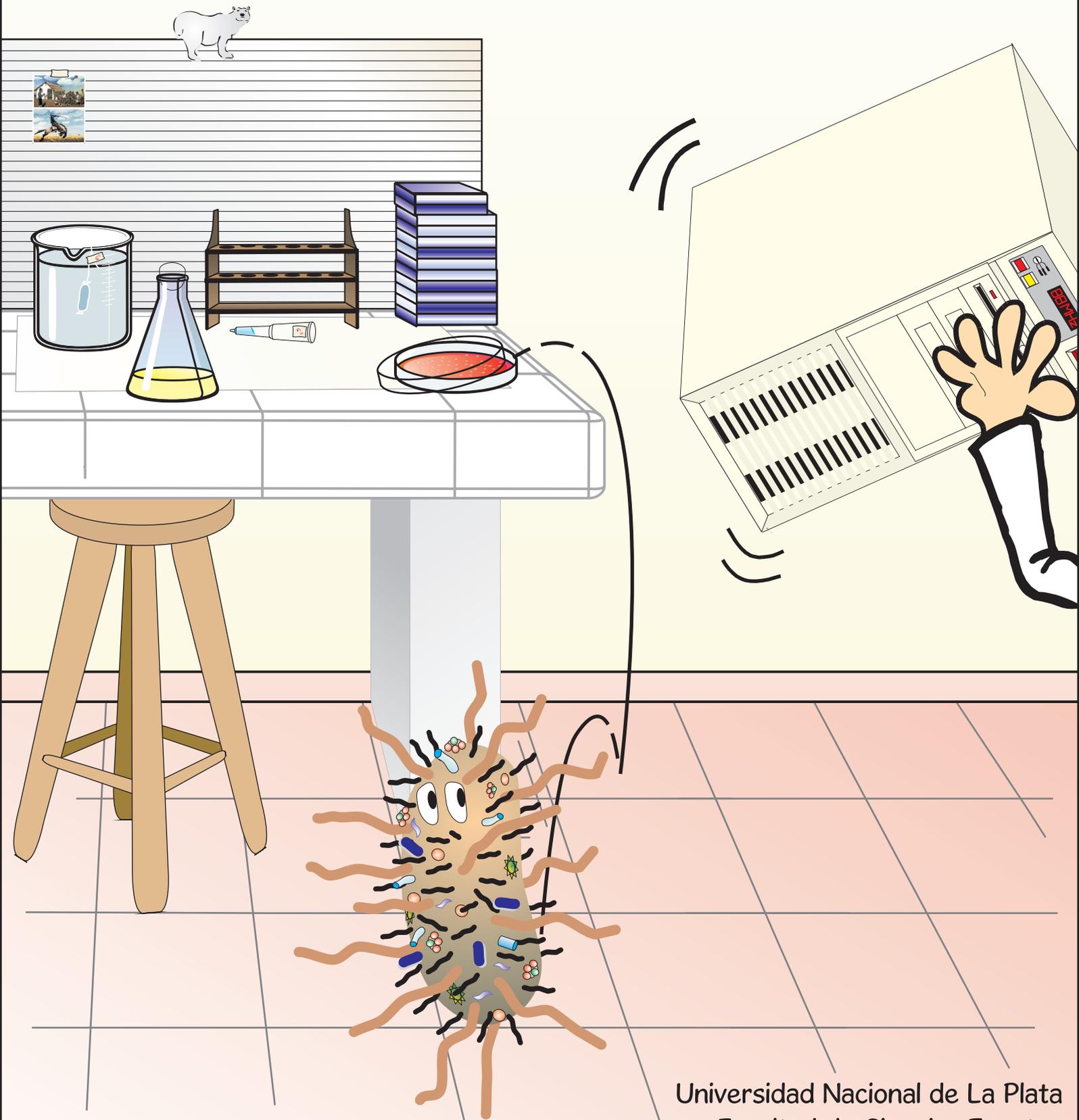




Tesis Doctoral

Nuevas estrategias basadas en genómica para el mejoramiento de vacunas contra un patógeno re-emergente.



Bioq. Augusto Graieb
Directora: Dra. Daniela Hozbor

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección de la Dra. Daniela Hozbor.

Agradecimientos

No está fácil hacer esto de los agradecimientos... porque además de agradecerles todo lo que hemos compartido estos años, este evento es a la vez una despedida... y los voy a extrañar!

Bueno, mi primer agradecimiento tiene que ver con eso. Con haber podido estudiar, y en una Facultad como ésta, donde uno comparte tanto con sus compañeros y donde estudiar es algo tan humano. Y poder quedarme a trabajar después en un grupo de investigación donde eso también pasa, y nos divertimos casi más de lo que trabajamos (algunos incluso mucho más de lo que trabajamos!) ¿a quién agradecer por todo esto? Más que a nadie, a los que a lo largo de tantos años han defendido que la Educación siga siendo Pública. Y por supuesto, a quienes con su labor y trabajo diario, bancan esta educación pública, muchas veces sin poder acceder a todos sus niveles. Y por último, mas terrenal y pragmáticamente, a los viejos, que me bancaron unos cuantos añitos de carrera!

En una Facultad como ésta, que la mayoría hacemos propia y queremos ayudar a mejorar, también quiero agradecer, o mejor reconocer, a todos los que me enseñaron lo importante que es además de estudiar ciencia, estudiar y pensar *sobre* la ciencia y la educación para llegar a ser un poco más críticos en lo que hacemos todos los días.

Compañeros de una militancia difícil, muchas veces contra la corriente, por una ciencia pensada para mejorar la calidad de vida de los pueblos.

Y bueno, no me queda otra –mal que me pese- que agradecerles a todos ustedes, así que ahí vamos...

A Daniela Hozbor, fundamental y francamente, porque a pesar de infinitas discusiones, idas y vueltas, de las diferentes concepciones sobre algunas cosas que tenemos, recorrió conmigo un camino y logramos un objetivo. Y porque cuando las cosas cuestan, llegar es doblemente valioso (¿o dos log?).

A todos los integrantes del IBBM, jóvenes y no tanto, porque si uno a lo largo de la vida se va “construyendo”, más que ir cargándose de cosas aprendidas, lo que queda no es el mismo tipo con más conocimientos, sino uno distinto... los tengo adentro!

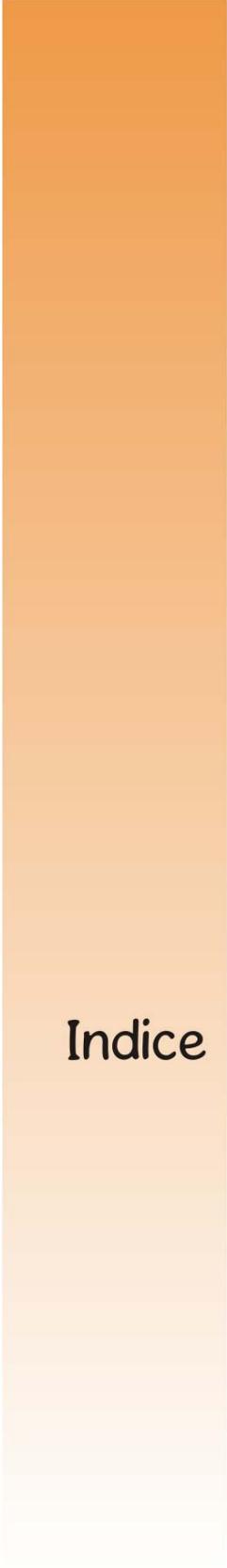
A la camada de becarios con los que de a poco nos fuimos juntando, viendo que pasábamos por las mismas situaciones, y con quienes rompimos las barreras entre grupos para hacernos las cosas más fáciles todos los días.

A mis compañeros del grupo Bordetella y por supuesto también a “los Tony”, que me bancaron mis muy esporádicos días de mal humor y algún que otro apuro por rajar dejando algunas cosas sueltas a mi paso... a los más grandes que nos fueron enseñando y se habrán divertido con nuestra evolución según pasaron los años, y a los compañeros de “pipeta”, con quienes discutimos, pensamos, nos ayudamos unos a otros, tomamos tantos mates, nos conocimos las mañas, nos retamos, y nos cubrimos algunos deslices laboratoriales...

A Raúl, Segio y Facundo por alegrarnos los días además de mantenernos limpio el boliche (que nunca quedó tan limpio, después de todo!)

Bueno, a todos porque de estos años me quedan muchas cosas más que lo aprendido y formado: los almuerzos al aire libre, el aterrizaje forzoso de leti, aquel memorable chorro de pipeta hipoclorítica directo a la remera de JPG (y soportarla después), un paseo en caja algo traumático, los mates y las historias de Rubencito, las peripecias de un mesías que detiene fuegos pero pierde sus muletas, nuestras charlas epistemológicas con Celina, caminatas interminables por tantísimos museos parisinos, otro día más de interminables museos parisinos, algunas idas a casa intespestivas, muchas horas de flujo y ratones compartidas...

Y por último a Caro, mi compañera de la vida que en tantos años se bancó estoicamente unas cuantas catarsis culpa de ustedes... sin sus consejos soportarme les hubiera sido más difícil!



Indice

Capítulo primero. Revisión de las estrategias de vacunación. Alternativas para el control de una enfermedad inmunoprevenible vigente. 1

Una historia de la vacunación..... 1

Introducción..... 1

La causalidad de las enfermedades y su tratamiento..... 2

Edward Jenner y el descubrimiento de la primera vacuna..... 4

Tres ideas que confluyeron en el planteo de la teoría de los gérmenes 6

Una causa para cada enfermedad 6

El contagio directo 6

Microorganismos, fermentación y enfermedad 8

Enunciación de la teoría de los gérmenes 8

Las vacunas de laboratorio 9

Vacunas con microorganismos atenuados 10

Vacunas en base a microorganismos inactivados..... 11

Vacunas a subunidades. Toxinas, antitoxinas y toxoides 12

Las vacunas en el Siglo XX 13

Vacunas contra *B. pertussis* 16

Problemáticas actuales de pertussis 23

Cuadro de situación actual de pertussis – problemáticas vigentes..... 23

Número de casos mundiales de coqueluche en el contexto de otras enfermedades
inmunoprevenibles..... 25

Persistencia de la circulación de *B. pertussis*..... 27

Situación epidemiológica de pertussis en Argentina..... 27

Persistencia de brotes epidémicos..... 30

Reemergencia de la enfermedad 31

Algunas hipótesis para explicar la reemergencia de pertussis 33

i) Efectividad de las vacunas contra pertussis 33

ii) Caída de la inmunidad 34

iii) Divergencia antigénica..... 35

Hipótesis de trabajo planteada en esta tesis..... 37

La vacunología reversa	41
El primer paso de la estrategia	44
Otros ejemplos de aplicación de la vacunología reversa en bibliografía	44
Criterios de selección <i>in silico</i> utilizados	45
Obtención de los candidatos vacunales	49
Experimentos <i>in vitro</i>	50
Ensayos <i>in vivo</i>	52
Resumen numérico de los trabajos.....	52
Aplicabilidad de la estrategia para <i>B. pertussis</i>	52
Capítulo segundo. Aplicación de la vacunología reversa al caso de pertussis	59
Selección <i>in silico</i> de los candidatos vacunales de <i>B. pertussis</i>	59
Introducción	59
Construcción de una base de datos unificada para la selección <i>in silico</i> de candidatos.....	61
i) Inclusión de los ORFs transcritos diferencialmente en la fase virulenta de <i>B. pertussis</i>	65
ii) Exclusión de ORFs ausentes en aislamientos clínicos.....	66
Características de los programas utilizados.....	69
Integración de la información y selección final de los candidatos	72
Discusión	76
Genoma de <i>B. pertussis</i> Tohama I como material de trabajo.....	77
Comparación de genomas entre las Bordetella clásicas.....	79
Algunas reflexiones en torno de las comparaciones entre genomas.....	81
Algoritmos de predicción de inmunogenicidad.....	83
Obtención de los candidatos vacunales de <i>B. pertussis</i>	87
Introducción.....	87
Pasos seguidos en la obtención de los candidatos vacunales de <i>B. pertussis</i>	88
Diseño de primers	90
Clonado y obtención de los vectores de expresión	93
Obtención de plásmidos de expresión.....	94
Expresión de las proteínas recombinantes.....	96
Purificación de los candidatos vacunales.....	99
Resumen de resultados y conclusiones	100
Selección <i>in vitro</i> de los candidatos vacunales de <i>B. pertussis</i>.....	107
Criterios para la selección <i>in vitro</i> de candidatos vacunales	107
Estrategia de selección <i>in vitro</i> seguida en este trabajo.....	114
Ensayos con sueros de pacientes convalecientes de pertussis y adultos de población general	117
.....	117
Criterios de elección de sueros de humanos convalecientes de pertussis.....	118
Criterios de elección de sueros control	121
Sueros con seroconversión como herramienta complementaria	127
Ensayos con sueros de individuos vacunados.....	129
Criterios de elección de sueros de individuos vacunados	129
Ensayos con sueros de animales inmunizados.....	132
Características de los candidatos reconocidos.....	136

Resumen de resultados y discusión	141
“Estado de situación” de la estrategia	143
Selección <i>in vivo</i> de los candidatos vacunales	147
Modelo de protección en ratones	147
Evaluación de la capacidad protectora de los candidatos seleccionados	148
Discusión	153
Capítulo tercero. Conclusiones generales	159
Algunas conclusiones en base a nuestra experiencia de trabajo	159
Diferentes visiones en vacunología	165
Metodología	171
1. Medios y condiciones de cultivo	171
Escherichia coli.....	171
Bordetella pertussis	171
2. Obtención de los amplicones y chequeo de construcciones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	172
3. Análisis cualitativo de muestras de ADN en geles de agarosa.....	174
4. Clonado de los amplicones en los vectores pEntr/SD/D-Topo y pET200.....	174
5. Transformación de plásmidos en bacterias competentes químicas.....	174
6. Purificación de plásmidos	175
7. Recombinación con enzima LR.....	175
8. Preparación de bacterias <i>E. coli</i> BL21 DE3 aptas para transformación química.....	175
9. Expresión de las proteínas heterólogas	176
10. Obtención de muestras de proteínas totales	177
11. Electroforesis unidimensionales en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	177
12. Tinción de proteínas con Coomassie Blue R-250	177
13. Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masa (EM), MALDI-TOF.	178
14. Purificación mediante cromatografía de afinidad	179
15. Inmunodetecciones de proteínas (Inmunoblot).....	181
16. Obtención de sueros específicos contra <i>B. pertussis</i>	181
17. Ensayos de protección utilizando el modelo desafío intranasal en ratones	182
Bibliografía.....	187

1

Capítulo primero

Revisión de estrategias de vacunación Alternativas para el control de una enfermedad inmunoprevenible vigente



Una historia de la vacunación

Una epidemia, hasta hace muy poco, era un castigo de los dioses de turno, algo invisible, algo mínimo, recorría el mundo de cuerpo en cuerpo, dejando tras su paso solamente cadáveres. Era imposible saber qué era, era inaprensible, pequeño o grande, era la sombra del pecado o el brazo incontenible de la justicia divina; hombres y mujeres se enfrentaban a él completamente desarmados. Era uno de los jinetes del Apocalipsis, que atropellaba, pisoteaba cuerpos y sembrados, y no se detenía ante fronteras, murallas, torres o cuarentenas.

