [34] Cox N, Webster RG, Krauss S, Guan Y, Hay A, Yu K, et al. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance, 2nd edition. WHO/CDS/CSR/NCS/20025 Rev 1 2005.
- [35] Stertman L, Palm AKE, Zarnegar B, Carow B, Lunderius Andersson C, Magnusson SE, et al. The Matrix-MTM adjuvant: A critical component of vaccines for the 21st century. Hum Vaccin Immunother 2023;19. <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2189885>.
- [36] Rivera-Patron M, Moreno M, Baz M, Roehe PM, Cibulski SP, Silveira F. Iscom-like nanoparticles formulated with *Quillaja brasiliensis* saponins are promising adjuvants for seasonal influenza vaccines. Vaccines (Basel) 2021;9. <https://doi.org/10.3390/vaccines9111350>.
- [37] DiazGranados CA, Dunning AJ, Jordanov E, Landolfi V, Denis M, Talbot HK. High-dose trivalent influenza vaccine compared to standard dose vaccine in elderly adults: Safety, immunogenicity and relative efficacy during the 2009-2010 season. Vaccine 2013;31:861–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.013>.

- [38] Vassilieva E V., Li S, Korniyuchuk H, Taylor DM, Wang S, Prausnitz MR, et al. cGAMP/Saponin Adjuvant Combination Improves Protective Response to Influenza Vaccination by Microneedle Patch in an Aged Mouse Model. *Front Immunol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583251>.
- [39] Vassilieva E V., Taylor DW, Compans RW. Combination of STING Pathway Agonist With Saponin Is an Effective Adjuvant in Immunosenescent Mice. *Front Immunol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03006>.
- [40] Silveira F, García F, García G, Chabalgoity JA, Rossi S, Baz M. Intranasal Delivery of *Quillaja brasiliensis* Saponin-Based Nanoadjuvants Improve Humoral Immune Response of Influenza Vaccine in Aged Mice. *Vaccines (Basel)* 2024;12. <https://doi.org/10.3390/vaccines12080902>.
- [41] Ramirez A, Co M, Mathew A. CpG improves influenza vaccine efficacy in young adult but not aged mice. *PLoS One* 2016;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150425>.