La historia de la ciencia es, por lo menos en uno de sus capítulos, la historia de la lucha contra esos atropellos. En la oscuridad, tanteando, sin saber bien qué hacían, médicos, científicos, filósofos, trataban de forjar –a veces con genio, a veces con suerte, a veces sin ella- las armas para enfrentarlos.

La historia de la ciencia es también la historia del error, que marcha paso a paso, que ciega los caminos inútiles y que finalmente, por cansancio, abre la tierra fértil, la desbroza trabajosamente y la deja pronta para la siembra.

¿Se ha triunfado en la lucha contra las epidemias? En buena medida sí, ya que se identifican rápidamente los agentes causales, y la química nos provee, con bastante rapidez, una artillería adecuada.

Pero no han sido controladas –para nada- las causas sociales que permiten que las epidemias se propaguen –y que a veces incluso las provocan-. Esa es una deuda que llevará... ¿Cuánto tiempo llevará conseguir un mundo mínimamente justo?

Leonardo Moledo, prólogo al libro
Historia de las epidemias, de Matías Alinovi.

Introducción

El pensamiento humano sobre las causas de las grandes pestes o epidemias ha ido cambiando a lo largo de la historia. El conocimiento aceptado por una sociedad deriva de la interpretación de hechos observables, pero esta interpretación se hace siempre desde la cosmovisión a la que esta sociedad adhiere en un momento histórico determinado. En las diversas teorías elaboradas por los sabios o científicos de cada época sobre las causas de las epidemias, es posible ver cómo las concepciones del mundo influyen sobre la producción de conocimiento, y por ende las prácticas a las que este conocimiento da lugar. Así, como relata

Alinovi en el libro del cual hemos tomado el epígrafe, el aislamiento de los enfermos para evitar el contagio no se practicó hasta que se dejó de la lado la teoría del miasma, para la cual una práctica de este tipo no tendría sentido. Reconociendo que nuestro trabajo se encuentra sujeto también a estas influencias, nos pareció oportuno comenzar con una breve recorrida por la historia de estas ideas y las formas de intervención contra las enfermedades que acompañaron a cada concepción.

En los apartados que siguen intentaremos recorrer esta historia en paralelo con el desarrollo de las vacunas como una eficaz forma de intervención humana contra las enfermedades. Comenzaremos este recorrido en la era previa a la teoría de los gérmenes como causantes de enfermedades, época del descubrimiento de la primera vacuna por Edward Jenner a fines del siglo XVIII. Nos focalizaremos luego en el surgimiento de esta teoría, que cambiaría para siempre la forma en que pensamos las enfermedades, y su inmediato impacto la vacunación. En cuanto al desarrollo de las vacunas a lo largo del siglo XX, tomaremos las principales vacunas en uso para ejemplificar el sentido de este recorrido, sin pretender –desde ya- hacer aquí una historia exhaustiva de la vacunación ni de otras formas de intervención que han sido fundamentales en el control de enfermedades, como el uso de antibióticos.

Nuestro relato está basado fundamentalmente en tres libros sobre el tema: “Vaccines: A Biography”, editado por Andrew Artenstein [1]; “Historia de las epidemias” de Matías Alinovi [2]; y “The discovery of the germ”, de John Waller [3].

La causalidad de las enfermedades y su tratamiento

Según Hipócrates, la medicina debía basarse en la experiencia y en la observación. Tal es así que el médico griego atribuyó las causas de la peste de Atenas (430 a.C.) a factores naturales tales como impurezas del aire y del agua. Con el advenimiento del cristianismo, siglos más tarde, proliferaron las interpretaciones en las que el rol central lo jugaba la voluntad divina: las pestes y epidemias eran castigos de Dios que llegaban a todos por igual, y contra los cuales ninguna barrera sería eficaz.

El siglo XIV fue el apogeo de las explicaciones astrológicas sobre las enfermedades. Para los académicos de esta época eran las alineaciones de los astros lo que producía -o favorecía- tanto las tempestades como la aparición de las pestes. Siglos más tarde ocurrió, en cierto sentido, una vuelta a la búsqueda de factores físicos propuesta por Hipócrates. La idea más aceptada hacia el 1650 como causalidad de las enfermedades se puede resumir en la teoría del miasma: según ésta, eran las emanaciones fétidas de la materia orgánica en descomposición las que transportadas por el aire provocaban enfermedades [2].

En esta época (1677) un logro muy importante que luego tendría impacto en el establecimiento de la causalidad de las enfermedades fue el realizado por el holandés van Leeuwenhoek, quien a través de un microscopio construido por él mismo realiza las primeras observaciones de microorganismos. Es importante señalar que en aquel momento la relación de algunas de estas formas de vida con las enfermedades humanas pasó desapercibida tanto para van Leeuwenhoek en ese momento como para la comunidad en general en los siguientes 200 años. Este sería un claro ejemplo de la importancia que tiene el marco teórico imperante desde el cual los científicos hacen sus observaciones.

Los médicos de aquellos tiempos distinguían entre factores predisponentes y factores desencadenantes de una enfermedad. Entre los primeros, encontramos la constitución física del paciente, su modo de vida y también los factores ambientales como la pureza del aire que respirara, o el clima donde se habitase. Los miasmas entraban en esta teoría como factores desencadenantes de la enfermedad, que tomaría a su vez distintas formas y manifestaciones en cada individuo según fuesen sus factores predisponentes. Aunque los médicos del siglo XVIII distinguían perfectamente las enfermedades entre sí, se pensaba que en ausencia de los cuidados adecuados unas enfermedades podían derivar en otras.

La idea de una relación unívoca entre causas y enfermedades aparecería tiempo después, como mencionaremos más adelante, aparejada a ciertos cambios en las prácticas médicas.

Como teoría sobre el origen de las enfermedades la teoría miasmática constituía, de alguna manera, una versión mecanicista enfrentada a las teorías previas que atribuían las enfermedades a designios divinos o alineaciones de astros. En esta interpretación, podemos ver a los miasmas presentes en el medio ambiente como agentes físicos de transmisión de los flagelos enviados por los dioses.

Las enfermedades una vez desencadenadas se interpretaban como desbalances entre los líquidos o humores corporales, o bien como el resultado del estado patológico de alguno de ellos. Los cuatro humores corporales definidos por Hipócrates en la antigüedad eran la sangre, la flema, la bilis y la bilis negra. El desbalance de los humores se asociaba a determinados estados de ánimo como la euforia o la melancolía y también a estados de salud y enfermedad. Desde este punto de vista el tratamiento era sintomático. La labor del médico, una vez realizado el diagnóstico, consistía en restablecer el equilibrio entre los humores, o eliminar del organismo aquel humor que se encontrara alterado. Así, eran prácticas habituales el sangrado de los pacientes al punto que muchos se desmayaban durante el procedimiento, o la inducción de vómitos para facilitar la expulsión de los líquidos en exceso. Es importante destacar que estas prácticas, que hoy parecen totalmente inadecuadas e injustificadas, eran realizadas por los sabios de la época y naturalmente aceptadas por quienes recibían los tratamientos. Esta aceptación tenía sus bases en hechos

verificados por todos, como la presencia de vómitos ante una intoxicación por alimentos, las expectoraciones de la tuberculosis, o los bubones que aparecían en la peste negra.

Edward Jenner y el descubrimiento de la primera vacuna

El contexto médico en que Edward Jenner desarrolló sus experimentos sobre viruela era entonces el de la teoría miasmática de las enfermedades y el tratamiento en base al mantenimiento del equilibrio de los líquidos corporales. Sin embargo, en esa misma época algunas enfermedades infecciosas como la peste negra, la sífilis y la propia viruela, sobre la que trabajaría Jenner eran clasificadas como contagiosas entre personas.

Antes de los avances de Jenner existían metodologías de control contra la viruela, una enfermedad devastante en la antigüedad y la Edad Media. En particular entre los siglos XI y XVI –según distintas indagaciones– existían distintos procedimientos de prevención englobados bajo el término “variación”. Este método consistía en la inoculación de individuos sanos con material infectado proveniente de enfermos. Entre los procedimientos descriptos, figuran el de vestir ropas de enfermos de viruela, insuflar por la nariz costras de las heridas causadas por la enfermedad, o colocarle en las fosas nasales un algodón con material proveniente de las lesiones de un individuo infectado [4]. La variación se aplicaba en distintas zonas de China y la India, y desde allí se piensa que su práctica se extendió al este asiático y al África, y más tarde a Turquía y el resto de Europa.

Aunque generalizada en Oriente, ésta técnica era cuestionada en el mundo occidental tanto por sectores religiosos, que argumentaban que no debía interferirse en los Planes Divinos, como por aquellos que lo creían un procedimiento peligroso o de dudosa efectividad. A partir de los años 1720, con la realización de algunos experimentos auspiciados por la Royal Society inglesa, la variación comenzó a aceptarse en Gran Bretaña, y se aplicó esporádicamente a individuos de las clases altas. La primera variación aplicada en forma masiva se hizo en Boston (en ese momento Nueva Inglaterra) en 1721. En ese año durante una epidemia un total de 240 personas fueron inoculadas con material de pústulas variolíticas, lográndose un éxito relativo en el control de la enfermedad. Para fines del siglo XVIII, momento en que Jenner realizó sus experimentos con la viruela de las vacas, existían en Inglaterra hospitales de variación donde la gente asistía para adquirir la enfermedad y permanecía allí hasta su recuperación.

La variación se legitimó paulatinamente ante la comunidad médica aunque ya desde un tiempo atrás una variante de ésta formaba parte del saber popular de los pobladores rurales de Gran Bretaña. Estos pobladores habían notado que los granjeros expuestos a la viruela de las vacas no solían tener las típicas secuelas que la viruela humana dejaba en la

piel. Esta observación los llevó a emplear como inóculo para las prácticas preventivas el material proveniente de lesiones de vacas con viruela bovina [5].

El primer uso documentado de esta particular variolación se debe a Benjamin Jesty, un granjero del sur de Inglaterra que, habiendo experimentado él mismo la protección “accidental” por el contacto con el ganado bovino, inoculó con material de lesiones de una vaca a su familia, durante una epidemia en 1774.

Este saber tradicional fue transformado en un conocimiento científico en los términos de la ciencia de su época por Edward Jenner, un médico rural de Gloucestershire, Inglaterra. En 1798 Jenner publicó su *“Investigación sobre las causas y efectos de la Variolae Vaccinae, una enfermedad descubierta en el oeste de Inglaterra, en particular en Gloucestershire, conocida como la viruela de las vacas”* [6], asumiendo él mismo los costos luego de que su trabajo fuera rechazado por la Royal Society. En ese trabajo, Jenner describe 23 casos en los que la “variolación” con viruela de las vacas (desde entonces “vacunación”) había protegido efectivamente contra la viruela humana. Además de relevar epidemiológicamente varios casos de protección, Jenner da a conocer en este trabajo los resultados de sus propios experimentos [6]. El médico inglés demostró también que el material podía pasarse de “brazo en brazo” sin perder poder protector. Este hecho implicó un importante adelanto técnico, ya que entonces no sería necesario contar permanentemente con animales infectados para realizar las vacunaciones. Jenner dio así el sustento experimental que hacía falta para demostrar que la vacunación era un método más seguro que la variolación. El impacto de sus hallazgos fue inmediato, y el uso del procedimiento se extendió en pocos años desde Inglaterra al resto de Europa y a los -ya independientes- Estados Unidos. En 1803, ante las noticias de una nueva epidemia de viruela en Bogotá, el entonces Rey de España Carlos IV decidió enviar una expedición que se ocupara de la vacunación en las colonias. La expedición, a cargo del médico Balmis, transportó las pústulas entre vidrios y además llevó 20 niños huérfanos entre los cuales los médicos iban propagando la vacuna, pasándola de niño en niño, durante el viaje. Durante 3 años, la expedición vacunó desde los actuales territorios de Bolivia y Perú hasta lo que hoy es el sur de Estados Unidos, a más de 250.000 personas, la mayoría niños [7]. José Artigas, dentro de su vasto programa de transformaciones en lo que era en ese momento la Banda Oriental del Virreinato del Río de La Plata, realizó también campañas de vacunación a instancias del sacerdote Larrañaga [8].

A pesar de sus éxitos, la vacunación tuvo sus tempranos detractores de diversa índole. Entre ellos los médicos de Londres movilizados fundamentalmente por la potencial pérdida de ingresos, los religiosos temerosos de interferir en la voluntad divina, los maltusianos que

sostenían que la viruela tenía un rol de “control poblacional” sobre los sectores pobres¹, y también los científicos que se mostraban escépticos ante la efectividad del procedimiento o consideraban riesgoso inocular humanos con material proveniente de animales. Pese a ello, al término del siglo XIX, la vacunación había sustituido a la variolación oficialmente en varios países, y millones de personas habían sido vacunadas ya en Europa y América.

Tres ideas que confluyeron en el planteo de la teoría de los gérmenes

Una causa para cada enfermedad

La medicina previa a la revolución francesa consistía en una relación fuertemente individualizada médico-paciente. La examinación de los pacientes, usualmente de clase alta, no era habitual por considerarse ofensiva, y el diagnóstico se realizaba en base al aspecto general y a los síntomas observables con el paciente vestido, y tenía carácter individual. Según Waller [3], recién después de la revolución francesa las prácticas médicas comenzaron a cambiar, y los hospitales dejaron de ser un lugar de abandono donde los pacientes convivían hacinados y en pésimas condiciones de higiene. Las reformas hospitalarias iniciadas en París consistieron en mejoras en las condiciones generales de los hospitales, pero también llevaron a la profesionalización de los médicos. Estas reformas se extendieron al resto de Europa, y a partir de éstas se generalizó la examinación de pacientes y el estudio de cadáveres. Con el tiempo la observación de un gran número de casos que presentaban similitudes permitió la diferenciación de las enfermedades. Esto llevó a pensar que cada enfermedad podría ser una entidad distinta que tuviera su causa particular, en lugar de representar manifestaciones diferentes de una misma causa. Esta idea de que cada enfermedad tenía una causa particular era difícil de explicar desde el marco de la teoría miasmática.

El contagio directo

Otra idea también contraria a la influencia de los miasmas, que convivía con ella, era la evidencia del contagio de persona a persona. La primera enfermedad para la cual el contagio entre personas se hizo evidente fue la plaga o peste bubónica. El carácter transmisible de esta enfermedad se confirmó epidemia tras epidemia y originó la práctica de separar a los enfermos de las ciudades. El carácter contagioso de esta enfermedad estaba establecido hasta tal punto que sirvió también de sustento al desarrollo de rudimentarias armas biológicas, que consistían en cadáveres de víctimas de la peste que eran catapultados por sobre los muros de las ciudades sitiadas.

¹ Thomas Malthus publicó en 1798 su obra “Ensayo sobre los principios de la población”, que tuvo un gran impacto en las ideas de la época. Dentro de las ciencias de la vida, el ejemplo más conocido de esta influencia es el rol asignado a la competencia por Charles Darwin en su teoría de la evolución.

La aparición en Europa de la sífilis, traída de América por los colonizadores españoles, constituyó otro claro ejemplo donde el contagio entre personas era evidente. Algo similar ocurrió con la viruela, cuyas primeras epidemias en Europa coinciden con el regreso de los cruzados desde Oriente. En contra de la teoría del miasma Girolamo Fracastoro (1478-1553), propuso que las enfermedades eran causadas por partículas a las que denominó *Seminaria contagionis*. Estas partículas, que eran demasiado pequeñas para ser visibles, podían pasar de individuos enfermos a individuos sanos [2]. Sus ideas resultaron adelantadas no solo a las teorías del momento, sino también a los instrumentos necesarios para ponerlas a prueba.

En 1840, el médico húngaro Ignaz Semmelweis retomó esta teoría en sus trabajos sobre la fiebre puerpérica. La teoría del contagio era especialmente apropiada para analizar las muertes por esta infección ya que se observaba que en las mismas ciudades existían médicos con un alto número de muertes maternas posparto y médicos que tenían una incidencia de muertes mucho menor. Semmelweis dedujo que eran los médicos quienes producían el contagio, una idea que –por supuesto- no cayó nada bien entre sus colegas. Basándose en la idea de la transmisión, Semmelweis instauró el lavado de materiales y la desinfección de manos entre los médicos que formaban su equipo de trabajo, en el servicio de obstetricia de un hospital de Viena. Esto redujo los índices de mortalidad posparto a la cuarta parte en un año. Sin embargo, por motivos personales y políticos Semmelweis, tuvo que abandonar Austria lo cual llevó a que esta práctica no se difundiera [9].

En la misma época pero en Inglaterra el médico John Snow –quien sería considerado el padre de la epidemiología- llegó a la conclusión de que el cólera era transmitido por el agua contaminada. Con su investigación sobre el cólera, además de aportar evidencias definitivas en contra de la teoría del miasma, Snow instauró un método de trabajo. Recorrió innumerables fuentes bibliográficas y recopiló una gran cantidad de datos que dieron sustento a su idea de que el contagio se daba entre individuos, y no a través del agua únicamente. Para esto registró temporalmente la aparición de casos secundarios a un caso inicial. En base a su modelo, explicó las mayores tasas de contagio observadas entre quienes vivían en condiciones de hacinamiento o trabajaban en las minas de carbón comiendo y defecando en precarias condiciones de higiene [10]. Una vez concluido su copioso trabajo de recopilación, durante una epidemia de cólera en 1854, Snow llevó a la práctica su teoría. Trabajando en el lugar del brote, registró las viviendas donde se presentaban los casos y mostró que se trataba de casas cercanas entre sí. Los pobladores de esta zona de Londres colectaban el agua de una estación de bombeo que, a su vez, la tomaba río abajo de una vertiente de residuos cloacales. Snow recomendó anular esa estación, así como hervir el agua antes de ingerirla, entre otras medidas de higiene, y logró como resultado frenar la epidemia. La demostración del contagio de persona a persona, así como la imputación del

agua como fuente de contagio, marcaron el fin de la teoría del miasmática y el comienzo de prácticas preventivas que salvarían a millones de vidas.

Aunque Snow observó la presencia de unos “flóculos blanquecinos” en el agua contaminada a los que les atribuyó el contagio de la enfermedad, no pudo obtener pruebas contundentes de que esto fuera así. La comprobación de que los microorganismos eran capaces de provocar infecciones vendrían unos años más tarde.

Microorganismos, fermentación y enfermedad

Un tercer aporte decisivo al planteo de la teoría del germen provino del descubrimiento de los microorganismos y su vinculación con los procesos fermentativos realizado por Louis Pasteur. El científico francés trabajaba en una zona de viñedos del sur de Francia, y conocía los procesos de fermentación que ocurrían en la fabricación del vino. En 1857 diseñó una serie de experimentos en los que midió el consumo de azúcar y el aumento en biomasa de las levaduras que cultivaba en soluciones de azúcar y amoníaco. Demostró – como se proponía- que la fermentación se debía a microorganismos vivos, y no a factores químicos como sostenían otros investigadores. Más aún, Pasteur reconoció distintas formas de microorganismos, y demostró que cultivos puros de cada uno de ellos producían en el vino y la cerveza alteraciones distintas. En una publicación de 1859 sobre la fermentación, proponía la hipótesis de que las enfermedades contagiosas podrían deberse -por analogía- a microorganismos específicos. En 1864 y ya establecido en París, Pasteur demostró en una serie de cuidadosos experimentos que la fermentación era causada por microorganismos, y que podía evitarse la descomposición esterilizando cuidadosamente los líquidos² [11].

En poco tiempo estos descubrimientos originaron numerosas mejoras técnicas, entre ellas la “pasteurización” de los alimentos, y la desinfección de heridas y del material quirúrgico promovida por Joseph Lister en Inglaterra. La demostración por Pasteur de que cada uno de los tipos de fermentación conocidos (fermentación ácida o alcohólica, por ejemplo) era causada por microorganismos específicos fue extendida a la teoría del germen, donde a cada enfermedad correspondería un microorganismo que la causara.

Enunciación de la teoría de los gérmenes

Robert Koch era un médico alemán nacido 21 años después que Pasteur, que comenzó sus trabajos sobre ántrax luego de mudarse –buscando trabajo como médico particular- a una zona de Alemania donde el ántrax era una enfermedad endémica del ganado ovino. En

² En esta famosa conferencia Pasteur utilizó este resultado como una prueba a favor de su concepción creacionista de la vida, en contra de la generación espontánea. Si la vida no podía surgir espontáneamente, entonces debía haber sido creada por Dios. Quienes sostenían la existencia de la generación espontánea –y fueron derrotados en este debate- eran los mecanicistas encabezados por Félix Pouchet. Oponiéndose a la idea de que Dios hubiera creado la vida de una vez y para siempre, sostenían que ésta, en cambio, surgía permanentemente siempre que las condiciones se lo permitieran.

1876 Koch había logrado aislar el bacilo y observar la formación de esporas bajo la lente de su microscopio. A partir de la aparición de estas formas resistentes a la desecación, Koch explicó los focos de ántrax que se observaban de tanto en tanto en los lugares infectados. Después de este éxito inicial, Koch se dedicó a identificar los agentes causales de otras enfermedades, y la generalización de su experiencia tomó la forma de sus famosos postulados. Según Koch, para la demostración de que un microorganismo era el agente causal de una enfermedad éste debía encontrarse en los tejidos de todos los animales infectados, debía poder aislarse y cultivarse *in vitro*, producir la misma enfermedad al ser inoculado en animales sanos, y poder a su vez aislarse de éstos.

A lo largo de sus trabajos el grupo de Koch introdujo adelantos técnicos de enorme utilidad. Uno de ellos fue el uso de medios sólidos para el cultivo de bacterias, que hasta entonces se hacía en medio líquido y era sujeto de numerosas complicaciones a causa de la contaminación. El cultivo en medio sólido permitió, además, observar por primera vez las características colonias bacterianas, cuyo aspecto permitía distinguir las bacterias entre sí. También en esos años, aprovechando la reciente disponibilidad de numerosas tinturas usadas en la industria textil, el grupo de Koch introdujo la tinción de preparados microscópicos. El uso de las tinciones permitió diferenciar clases de patógenos en base a la coloración que adquirirían y también identificar por primera vez algunas bacterias difícilmente observables en una preparación directa.

La teoría del germen quedó formalmente establecida por Koch, aunque su aceptación por la comunidad científica demoraría algunos años y se iría dando en una serie de batallas, enfermedad por enfermedad. La enunciación de los postulados de Koch constituyó de hecho la base de un programa de investigación que perseguía –y en buena medida logró– la identificación de los microorganismos causantes de todas las enfermedades. En pocos años el propio grupo de Koch identificó los agentes causales de varias infecciones, entre ellas la tuberculosis y el cólera.

Las vacunas de laboratorio

Trabajando en el marco de la hipótesis sobre el origen microbiológico de las enfermedades, los grupos de Pasteur -en Francia- y de Koch -en Alemania- se abocaron a la búsqueda e identificación de agentes infecciosos con intención de encontrar formas de prevenir las enfermedades. Los frutos de estos intentos llegaron durante la década de 1880. Como veremos el desarrollo de las primeras vacunas de laboratorio como estrategia de prevención contra las enfermedades responde a la historia de estos dos grupos de investigación, que en el contexto de post-guerra entre los países a los que pertenecían mantuvieron una fuerte rivalidad.

Vacunas con microorganismos atenuados

En su búsqueda de nuevas formas de prevenir las enfermedades, Pasteur se abocó en primer lugar a una enfermedad veterinaria, el cólera de las gallinas. El agente que causaba esta infección (la bacteria hoy denominada *Pasteurella multocida*) había sido aislado por Toussaint –uno de sus “rivales” científicos- en 1879. Pasteur, junto a su colaborador Chamberland, habían desarrollado un medio adecuado en el cual cultivar la bacteria *in vitro*. Emile Roux, también integrante del equipo de Pasteur, observó por su parte que los cultivos expuestos al oxígeno durante cierto tiempo perdían su efecto letal sobre los pollitos con los que experimentaban. Más aún cuando re infectaban a estos mismos pollos con cultivos frescos de *Pasteurella*, comprobaron que no desarrollaban la enfermedad ya que se habían vuelto inmunes.

Pasteur concluyó que en el medio de cultivo se había producido una atenuación espontánea, tras la cual la bacteria había perdido su letalidad, pero no su capacidad de conferir inmunidad. La idea de atenuación artificial ampliaba el enfoque *jenneriano* de los organismos naturalmente atenuados a todos los microorganismos cultivables.

Entre 1880 y 1881 Pasteur dirigió sus esfuerzos a prevenir el carbunco ovino o ántrax, causado por el bacilo aislado por Koch. A pesar de los avances en el conocimiento realizados por Koch, había quienes cuestionaban aún la idea de que el ántrax era causado por un microorganismo. Mientras Pasteur y su grupo desarrollaban la vacuna, un veterinario contrario a la teoría del germen desafió a Pasteur a que probara públicamente la capacidad protectora de su vacuna. Pasteur aceptó el reto, con la idea de probar tanto que la enfermedad era causada por el bacilo de Koch como que él podría prevenirla vacunando a las ovejas.

Así en Pouilly-le-Fort, una granja al sur de París, Pasteur y su equipo realizaron un famoso ensayo a campo vacunando con el bacilo atenuado a un grupo de 24 ovejas. Como control utilizaron otro grupo de ovejas similar en número pero al que no inmunizaron con la vacuna en cuestión. Todas las ovejas control tras ser desafiadas con el agente causal de la enfermedad murieron, incluso dos de ellas delante de los espectadores [12]. En cambio, todas las ovejas vacunadas sobrevivieron excepto una, que murió por causas no relacionadas al experimento. Como resultado de este exitoso ensayo, la vacuna de Pasteur comenzó a usarse masivamente en Francia, aunque requirió mejoras (que mencionaremos más abajo) décadas más tarde [13].

Tal vez la más resonante de las vacunas desarrolladas por el grupo de Pasteur fue la de la rabia, desarrollada en 1884. Siguiendo la línea de razonamiento de sus anteriores trabajos, Pasteur buscaba atenuar el agente causal, que en este caso no se conocía aún, y sería identificado como un virus recién en el siglo XX. Ante la imposibilidad de cultivar *in vitro* el

microorganismo, Pasteur lo reproducía en animales. El método de atenuación finalmente utilizado consistió en desecar en aire seco el material de medula espinal de conejos infectados. Tras algunos experimentos en perros en los que incluyó más de 50 animales, Pasteur en 1885 decidió aplicar en forma experimental la vacuna en humanos. Inoculó durante dos semanas a un niño de 9 años que había recibido varias mordeduras de un perro rabioso, con preparaciones progresivamente menos atenuadas. El niño se recuperó después de tres semanas. Ese mismo año, Pasteur trató exitosamente a otro chico de 15 años, que había sido mordido por un perro cuando defendía a otros niños. Este caso resultó ser más mediático que el anterior y ello desencadenó la llegada de pacientes de distintos lugares de Europa para someterse a su tratamiento.

Desde el punto de vista científico, estas experiencias aisladas resultaban difíciles de evaluar, entre otros motivos porque en los ataques por animales rabiosos no se siempre se transmite la enfermedad. Por otro lado, cuando el tratamiento no era efectivo, no podía descartarse que no hubiera sido incluso la causa misma de la muerte. El propio prestigio de Pasteur fue lo que garantizó la continuidad de los tratamientos, y para 1898 el Instituto Pasteur reportaba 96 muertes sobre 20.166 tratamientos realizados [13].

Vacunas en base a microorganismos inactivados

El siguiente avance conceptual con impacto en el desarrollo de las vacunas fue el reconocimiento de que los microorganismos no replicativos inactivados, ya sea por calor o por medios químicos eran capaces también de inducir una respuesta protectora. El desarrollo experimental de estas vacunas a microorganismos inactivados ocurrió casi en forma simultánea a la de las vacunas a microorganismos atenuados, por involucrar pasos metodológicos comunes. Sin embargo, su aplicación práctica llegó unos años más tarde.

Así a fines del siglo XIX se lograron diseñar vacunas inactivadas contra tres enfermedades de altísima prevalencia en las condiciones de vida de esa época: el cólera, la fiebre tifoidea, y la plaga o peste bubónica.

Jaime Ferran fue quien primero desarrolló una vacuna contra el cólera, la cual fue aplicada en España sin realizar ensayos clínicos previos. Esta preparación sin embargo fue desprestigiada por una comisión del Instituto Pasteur por encontrarla insegura y con elevada reactogenicidad. Intentos posteriores por parte de Haffkine en la India y de Kolle en Japón lograron preparaciones que resultaron menos reactogénicas. La efectividad de estas vacunas era de alrededor del 70-80% en adultos, pero sensiblemente menor en niños menores de 5 años.

Con una estrategia similar, el propio Haffkine desarrolló una vacuna para la plaga durante sus años de trabajo en India en donde la enfermedad era endémica. El

microorganismo causante de la enfermedad, la bacteria *Yersinia pestis*, había sido aislado independientemente por Kitasato y Yersin en 1894.

Las vacunas contra la fiebre tifoidea, causada por *Salmonella typhi*, fueron desarrolladas independientemente por los grupos de Koch en Alemania (del cual uno de sus miembros había logrado identificar al microorganismo) y Wright en Inglaterra. Estas vacunas mostraron una efectividad de entre el 79 y el 88% [14].

Vacunas a subunidades. Toxinas, antitoxinas y toxoides

También en la década de 1880 se identificaron como responsables de ocasionar enfermedades a proteínas con actividad tóxica (toxinas). Las primeras toxinas identificadas fueron la diftérica y la tetánica, descubiertas por Kleb en 1884 y Faber en 1890 respectivamente.

Ese mismo año, Kitasato y von Behring descubrieron que el suero de animales enfrentados a los bacilos diftérico o tetánico tenía –al transferirlo a otros animales- actividad antitoxina. A esta técnica que se la denominó terapia con suero, hoy se la conoce como protección pasiva. El tratamiento se comenzó a probar transfiriendo suero ovino o equino a humanos que presentaran síntomas de estas enfermedades con resultados exitosos, ya que se logró hasta un 50% de disminución en la mortalidad de la difteria [15].

En los años siguientes las mejoras pasaron por la estandarización de la producción y la valoración del producto obtenido. Sin embargo, pronto se reconocieron las limitaciones del tratamiento con sueros: por un lado el efecto duraba sólo unas cuantas semanas, razón por la cual no podía usarse con carácter preventivo. Por otro lado, el tratamiento no era totalmente inocuo ya que en algunos casos ocasionaba la llamada “enfermedad del suero”, una reacción que hoy sabemos era provocada por la inoculación de proteínas presentes en el suero animal.

La inoculación directa de toxinas en humanos no resultaba segura, e incluso en los animales usados para la producción de antisueros la inoculación se hacía acompañada de una cantidad de antisuero para que la misma no ocasione efectos adversos graves. Aunque desde 1907 se sabía que los toxoides (toxinas inactivadas) podían usarse para obtener sueros antitoxina en cobayos, recién en 1923 Gaston Ramon en el Instituto Pasteur logró –por medio de una detoxificación con formalina y calor- una preparación lo suficientemente segura para su uso en humanos. Sin embargo, este éxito se acompañó de una disminución de las características inmunogénicas de la proteína toxoide. Para mejorar la respuesta inmune los investigadores trabajaron en la idea de volver las toxinas “más insolubles” de forma de generar una respuesta inflamatoria en el sitio de la inyección. Para ello comenzaron a probar diversos agregados en las preparaciones como por ejemplo distintas sales, almidón, metales, etc. Este proceso culminó en 1926 con la adopción de las sales de

aluminio como agentes que mejoran la respuesta inmune, hoy conocidos como adyuvantes. El uso de las vacunas a toxoides con el agregado de adyuvantes se masificó después de la segunda guerra mundial, en la cual demostraron una alta efectividad. En 1944 se formularon en conjunto los toxoides tetánico y diftérico con el componente pertussis, a instancias de Kendrick y Elderling en Estados Unidos, dando origen a la vacuna DTP (Difteria, Tétanos, Pertussis) sobre la que nos extenderemos hacia el final de esta sección [15].

Las vacunas en el Siglo XX

El breve repaso que hemos hecho de la historia de las primeras vacunas muestra el abordaje inicialmente empírico de la vacunación, que luego fue seguido por el posterior desarrollo de una teoría, la teoría del germen, que dio coherencia a la experiencia que se tenía, y permitió a su vez extenderla y generalizarla a otros patógenos. Ilustra también la relación entre los desarrollos aplicados en la formulación de vacunas con el avance del conocimiento en microbiología e inmunología.

Esta secuencia en el desarrollo y diseño de vacunas se vio profundizada en los períodos posteriores. En la Tabla 1 incluimos las vacunas hasta aquí mencionadas, junto con las vacunas actualmente en uso. Un recorrido cronológico por la tabla muestra que este primer grupo de vacunas, a excepción de las de la rabia y la viruela, son vacunas bacterianas formuladas a partir de microorganismos atenuados o inactivados. Las vacunas de la tos convulsa y el carbunco son de alguna manera integrantes tardíos de este grupo de vacunas, la primera por las dificultades que presentó su estandarización y la segunda porque no fue considerada necesaria para humanos hasta que los intereses militares posteriores a la segunda guerra mundial así lo determinaron [16].

El descubrimiento de los virus como causantes de enfermedades demoró varios años a partir de las primeras observaciones que sugerían su existencia. Esto pudo deberse en parte a que estos patógenos no cumplen con los postulados de Koch, que resultaron ser muy influyentes ya al poco tiempo de haber sido formulados. Las primeras evidencias sobre la existencia de patógenos no bacterianos fueron obtenidas por Mayer en 1882, un investigador alemán que trabajaba en Holanda sobre la enfermedad del mosaico en plantas de tabaco. Durante los siguientes 30 años se reconocieron características como el parasitismo obligado de estos patógenos, su tamaño mucho menor al de las bacterias y su vinculación con muchas infecciones de plantas, animales y humanos. Hacia fines de los años 1920 se conocían varias decenas de enfermedades causadas por virus que mantenían la virulencia luego de pasar por filtros que retenían a las bacterias y que podían transmitirse por inoculación de material infectado. Aunque los investigadores podían propagar estas enfermedades entre plantas y animales, estos sistemas no resultaban aptos para obtener

preparaciones seguras en las cantidades necesarias como para formular vacunas. La existencia de sistemas donde reproducir los virus era una importante limitación, que comenzó a superarse a partir del descubrimiento, en 1931, de que los virus podían reproducirse en tejido embrionario [17]. Esta metodología permitió años más tarde el desarrollo de vacunas contra la Influenza y la Fiebre amarilla.

Año	Enfermedad	Organismo usado como inmunógeno/fuente de antígenos	Virus Bacteria	Tipo de vacuna
1798	Viruela	Virus vaccinia		microorganismo vivo
1885	Rabia	Virus rábico		microorganismo inactivado
1894	Colera	<i>Vibrio cholerae</i>		microorganismo inactivado
1896	Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>		microorganismo inactivado
1897	Plaga o peste bubónica	<i>Yersinia pestis</i>		microorganismo inactivado
1921	Tuberculosis	Bacillo Calmette Guérin		microorganismo atenuado
1928	Difteria	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>		toxoide
1930s	Fiebre amarilla	Virus de la fiebre amarilla		microorganismo atenuado
1933	Tétanos	<i>Clostridium tetani</i>		toxoide
1940s	Influenza	Virus de la Influenza A y B		microorganismo inactivado
1940s	Tos convulsa	<i>Bordetella pertussis</i>		microorganismo inactivado
1954	Carbunco humano	<i>Bacillus anthracis</i>		microorganismo atenuado
1955	Poliomielitis	Poliovirus tipos 1, 2 y 3		microorganismo atenuado
1958	Enfermedad respiratoria adenoviral aguda	Adenovirus tipos 4 y 7		microorganismo vivo
1963	Sarampión	Virus del Sarampión		microorganismo atenuado
1967	Paperas	Virus de las Paperas		microorganismo atenuado
1969	Rubeola	Virus de la Rubeola		microorganismo atenuado
1972	Carbunco humano	<i>Bacillus anthracis</i>		antígeno purificado
1980s	Tos convulsa	<i>Bordetella pertussis</i>		antígenos purificados
1986	Hepatitis B	Virus hepatitis B		antígenos recombinantes
1987	Infecciones por Hemophilus	<i>Hemophilus influenzae B</i>		Polisacáridos conjugados
1995	Varicela	Virus Varicella-Zoster		microorganismo atenuado
1995	Hepatitis A	Virus hepatitis A		microorganismo inactivado
1998	Encefalitis japonesa	Virus encefalitis japonesa		microorganismo inactivado
1999	Infecciones por Meningococo	<i>Neisseria meningitidis A, C, W135, Y</i>		Polisacáridos conjugados
2000	Infecciones por neumococo	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		Polisacáridos conjugados
2004	Gastroenteritis viral	Rotavirus		Rearreglo en base a virus humano y bovino
2007	Papiloma humano	Virus papiloma humano		agregado similar al virus en base a antígenos recombinantes

Tabla 1. Cronología del desarrollo de vacunas bacterianas y virales de uso humano.

Luego de estas dos experiencias iniciales, el desarrollo de las vacunas virales tomó un nuevo ímpetu a partir de otro avance metodológico: el descubrimiento de que el virus de la poliomiélitis podía cultivarse en tejido no neurológico que hasta ese momento era la única posibilidad. Este procedimiento llevaba, además, a la atenuación del virus. La nueva metodología revolucionó la vacunología de virus, y permitió en pocos años el desarrollo de las vacunas contra poliomiélitis, paperas, rubéola y sarampión (Tabla 1)[18].

A partir de los años 1980, y siempre refiriéndonos a las vacunas virales, encontramos la primera vacuna recombinante, contra la Hepatitis B. Esta vacuna está compuesta por un antígeno originalmente identificado en el plasma de pacientes infectados. El plasma era la fuente de antígenos para la preparación de la vacuna antes del advenimiento de las técnicas

de biología molecular. Sin embargo la formulación vacunal realizada a partir del antígeno recombinante resultó menos riesgosa (en esos años se detectaban los primeros casos de SIDA) y también más económica [19].

Por algunos años más, las técnicas tradicionales de inactivación o atenuación y el abordaje por ingeniería genética coexistieron dando lugar a vacunas de ambos tipos. El desarrollo de la vacuna contra la Hepatitis A ejemplifica esta transición. Cuando se decidió desarrollar esta vacuna, se emprendieron en paralelo ambas alternativas, y la vía de la biología molecular falló por cuestiones de conformación de los antígenos obtenidos como proteínas recombinantes. Posteriormente mediante cambios en el sistema de expresión de los antígenos se lograron preparaciones recombinantes protectivas, aunque éstas no llegaron a comercializarse. En cambio, la vacuna contra el virus del papiloma humano (hasta ahora no cultivable) licenciada en 2007 consiste en una proteína recombinante que se agrega en forma de partículas viroides. Estas partículas adoptan una estructura similar a la cubierta del virus, aunque sin material genético en su interior [18].

En cuanto a las enfermedades bacterianas, podemos ver en la Tabla 1 que no hay desarrollos basados en microorganismos inactivados posteriores al año 1954. Las vacunas bacterianas aprobadas después de 1990 están compuestas por antígenos purificados, los polisacáridos de cápsula bacteriana. La conjugación de estos antígenos con proteínas (usualmente los toxoides diftérico o tetánico) permitió la inducción de una respuesta mediada por los linfocitos T, más potente y duradera que la respuesta T independiente de que son objeto normalmente los polisacáridos.

Además de las vacunas contra pertussis, a las que nos referiremos más abajo, el caso de las vacunas contra el ántrax o carbunco son un ejemplo de los distintos abordajes en vacunología a lo largo del tiempo. La primera vacuna, desarrollada por Pasteur, consistía en el bacilo de Koch atenuado por su repetido cultivo a 42°C. En los años 1930 se desarrolló en Sudáfrica una vacuna también destinada a la vacunación de ganado, a partir de bacilos no encapsulados que resultaban avirulentos. Esta forma del bacilo se obtenía a partir de cultivos en un 30% de CO₂. Pero aún esta variante se consideraba aún peligrosa para su uso en humanos, y a partir de los años 1950 –cuando las vacunas en humanos se consideraron importantes- se desarrollaron distintas variantes de filtrado y purificación del llamado antígeno protector del bacilo, a partir de cultivos del mismo [16]. Actualmente en Estados Unidos, dentro de un programa de investigación referido a armas biológicas (BioShield project) se buscan desarrollar vacunas contra este patógeno usando como inmunógenos proteínas recombinantes [20].

En resumen, podemos decir que a lo largo del siglo XX la vacunología ha realizado un tránsito paulatino desde la utilización de microorganismos completos al uso de antígenos definidos, obtenidos a partir de cultivos del patógeno o bien mediante el empleo de la

metodología del ADN recombinante. Esta tendencia es particularmente clara para los patógenos bacterianos, pero se da también entre las vacunas virales, de desarrollo más reciente.

Como veremos en una sección posterior, al presentar la vacunología reversa, la identificación de estos antígenos puede hacerse mediante la exploración de la gran cantidad de secuencias genómicas disponibles a partir de la introducción de las técnicas de secuenciamiento de ADN, y de una serie de metodologías asociadas a ésta. Estos recursos resultan especialmente interesantes para los patógenos bacterianos, que normalmente poseen genomas con varios miles de secuencias codificantes algunos de los cuales pueden ser potenciales inmunógenos.

Vacunas contra *B. pertussis*

Tratándose del tema de esta Tesis, hemos dejado para un apartado especial la historia de las vacunas contra *Bordetella pertussis*, para exponerla con algo más de detalle.

El agente causal de la tos convulsa, la bacteria *B. pertussis*, había sido observado en tejidos previamente, pero recién en 1906 Jules Bordet y Octave Gengou lograron aislarlo y vincularlo con la enfermedad, cuando ambos trabajaban en el Instituto Pasteur [21]. Poco tiempo después comenzaron los intentos por desarrollar vacunas contra este microorganismo, presumiblemente a cargo de los mismos investigadores. La metodología utilizada era algo variable, e implicaba inactivar la bacteria por calor y luego someter estas preparaciones a una detoxificación con agentes químicos. Desde un comienzo, estas metodologías mostraron no ser totalmente reproducibles. Aunque en los años 1920 existían vacunas comercializadas por varios laboratorios, su utilidad era muy cuestionada: en 1931 la Asociación Médica Americana estadounidense declaró que las vacunas contra pertussis (licenciadas desde 1914) parecían no tener absolutamente ninguna influencia en el desarrollo de la enfermedad [22].

Los primeros ensayos clínicos exitosos con esta vacuna fueron realizados por el investigador danés Madsen durante un brote en la Islas Faroe, pertenecientes en ese momento al reino de Dinamarca (1923-1924). Estos ensayos permitieron comprobar la efectividad de la vacuna aunque también registraron por primera vez sus efectos adversos (Madsen reportó 2 muertes 48hs después de aplicada la vacunación). Al avanzar el conocimiento microbiológico sobre *B. pertussis*, se describieron 4 fases antigénicamente distintas [23], y se atribuyó la potencialidad de infectar humanos a las bacterias en la Fase 1. Haciendo uso de este conocimiento Louis Sauer entre 1928 y 1933 formuló y probó una vacuna más potente en la que incluyó cepas en fase I recientemente aisladas y de cultivos fuertemente hemolíticos. Esta vacuna fue probada en 1.300 niños en Estados Unidos,

vacunando a la mitad de ellos y desafiando luego al conjunto con la bacteria viva por vía intranasal. Sauer incluyó en este ensayo a sus 4 hijos, dos de ellos en cada grupo. Luego del desafío, solamente los niños no vacunados desarrollaron la infección [15].

Pearl Kendrick y Grace Elderling comenzaron sus estudios sobre pertussis en 1932 en Michigan, Estados Unidos, a raíz de un brote ocurrido en esta misma localidad. Ambas formaban parte en ese momento del laboratorio de salud pública. La estrategia con la que abordaron el problema podría considerarse hoy una estrategia integral que excedió el ámbito del laboratorio de investigación. Durante varios años se esforzaron por generar contactos con los médicos locales y con la propia comunidad, con la idea de convencer a los primeros de la necesidad de aislar las cepas circulantes, y de generar conciencia social sobre la importancia de los ensayos clínicos. Durante los años 1930 llevaron adelante varios ensayos clínicos rigurosamente diseñados, en los que establecieron los niveles de protección de las vacunas por ellas mismas desarrolladas. Estas vacunas estaban formuladas en base a una mezcla de cepas locales recientemente aisladas. En base al trabajo hecho con la comunidad, por primera vez los ensayos clínicos se hicieron en la población general, y no en niños institucionalizados o población carcelaria, como era muy común hasta ese momento [22].

Entre los logros de Kendrick y su equipo figura también el desarrollo en 1946 de un test que emplea un modelo de protección en ratones para evaluar la potencia de la vacuna. Este test correlaciona con la protección en humanos y por ello continúa utilizándose [24].

En el contexto de una vacuna cuya eficacia debía ser demostrada, el trabajo de estas investigadoras consistió en una rigurosa sistematización que llevó finalmente a la aceptación de sus resultados por parte de la comunidad científica. Sus ensayos fueron revisados por numerosos especialistas, muchas veces escépticos ante la mala performance previa de las vacunas contra pertussis. Los resultados alcanzados con esta formulación fueron satisfactorios, y así para el año 1940 la vacuna de Kendrick y Elderling comenzó a usarse masivamente en Estados Unidos. La vacuna mostró muy buenos resultados, bajando 20 veces la incidencia de la enfermedad para 1960. A partir de los años 1950 muchos países centrales adoptaron estas vacunas en la forma de vacunas que combinaban antígenos de difteria, tétanos y pertussis (DTP). En los lugares en que se aplicaron la incidencia de la enfermedad bajó en forma contundente [15].

Sin embargo, las preocupaciones alrededor de la seguridad de esta vacuna persistieron, y se hicieron notorias cuando el número de casos había ya disminuido, y con ellos la importancia de la enfermedad a los ojos de la opinión pública.

Hacia fines de los años 1940, cuando aparecieron los primeros reportes que vinculaban la vacunación con la aparición de complicaciones, se recomendó en Estados Unidos no vacunar con la vacuna DTP a chicos con problemas neurológicos de base, cuando

aparecieron los primeros reportes que vinculaban la vacunación con la aparición de estas complicaciones. En Inglaterra, la prensa escrita desde los 1970 se ocupó intensamente del tema, y en Estados Unidos en 1982 surgió incluso un programa televisivo llamado “DTP: Vaccine Roulette”. En estos y otros países se formaron asociaciones de padres, que en algunos casos reclamaban la total suspensión del uso de esta vacuna, y los gobiernos establecieron fondos compensatorios para quienes sufrieran algún efecto adverso al ser vacunado [25]. En Japón, tras la muerte de dos chicos poco tiempo después de ser vacunados, el uso de la vacuna se suspendió temporalmente y, aunque ésta se desestimó como causa de las muertes, quedó fuertemente cuestionada. La suspensión de la vacunación en Japón tuvo como consecuencia que ese país pase de tener 393 casos –ninguno fatal- en 1974, a más de 13.000 casos con 41 muertes en 1979. En 1975 Suecia suspendió también la vacunación, con resultados epidemiológicos muy similares [26]. Sin llegar a suspenderse completamente, a causa de las campañas anti vacunación, la cobertura en Inglaterra llegó a ser del 30%, y también allí se registró un importante aumento en el número de casos [27].

Al momento de establecer los fondos compensatorios en 1986, el congreso de Estados Unidos encargó un informe sobre los efectos adversos de esta vacuna. Durante 1990 un comité que trabajó en el tema produjo un informe, titulado “Adverse Effects of Pertussis and Rubella Vaccines” [25], en el que revisó la bibliografía sobre el tema y estudió la relación entre la aplicación de las vacunas de células completas (o celulares) con 20 supuestos efectos adversos. Los hallazgos de este informe –que repasaremos brevemente- pueden ayudar a esclarecer la situación de las vacunas celulares contra pertussis. Se incluyeron en el mencionado estudio, entre otros, los siguientes efectos adversos: daño neurológico crónico, problemas de aprendizaje o atención, anemia hemolítica, trombocitopenia, síndrome de Guillain-Barré, encefalopatía aguda, anafilaxis, shock, llanto inconsolable, espasmos y muerte súbita. Los autores de esta revisión dividen sus conclusiones por categorías. La primera de ellas incluye los efectos adversos para los cuales encontraron que la información no era suficiente ya sea para establecer o desestimar una relación causa-efecto. Esta primera categoría incluye la mayoría de los efectos adversos revisados. En una segunda categoría, incluyen aquellos efectos adversos en que la evidencia estudiada permite desvincular la aplicación de las vacunas de los mismos: los espasmos infantiles y la muerte súbita. En el caso del shock y la encefalopatía aguda, la evidencia resultó para los autores consistente con una causalidad, aunque insuficiente para establecerla. Por último, en este informe se afirma que la evidencia indica una relación causal entre la vacunación y la anafilaxis, así como entre la aplicación del componente pertussis de la vacuna y el llanto inconsolable [25]. En resumen podríamos decir que si bien el informe descarta o no es concluyente sobre la causalidad de los efectos más graves, el perfil de reactogenicidad de esta vacuna es controvertido.

Hacia fines de los años 1970, el avance de la microbiología y la biología molecular había permitido identificar y caracterizar algunos de los principales factores de virulencia de *B. pertussis*: la toxina pertussis (PT, inicialmente llamada factor promotor de la linfocitosis); los aglutinógenos (o fimbrias); y la hemaglutinina filamentosa (FHA) (ver Recuadro 1 al final de esta sección). Margaret Pittman, compañera de trabajo de Kendrick y Elderling, había hipotetizado que la enfermedad era en buena medida causada por el efecto de toxinas, y que por lo tanto podría intentarse una vacuna a toxoides, similar a las existentes para tétanos y difteria. Poco tiempo después de haber suspendido la vacunación en 1975, comenzaron en Japón los desarrollos que llevaron a una nueva generación de vacunas en línea con la propuesta de Pittman. Estas formulaciones eran preparadas por el grupo de Yuji Sato a partir de componentes purificados de un cultivo de *B. pertussis* [28]. Inicialmente constituidas por uno, dos o cuatro componentes, fueron modificadas luego para incluir la adhesina pertactina. Este tipo de vacunas, llamadas acelulares, son las que se usan actualmente en la mayoría de los países centrales, y de la cual se ha incorporado una dosis en el Calendario Nacional de Vacunación Argentino para los adolescentes de 11 años de edad y el personal de salud.

La efectividad de estas vacunas fue probada en varios ensayos clínicos en distintos países. Aunque los ensayos entre sí son muy difíciles de comparar fundamentalmente a raíz de las distintas definiciones de caso adoptadas en cada estudio, el consenso general es que las vacunas acelulares de mayor número de componentes mostraron una eficacia al menos similar a la de las vacunas a células completas [26].

Hasta aquí hemos hecho una revisión de la historia de la vacuna contra pertussis y los problemas asociados a la seguridad de la misma. A pesar de existir vacunas disponibles, algunos aspectos de esta enfermedad siguen sin resolverse. A esto vamos a referirnos en la próxima sección.

Recuadro 1. Factores de virulencia de *B. pertussis*

Como muchos otros patógenos bacterianos *B. pertussis* expresa una serie de factores involucrados en la interacción patógeno – huésped denominados factores de virulencia, caracterizados por cumplir distintas funciones que contribuyen al establecimiento o mantenimiento de la infección. Entre los factores de virulencia conocidos en *B. pertussis* se encuentran adhesinas que le permiten al patógeno sobrevivir en el tracto respiratorio del huésped al mediar la adhesión a distintas poblaciones celulares [29-36], proteínas relacionadas a la resistencia de *B. pertussis* a la lisis por el sistema del complemento [37-39], y toxinas conocidas por contribuir a la patogénesis [32, 40-42] y por estar involucradas en la protección o evasión de la respuesta inmune [43-45]. Como haremos mención a algunos de estos factores de virulencia a lo largo de este trabajo, resumimos en esquema a continuación algunas de sus principales características.

La **hemaglutinina filamentosa (FHA)** es una proteína de 220 kDa y estructura filamentosa, considerada la principal adhesina sintetizada por *B. pertussis*. FHA ha sido involucrada en la formación de biofilms así como en la modulación de la respuesta inmune.

Las **fimbrias (Fim)** son estructuras filamentosas que se extienden de la superficie bacteriana. Estas proteínas median la unión de *B. pertussis* al epitelio ciliado y a monocitos por medio de las subunidades fimbriales mayores (polímero de unidades de 22kDa) y menores (39kDa) respectivamente.

La proteína **BrkA** (*Bordetella* resistance to killing) tiene un peso molecular de 103 kDa y está implicada en la resistencia de esta bacteria a la vía clásica del complemento. Contribuye a su vez a la adhesión de *B. pertussis* a las células del huésped.

La **pertactina (Prn)** es una proteína de 69kDa que se localiza en la membrana externa de *B. pertussis*. Participa también en el proceso de adhesión bacteriana a las células del huésped, en particular a los monocitos y estaría implicada fundamentalmente en las fases tempranas de la infección.

La **toxina pertussis (PT)** tiene un peso molecular 106 kDa, está compuesta de 6 subunidades denominadas S1-S5 que están presentes en una proporción 1:1:1:2:1. La subunidad S1 posee actividad ADP ribosiltransferasa. En el citoplasma eucariota la subunidad S1 provoca un aumento de la concentración intracelular de AMPc que deriva en alteraciones de diversas funciones celulares del sistema inmune. Se ha demostrado también que PT posee una actividad inmunomoduladora.

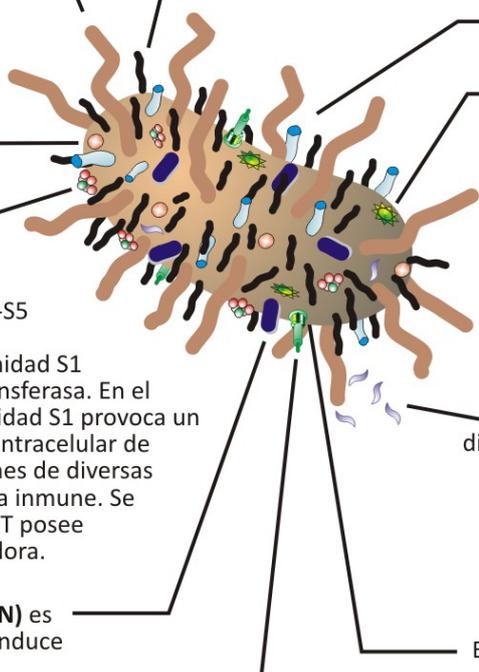
La **adenilato ciclasa-Hemolisina (AC-Hly)** posee por un lado actividad hemolítica y por el otro cataliza la síntesis de AMP cíclico. Es una toxina de 177 kDa que ingresa a la célula huésped, donde ejerce su actividad adenilato ciclasa. Resulta necesaria para el establecimiento de la infección.

La **toxina dermonecrótica (TDN)** es una proteína de 161 kDa que induce lesiones necróticas localizadas cuando es inyectada en forma intradérmica. En forma intravenosa, en cambio, es letal en bajas dosis. El rol de la TDN en la infección por *B. pertussis* no se ha determinado aún con exactitud, aunque su mecanismo de acción estaría relacionado con la alteración de los procesos de migración, morfogénesis y fagocitosis de la célula eucariota.

La **toxina citotraqueal (TCT)** es un disacárido - trespéptido derivado del peptidoglicano. Esta toxina es la responsable de la citopatología del epitelio respiratorio durante la infección por *Bordetella*, causando ciliostasis y tos persistente.

El **sistema de secreción de Tipo III (TTSS)** es un complejo de unas 20 proteínas. Permite la inyección de proteínas efectoras de origen bacteriano dentro del citoplasma de las células eucariotas, alterando así distintas funciones de la célula del hospedador.

El **lipopolisacárido (LPS)** constituye el componente estructural mayoritario de las membrana externa y actúa como una potente endotoxina durante el proceso infeccioso, produciendo efectos mitogénicos y tóxicos. Se ha propuesto que esta molécula sería uno de los marcadores antigénicos que direccionarían la respuesta ante la infección natural por *B. pertussis* a través de la señalización vía receptores TLR4.

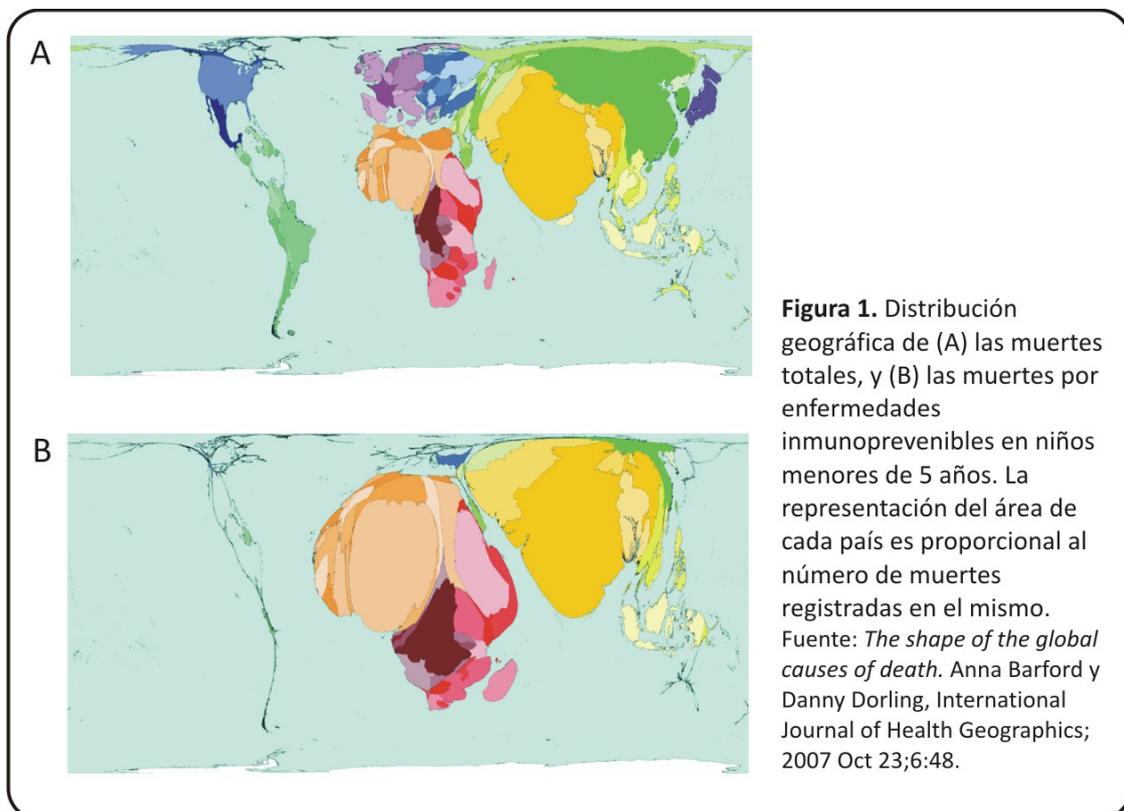


Problemáticas actuales de pertussis

Cuadro de situación actual de pertussis – problemáticas vigentes

El objetivo último de todo programa de vacunación contra un patógeno es lograr su erradicación total. Sin embargo, el estudio de la dinámica poblacional de los procesos infecto-contagiosos indica que cuanto más transmisible o contagiosa es una infección, mayor será el porcentaje de la población adecuadamente protegido que se requiere para poder eliminarla [46]. En el caso de pertussis los cálculos teóricos indican que esto difícilmente pueda alcanzarse dada la elevada tasa de contagio de esta enfermedad. Para lograr la erradicación sería necesario lograr una cobertura efectiva del 96% de la población, algo materialmente imposible con vacunas cuya eficacia es de alrededor del 80% [46]. Aunque no han logrado la erradicación de la enfermedad, las vacunas celulares contra pertussis lograron una drástica reducción del número de casos en todos los países donde se aplicaron [47]. Por su parte las vacunas acelulares de uso más reciente han mostrado en los ensayos a campo y en el seguimiento de su aplicación ser al menos tan efectivas como las primeras. A pesar de la disponibilidad de vacunas, la situación epidemiológica mundial de pertussis está lejos de ser totalmente controlada. En primer lugar, la cobertura de la vacunación es insuficiente en muchos países periféricos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2004 estimaba que por esta enfermedad se producían 254.000 muertes anuales,

registrándose el 98% de estas muertes en países africanos o del sur de Asia con muy bajas tasas de vacunación [48]. La comparación de estos números con los correspondientes a la Argentina permite tomar una dimensión de lo grave que resulta la situación de estos países. Así, si la tasa de mortalidad por pertussis en todo el mundo fuera la que se registra en nuestro país, en lugar de 254.000 muertes ocurrirían cada año alrededor de 3.200^{3, 4}. Los casos fatales se registran frecuentemente entre quienes no han recibido ninguna dosis de vacuna por su corta edad (en general los menores de dos meses). Esta situación no es exclusiva de esta enfermedad. La Figura 1 tomada de un trabajo reciente [49], ilustra este estado de cosas. El área de cada país en estos mapamundi deformados corresponde, en el panel A, a las muertes totales en cada uno, mientras que en el Panel B las áreas son proporcionales a las muertes por enfermedades inmunoprevenibles en niños menores de 5 años.



Pero existen también una serie de evidencias preocupantes respecto de la epidemiología de pertussis en los países donde la vacunación y las condiciones socioeconómicas son más adecuadas. Como expondremos a continuación, el número de casos es relativamente alto todavía, y a esto se suma la aparición de brotes epidémicos que periódicamente surgen en distintas partes del mundo. Por otro lado, se ha encontrado que

³ Calculado en base a los datos disponibles para el año 2004.

⁴ Por supuesto, esto implicaría que los mencionados países pudiesen alcanzar una situación socioeconómico y sanitaria muy distinta de la que tienen actualmente, que excede la cobertura de la vacunación.

en varios países con altas tasas de vacunación el número de casos confirmados de pertussis ha ido en aumento en los últimos 20 años, lo que llevó a catalogar como reemergente a esta enfermedad ⁵.

Número de casos mundiales de coqueluche en el contexto de otras enfermedades inmunoprevenibles

La OMS en su página web www.who.org muestra los datos epidemiológicos sobre pertussis disponibles desde 1980 hasta 2009 para la mayoría de los países [50]. Si bien los casos reportados son siempre una fracción del total de casos, estos números son de utilidad como indicadores de la tendencia del número real de casos.

La comparación de pertussis con otras enfermedades infecciosas es elocuente respecto de las complicaciones que plantea el control de esta patología. En este sentido podemos citar los resultados de un trabajo publicado en 2007 donde los autores comparan, a partir de las series históricas de incidencia para las enfermedades inmunoprevenibles, el impacto de los programas de vacunación en Estados Unidos [51]. De entre 9 patologías para las cuales existen vacunas licenciadas desde antes de 1980 (difteria, tétanos, pertussis, sarampión, paperas, poliomielitis, rubéola, rubéola congénita y viruela) los casos de pertussis fueron los que menos descendieron en comparación con la era prevacunal, si bien este descenso fue del 92,2% (ver Tabla 2).

	Era prevacunal		Era vacunal		Reducción %	
	Casos	Muertes	Casos	Muertes	Casos	Muertes
Difteria	21053	1822	0	0	100%	100%
Tetanos	580	472	41	4	93%	99%
Pertussis	200752	4034	15632	27	92%	99%
Sarampión	530217	440	55	0	100%	100%
Paperas	162344	39	6584	0	96%	100%
Poliomielitis	36110	3272	0	0	100%	100%
Rubeola	47745	17	11	0	100%	100%
Viruela	29005	337	0	0	100%	100%

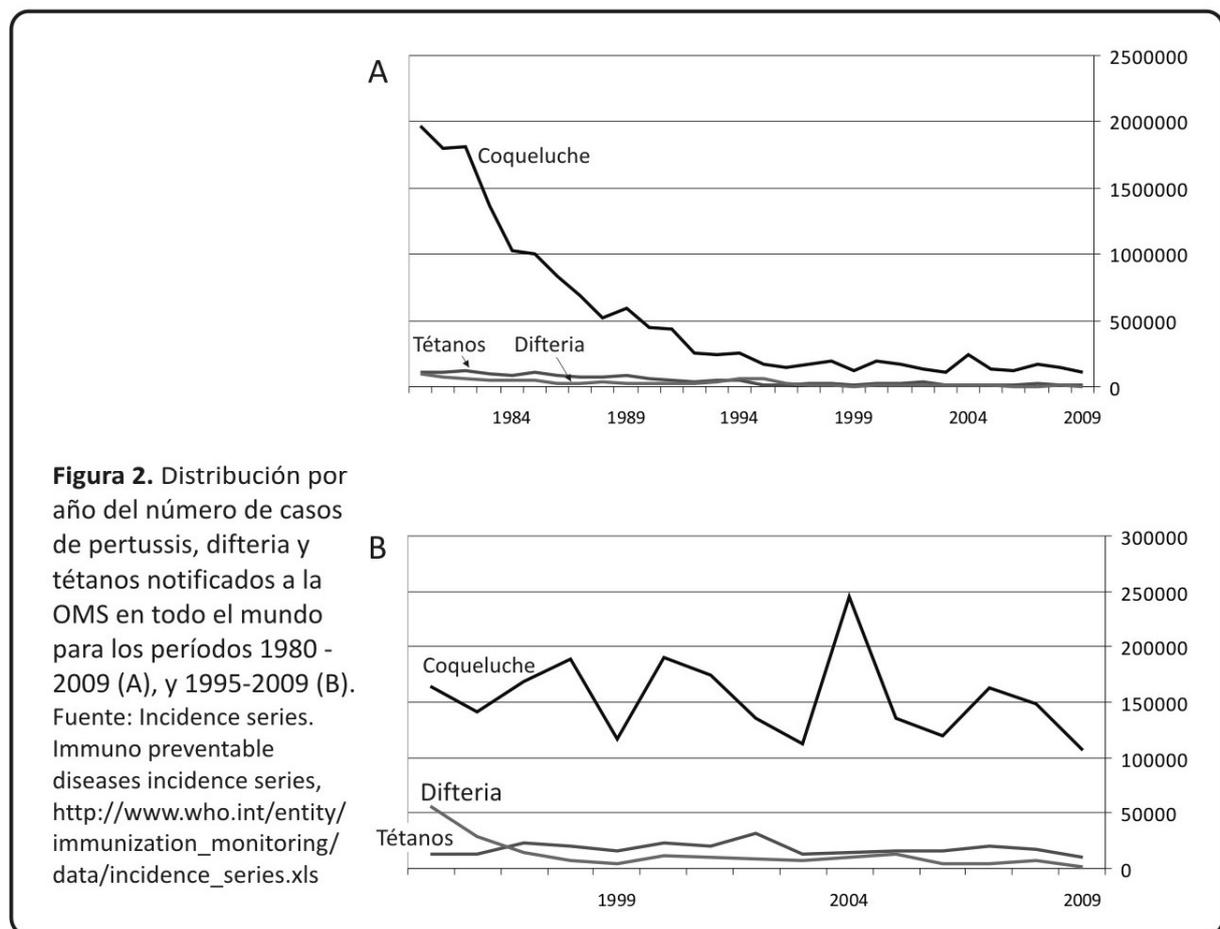
Tabla 2. Comparación histórica de la morbilidad y mortalidad para las enfermedades inmunoprevenibles cuyas vacunas fueron implementadas antes de 1980. El número de casos de la era vacunal refieren al año 2006, y el número de muertes al año 2004.
Fuente: *Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States.* Roush, S.W. y Murphy, T.V. JAMA, 2007. 298(18): p. 2155-63.

La vacuna antipertussis se administró desde los comienzos de la vacunación masiva, junto a los componentes diftérico y tetánico. Es por ello que estas tres vacunas han tenido idénticas coberturas a lo largo de los años. Desde este punto de vista la comparación en el

⁵ La OMS define a las enfermedades como reemergentes cuando su incidencia aumenta rápidamente en una población o un área geográfica.

número de casos registrados puede ser ilustrativa, sin soslayar que estas enfermedades tienen entre sí muchas diferencias: el tétanos, por ejemplo, es una enfermedad infecciosa pero no contagiosa, y por otro lado la notificación de las tres enfermedades se ven influenciadas de forma particular por variables como la tasa de hospitalizaciones de cada una.

En la Figura 2 representamos las variaciones en el número de casos para las tres patologías. Como puede observarse, el comportamiento de pertussis es particular. En primer lugar, el descenso de pertussis por la vacunación ocurre un tiempo después que el de tétanos y difteria, que ya han descendido a sus niveles actuales para el año 1980. Por otro lado, centrándonos en el gráfico para el período 1995- 2009 (Panel B de la Figura 2), vemos que el número de casos de pertussis es mucho mayor que el de las otras dos enfermedades. Desde 1995, el número de casos reportados de difteria y tétanos se mantiene relativamente estable alrededor de los 20.000 casos anuales. Pertussis en cambio presenta un comportamiento llamado endémico con picos epidémicos [52], en el cual el número de casos es mucho más alto que para tétanos y difteria (alrededor de 165.000 casos anuales en promedio, entre 1993 y 2009), registrándose picos de hasta 250.000 casos reportados [50].



Persistencia de la circulación de *B. pertussis*

Pertussis es una enfermedad que presenta las mayores complicaciones en los niños menores de un año [53]. Sin embargo, los individuos de cualquier edad pueden contraer la infección, aunque no desarrollen en todos los casos una sintomatología típica. Existen evidencias para pensar que a pesar de la vacunación masiva y del descenso en el número de casos reportados, la circulación de *B. pertussis* no ha sido afectada en gran medida. Como mencionamos más arriba, el comportamiento de pertussis se describe como endemo - epidémico, con picos de incidencia cada 3 a 5 años. Las series de datos para muchos países centrales muestran que, a pesar de la introducción de la vacunación, se ha mantenido la duración de este intervalo entre picos de máxima incidencia de la infección. Esto es contrario a lo que cabría esperar si las vacunas evitaran no solamente la enfermedad, sino que también influyeran en la dinámica de circulación de este patógeno [54, 55].

Este hecho ha llevado a afirmar que las vacunas controlan de forma efectiva la forma grave de la enfermedad pero no las infecciones más leves por *B. pertussis*. Estas serían hoy en día tan frecuentes como en la época prevacunal. Esta hipótesis se ha sostenido también en base a trabajos en que midiendo el título de anticuerpos en la población general se estima el nivel de infecciones asintomáticas por *B. pertussis* [56-59].

A nivel global el número de casos es todavía muy alto en comparación con otras enfermedades inmunoprevenibles. Antes de pasar a describir las epidemias o brotes de pertussis, resumiremos algunos aspectos de la situación epidemiológica de esta infección en la Argentina.

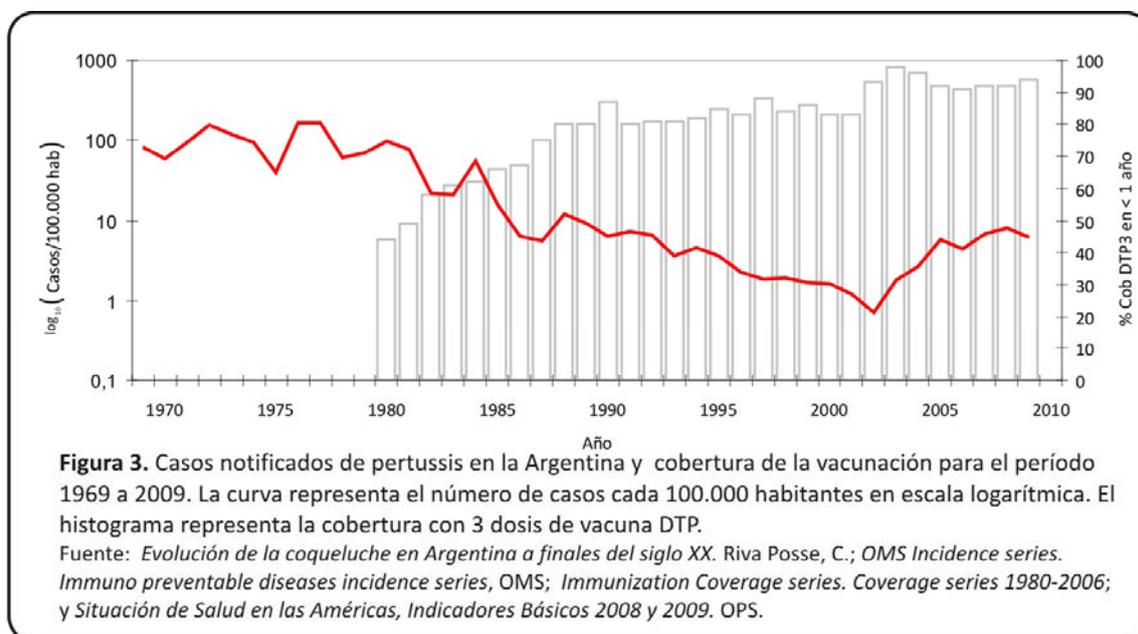
Situación epidemiológica de pertussis en Argentina

Pertussis o coqueluche es una enfermedad de notificación obligatoria en Argentina, con lo cual existen registros de varios años respecto del número de casos sospechosos para todo el país. En lo que hace a esta infección, el sistema de notificación argentino (Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, o SNVS) reúne los datos provenientes de dos vías: por un lado los reportados a través de la Planilla C2, que es elaborada semanalmente en los centros de atención locales, y luego elevada a los niveles regionales, provinciales y por último nacionales. La otra fuente de datos es el sistema SIVILA (sistema de vigilancia laboratorial), un soporte informático que permite el monitoreo en tiempo real de los datos y el rápido establecimiento de alertas epidemiológicas. El SIVILA permite también a los laboratorios de la red nacional de diagnóstico actualizar los datos de cada caso clínico, vinculando al mismo los resultados de las pruebas realizadas.

La instalación de este sistema ha mejorado significativamente la notificación de los casos sin embargo todavía hay provincias que no lo han incorporado completamente. En

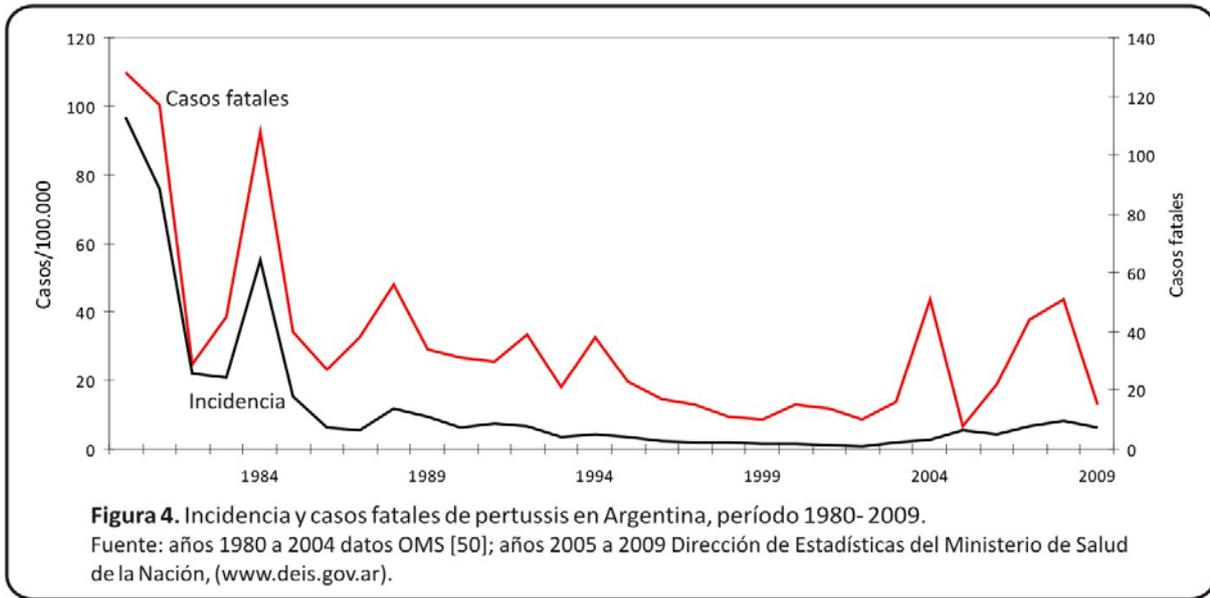
2009, por ejemplo, el 95,3% de los casos informados correspondieron a las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Mendoza, Neuquén, Santa Fé y Tucumán, que albergan aproximadamente el 64,5% de la población argentina [60]. Esta situación se está revirtiendo año a año. El análisis de toda esta información está permitiendo describir más acabadamente la situación de patologías como pertussis a lo largo de los últimos años.

En el análisis es importante recordar que en Argentina la vacunación masiva contra pertussis se inició en la década de 1970, llegándose a coberturas mayores al 80% en niños menores de un año recién en 1990 [61]. Desde entonces el número de casos descendió sensiblemente (ver Figura 3). A partir del año 2003 en adelante esta tendencia se revirtió, registrándose un aumento persistente en el número de casos, a pesar de las altas tasas de vacunación consignadas por el Ministerio de Salud de la Nación (Figura 3)⁶.

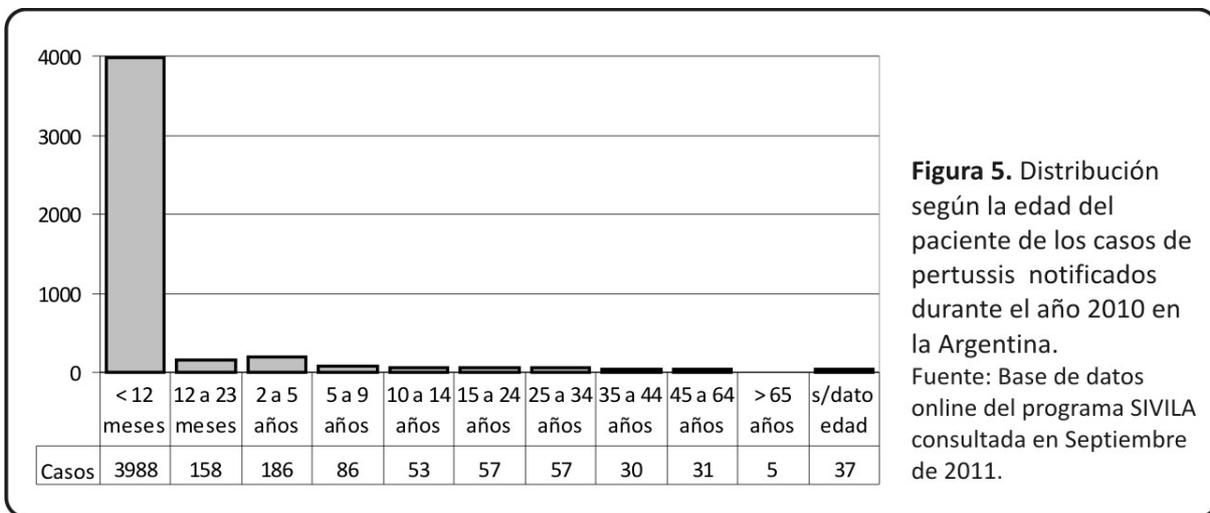


En la Figura 4 se presenta el número de casos fatales de pertussis registrados en nuestro país entre 1980 y 2009. Como puede observarse, los casos fatales siguen aproximadamente la curva de incidencia. El alto número de muertes ocurridas en 2004, 2007 y 2008 (51, 44 y 51 respectivamente) superó los índices de mediados de los años 1980, escapando a la mencionada tendencia (Figura 4). La tasa de letalidad reportada en otros países es de aproximadamente el 3 por mil en menores de un año [62].

⁶ El aumento en la incidencia registrado desde 2003 coincide con la paulatina implementación del diagnóstico por PCR realizada a partir de 2005 en nuestro laboratorio y en otros establecimientos, por lo que podría pensarse en una contribución de esta metodología. Sin embargo, las muestras sometidas a PCR corresponden a un porcentaje relativamente estable del total de casos reportados a nivel nacional (entre un 15% y un 19%).

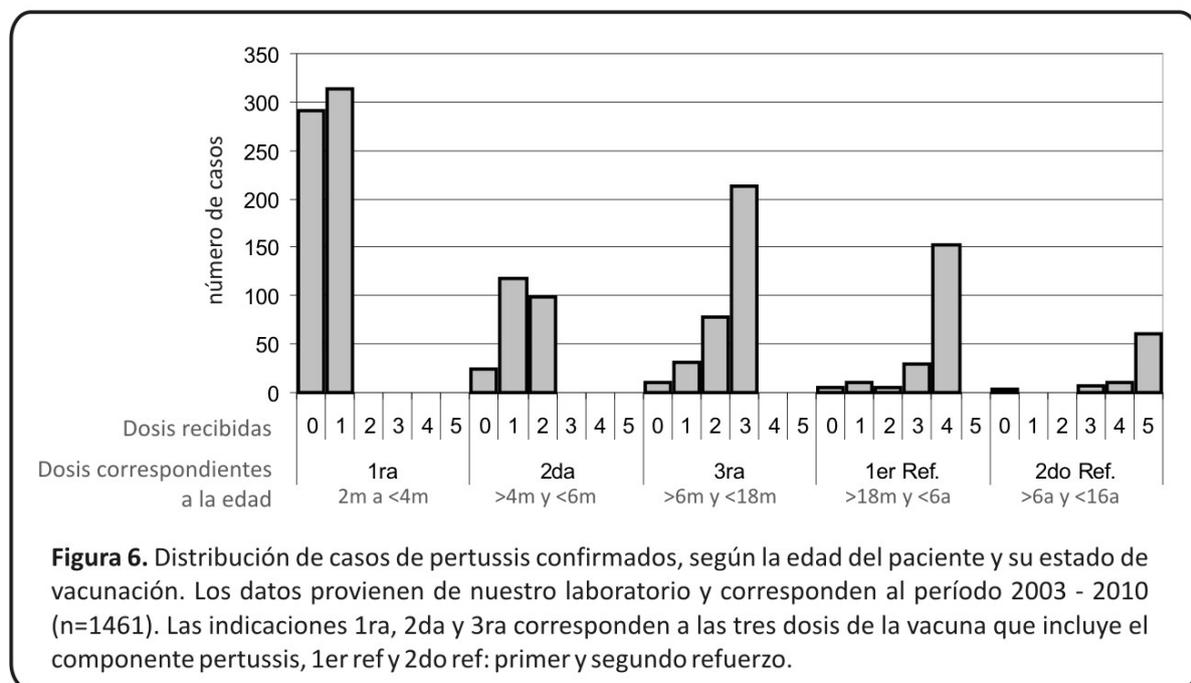


En cuanto a la distribución por edad de los casos, en nuestro país se observa que la gran mayoría (alrededor de un 85%) corresponden a menores de 1 año. Es en este grupo etario donde la enfermedad se presenta con la sintomatología más notoria, y también donde la tasa de hospitalizaciones es mayor. La Figura 5 muestra la distribución de casos por edad para el total del país en el año 2009 (última información disponible a nivel nacional).



En relación al estado de inmunización de los pacientes realizamos un análisis clasificando los casos de acuerdo a grupos etarios concordantes con el esquema de vacunación (Figura 6). Excluimos de este análisis a los niños menores de dos meses aún no vacunados dada su edad (ver [63]) y a los mayores de 16 años para los cuales la inmunidad conferida por la vacunación ha disminuido sensiblemente. Para los cinco grupos restantes (de dos meses a 16 años) incluidos en la Figura 6 se analizó la distribución de casos confirmados en nuestro laboratorio (Laboratorio Nacional de Referencia de pertussis) de

acuerdo al número de dosis recibidas. Este análisis incluyó los casos ingresados a nuestro laboratorio entre Agosto de 2003 y Diciembre de 2010. Como puede observarse en la Fig. 6 en el primer grupo de edad representado por los niños de 2 a 4 meses, el 50% de los pacientes con diagnóstico por PCR de coqueluche había recibido una dosis de vacuna, mientras que la otra mitad no había recibido ninguna dosis. Es interesante notar que la mayoría de los casos confirmados entre quienes tienen edad de haber recibido 3 o más dosis de vacuna, se dan efectivamente en individuos con el esquema de vacunación completo para la edad. Esto es razonable dada la alta cobertura de vacunación de nuestro país, pero reafirma el criterio de que la vacunación con las actuales vacunas no es suficiente para lograr el control de la enfermedad [64]. La protección de las vacunas celulares de pertussis evaluada luego de aplicada la tercera dosis resulta de entre el 70 y el 90%.



Persistencia de brotes epidémicos

Como hemos mencionado, el alto número de casos en Argentina y el mundo marcan la necesidad de revisar las estrategias de control empleadas. Otro elemento que indica que la vacunación actual no es la óptima, es la existencia de recurrentes brotes epidémicos en distintas partes del mundo.

Los brotes epidémicos (o epidemias) se definen como el aumento del número de casos de una enfermedad por encima del nivel esperado, para una determinada región. Los brotes de pertussis no son excepcionales, aún en países que mantienen altas tasas de vacunación. En los últimos 15 años se han reportado brotes en diferentes estados de Estados

Unidos [65, 66], en Alemania [67], Australia [68], Estonia [69], Francia [70], Holanda [71], Irlanda [72] y Japón [73] y también en nuestro país [64, 74].

Los brotes epidémicos pueden circunscribirse a poblaciones que mantienen un elevado contacto entre sí, como colegios u otras instituciones, donde pueden afectar hasta un 50% de la población total, o bien expandirse y abarcar regiones más amplias como los brotes registrados en Neuquén durante 2005 [74] o en California en 2010 [66]. En el caso del brote en la provincia de Neuquén, se observó inicialmente un aumento en el número de casos durante el segundo semestre de 2004. Hacia fines de 2004 el número de casos disminuyó (siguiendo la tendencia usual durante el verano). Sin embargo, en 2005, a partir del mes de Junio el número de casos superó más de diez veces los del año anterior. El brote abarcó la totalidad de la provincia, afectando al 6% de todos los niños menores de 1 año, y produjo al menos 8 muertes [64, 74].

La principal hipótesis sobre el origen de estos brotes refiere a la acumulación de susceptibles debida a la caída de la inmunidad. Se ha observado que la duración de la inmunidad una vez completado el esquema de vacunación es de unos 4 a 12 años [75]. Pasado este tiempo los individuos vacunados podrían volver a contraer la enfermedad.

Durante los brotes, en poblaciones relativamente chicas se producen aumentos muy significativos de la incidencia de la enfermedad debido a la alta contagiosidad de la enfermedad. Un individuo susceptible por caída de la inmunidad, inmerso en una población con la incidencia normal de coqueluche, tal vez nunca se contagie de la enfermedad. Pero sí puede contagiarse en un ámbito donde el número de contactos con individuos infectados es varias veces mayor al normal [46]. Posteriormente, a través del contacto de estos individuos con niños menores de un año, la enfermedad puede expandirse, afectando al grupo más susceptible de presentar complicaciones.

Reemergencia de la enfermedad

Un último aspecto de la epidemiología de pertussis al que queremos referirnos es la reemergencia de esta enfermedad registrada en países con elevadas tasas de vacunación. La caracterización de esta situación epidemiológica es pertinente, además, en vistas de que la Argentina se encontraría, según los reportes publicados por el Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación, con tasas de cobertura similares a las de los países centrales aunque utilizando una vacuna diferente.

Desde los años 1990 vienen registrándose en la bibliografía reportes sobre un aumento en el número de casos de coqueluche en varios países de distintas regiones del mundo como Argentina, China, España, Estados Unidos, Holanda, Eslovenia, y República Checa. Respecto de la incidencia total, en estos trabajos se reportan aumentos muy significativos: en Argentina la incidencia de pertussis en el período 2004-2006 duplicó la incidencia del

período 1995-1999 [64]. En China, los casos reportados de pertussis en el período 2001-2004 fueron unas diez veces mayores a los previos a 1992 [76]. En Holanda ocurrieron en 1987 y 1996 picos de hasta diez veces la incidencia de los años inmediatamente anteriores [77]. En Eslovenia, por su parte, entre 2005 y 2006 la incidencia aumentó 6,5 veces [78]. La situación de República Checa es similar a la anterior, con un aumento en los valores de la incidencia de 3,8/100.000 habitantes en 1987 a 26,7/100.000 habitantes en 2008 [79]. En Estados Unidos en la década del noventa se observó un incremento del 50% en la incidencia de pertussis respecto de la década anterior [80]. En ese país, la tos convulsa es la única enfermedad inmunoprevenible que muestra un aumento en el número de casos a lo largo de los años [81]. En Estados Unidos, la incidencia siguió subiendo en forma continua hasta 2004 [82], se mantuvo en 2005 y luego ha descendido durante 2006 y 2007, para volver a incrementarse en 2008 y 2009. Los valores de estos años duplican a los correspondientes de los años 1990 [83].

Una tendencia que también se repite en varios de estos reportes es el aumento en la incidencia en los mayores de 14 años. Cuantitativamente este aumento fue del 114% en Europa entre 1998 y 2002 [84]. En Australia, entre 1995 y 2005 los reportes de casos anuales se mantuvieron aproximadamente estables, pero se observó también un aumento relativo en la incidencia correspondiente al grupo de 20 a 59 años [85]. En el citado trabajo de República Checa se reporta un aumento de la incidencia de 3,4 veces entre los adolescentes (15-19 años) [79]. En un estudio realizado en España [86], la mayor tasa de crecimiento de la incidencia en el período analizado (2004 a 2008) correspondió a los mayores de 35 años. Los datos de Estados Unidos para 2004 indicaron un aumento de 19 veces en la incidencia del grupo de 10 a 19 años.

De forma complementaria a estos reportes, los datos recopilados por la OMS son otra fuente en la cual podemos ver reflejado el fenómeno de la resurgencia. Presentamos a continuación un breve análisis que realizamos sobre los datos de la OMS provenientes de países donde la tasa de vacunación ha sido, en promedio, mayor al 80% para las tres primeras dosis. Incluimos así 137 países sobre 193 totales para el período 1992-2009. Como una forma aproximada de valorar la reemergencia, analizamos el cociente entre el número de casos estimados durante los últimos 3, 5, o 9 años del período 1992-2009, y el correspondiente a un igual período de años previos. Los resultados indican un claro aumento de casos –un factor de 5 o superior en alguno de los tres rangos analizados– en 10 países (entre ellos la Argentina). Para otros 12 países también se registra un aumento, aunque no tan contundente como en los casos anteriores, de entre 2 y 5 veces. En 31 países no hay una tendencia clara, y para los restantes 38 países para los cuales los datos permiten hacer este análisis, se observa un descenso del número de casos [50].

El contraste de este panorama con el equivalente para la difteria, una enfermedad también contagiosa, es muy claro: el mismo análisis no arroja ningún país en el que la incidencia de difteria esté aumentando en forma consistente⁷.

El aumento en la incidencia de pertussis en distintas partes del mundo es un hecho que ha llamado la atención de quienes investigan en este campo. En este sentido se han planteado distintas hipótesis que, como veremos a continuación, intentan explicar el fenómeno.

Algunas hipótesis para explicar la reemergencia de pertussis

El aumento de la incidencia es un hecho aceptado, y aunque la reemergencia como tal ha sido en parte cuestionada, hoy en general el debate ha quedado restringido a las causas. Por un lado, hay quienes sostienen que la resurgencia responde a las mejoras en la vigilancia y en los métodos de diagnóstico para la enfermedad (fundamentalmente la introducción del diagnóstico por PCR) [54]. Al otro lado de este debate se encuentran quienes sostienen que en realidad la resurgencia observada deviene de fenómenos novedosos en la interacción patógeno- huésped. Desde esta óptica se han propuesto una variedad de hipótesis para explicar la persistencia y el aumento genuino del número de casos de tos convulsa: la fluctuante efectividad de las vacunas celulares, la caída de la inmunidad conferida por la vacunación, y la adaptación de las bacterias circulantes a las vacunas en uso. Cada uno de estos factores puede haber sido determinante en un país particular, aunque no hay un consenso sobre el peso relativo que los mismos tendrían más en general. Analizaremos un poco más en detalle estas hipótesis para luego delinear, en función de las mismas, el posible impacto de las mejoras a las actuales vacunas.

i) Efectividad de las vacunas contra pertussis

La eficacia de las vacunas celulares contra *B. pertussis* está valorada en alrededor del 80%, aunque esto depende de la definición de caso tomada en cada estudio [26] (ver Recuadro 2). Esta eficacia, además de ser algo menor que la de otras vacunas, ha mostrado una alta variabilidad desde los comienzos de su fabricación [26]. El cultivo *in vitro* de este microorganismo fastidioso arroja resultados variables, y como hemos comentado se necesitó de un trabajo sistemático para lograr establecer estándares de control de la producción de vacunas. Estos problemas volvieron a ponerse en evidencia durante los ensayos clínicos destinados a licenciar las vacunas acelulares desarrolladas en las décadas de 1980 y 1990. En estas pruebas se comprobó que la eficacia de las vacunas de célula completa introducidas como controles en estos ensayos era muy variable, yendo desde el 36

⁷ Hay quienes, sin embargo, advierten que nuevas epidemias podrían producirse en países donde las condiciones socio-económico-sanitarias lo faciliten, dada la persistente circulación de cepas toxigénicas de *Corynebacterium diphtheriae* [87].

al 90% [88-91]. Se sabe, además, que el nivel de anticuerpos generado por estas vacunas contra algunos antígenos particulares de *B. pertussis* varía según el productor y el lote de vacuna evaluada [26]. Según este argumento, la persistencia de pertussis podría deberse a la presencia de una proporción significativa de la población que sería susceptible de infectarse dado que su estado de protección no sería el óptimo. Aunque debemos remarcar que el uso de este tipo de vacunas logró una reducción de más del 90% en la incidencia de pertussis, estas evidencias son parte de la argumentación a favor del uso de vacunas de composición definida. La potencia de estas últimas no dependería directamente de las variables que afectan el crecimiento *in vitro* de esta bacteria.

Recuadro 2. Definiciones de eficacia, efectividad y eficiencia de una vacuna.

Eficacia: la eficacia de una vacuna se refiere al porcentaje de reducción en la incidencia de la enfermedad sobre un grupo de individuos que la reciben en las condiciones ideales, y se evalúa mediante ensayos clínicos.

Efectividad: es el mismo parámetro pero evaluado a mediante estudios observacionales a campo, una vez que se ha autorizado y registrado la vacuna.

Eficiencia: es un parámetro de tipo costo-beneficio, que relaciona los resultados sanitarios obtenidos con el costo económico de la implementación del plan de vacunación.

Tomado de *Eficacia protectora, efectividad y eficiencia de las vacunas*. Sanmartí, García, Alcalá en *Manual de Vacunas en Pediatría* (2008). Merino Moína (Ed.) Asociación Española de Pediatría.

ii) Caída de la inmunidad

Una segunda hipótesis respecto de la resurgencia se basa en la caída de la inmunidad. Es un hecho conocido que la inmunidad contra *B. pertussis* que sigue a la infección natural no dura de por vida [92]. Por otro lado, la duración de la inmunidad conferida por la vacunación es aún menor. Se ha descrito que la inmunidad post infección dura entre 4 y 20 años, mientras que la inmunidad conferida por vacunas no duraría más de 12 años [75].

A partir de esta evidencia, se ha sugerido que el uso de vacunas puede haber influido cualitativamente en la circulación del patógeno. En la era prevacunal en un contexto de alta incidencia y circulación del patógeno, la mayoría de los niños adquiría inmunidad a *B. pertussis* en la infancia. En la era vacunal, en cambio, la vacunación y la consecuente reducción en la circulación del patógeno llevan a que la inmunidad contra pertussis se adquiera en la gran mayoría de los casos luego de la vacunación. En esta hipótesis, los adolescentes y adultos de la época prevacunal no eran susceptibles de infectarse con *B. pertussis* debido a que su inmunidad no había caído significativamente aún. A partir de la vacunación masiva, en cambio, la protección es tal que se volvería incompleta a partir de la

adolescencia [82]. La consecuencia más directa de esta hipótesis es explicar el mencionado aumento en el número de casos en adolescentes y adultos pero además, este cambio llevaría –indirectamente- a una mayor incidencia entre los menores de un año, dado que el grupo etario de los adolescentes/adultos actuaría como transmisor de la infección a los niños, con quienes tienen una alta tasa de contacto (fundamentalmente entre padres e hijos). Este argumento llevó recientemente a varios países a aprobar el uso de vacunas acelulares como refuerzo para adolescentes y adultos incluido el personal de salud en contacto con niños menores de un año, entre ellos la Argentina [63, 93-96].

iii) Divergencia antigénica

Una tercera hipótesis se refiere a la divergencia de los aislamientos clínicos respecto de las cepas vacunales. La idea central de esta hipótesis es que la vacunación ejerció una presión de selección que favoreció a aquellas cepas de *B. pertussis* cuyas variantes antigénicas fueran menos sensibles a la inmunidad generada por las vacunas [97]. Esta hipótesis fue propuesta por el grupo de investigación holandés liderado por Frits Mooi, a partir del hallazgo de variantes polimórficas en dos factores de virulencia conocidos de *B. pertussis*: la toxina pertussis y la adhesina pertactina. Las cepas de *B. pertussis* utilizadas en la fabricación de vacunas aisladas en los años 1950 tienen una determinada variante de cada una de estas dos proteínas, mientras que las circulantes en los años 1990 tienen, en su mayoría, otra. Más aún, un análisis temporal de los aislamientos mostró que el porcentaje de cepas divergentes aumentaba progresivamente de los años 1950 a los años 1990 [98].

A partir de estos primeros reportes, la divergencia en la población bacteriana de *B. pertussis* ha sido estudiada extensamente con una variedad de metodologías. Inicialmente, la evidencia recolectada consistió en diferencias de serotipo, que luego se complementó con información de distintos tipos de análisis a nivel genómico [99]. Vale la pena aclarar que *B. pertussis* es, en el sentido evolutivo del término, altamente clonal, es decir que no se caracteriza por presentar transferencia horizontal de genes [100, 101], como sí presentan otras especies bacterianas. En cambio, las variantes genotípicas encontradas en esta bacteria son causadas por mutaciones puntuales, el acortamiento o alargamiento de zonas homopoliméricas de ADN, y por la presencia de un elevado número de secuencias de inserción, que permitirían reacomodamientos y deleciones de material genético [100, 102].

Además de los análisis a nivel genómico, se han reportado también estudios de proteómica en los que se caracterizan las divergencias en la población bacteriana. En general, repasando las evidencias colectadas durante los últimos años mediante distintas técnicas, podemos decir que los aislamientos clínicos presentan diferencias a nivel genotípico y fenotípico en comparación con las cepas vacunales. Un análisis pormenorizado

de estas diferencias puede encontrarse en las Tesis Doctorales de Daniela Bottero y Emilia Gaillard, integrantes de nuestro grupo de investigación [103, 104].

Las diferencias observadas, sin embargo, podrían no ser relevantes a los efectos de la protección. Si esto fuera así, por reciprocidad, la introducción de las vacunas no debería tener un efecto en la población bacteriana circulante. Dos conjuntos de evidencias sugieren que en realidad las vacunas en uso sí impactarían diferencialmente en el control de las cepas divergentes y las cepas vacunales, dando sustento a la hipótesis de que ha ocurrido un proceso de selección por las mismas.

En primer lugar, como se mencionó previamente, se observa que en los países donde se han aplicado planes de vacunación durante décadas, las cepas circulantes poseen variantes antigénicas diferentes de las incluidas en las vacunas. Sin embargo, esto no ocurre en países como Senegal, donde la vacunación se inició recién en 1987 [105]. Estos datos coinciden con lo encontrado para los alelos de la proteína pertactina: el mismo alelo *prn1*, se encontró en las cepas vacunales de los años 1950, en los aislamientos franceses de las décadas de 1920 y 1930, y en aislamientos de los años 1990 en Senegal [105]. Sin embargo, prácticamente no hay aislamientos con esta variante de pertactina en los países donde se mantuvieron altas tasas de cobertura para la vacuna triple bacteriana DTP. También apuntan en este sentido los datos recolectados durante los ensayos clínicos de las vacunas acelulares: en estos ensayos se recuperaron aislamientos de individuos participantes en distintos grupos. La posterior tipificación de estos aislamientos indicó que se recuperaban cepas divergentes más frecuentemente en el grupo de individuos vacunados que en el grupo de individuos no vacunados, donde prevalecían las cepas no divergentes [106]⁸.

En relación a la relevancia de las diferencias fenotípicas en la protección, otro conjunto de evidencia lo aportan los experimentos *in vivo* realizados en ratones, algunos de ellos realizados por nuestro grupo [107-110]. En estos ensayos se pudo comprobar que las vacunas comerciales de células completa protegieron en mayor medida a los ratones desafiados con una cepa también vacunal que a aquellos desafiados con un aislamiento reciente de *B.pertussis* [104].

Si aceptamos como hipótesis razonable la existencia de una presión de selección por las vacunas de células completas, podría pensarse que el efecto causado por las vacunas de tipo acelular sería aún más contundente, ya que éstas contienen solamente unos pocos antígenos (5 como máximo) [111] en una dosis más elevada. Si bien no han pasado muchos años desde la introducción de las vacunas acelulares (unos 15 años en Japón, Canadá y Estados Unidos) en un reporte del año 2009, sobre 71 aislamientos clínicos recientes analizados se encontró que 4 de ellos no expresaban la proteína pertactina, y uno más no

⁸ Esta evidencia debe tomarse con cautela dado el bajo nivel de significación de los resultados [106].

expresaba la toxina pertussis [112]. Dado que ambas proteínas están incluidas en las formulaciones acelulares, esto podría indicar que la hipótesis de la presión selectiva por las vacunas es correcta. El hallazgo de cepas de *B. pertussis* “superproductoras” de toxina pertussis ha sido propuesto también como una consecuencia de la adaptación de la población circulante a las vacunas [113].

Hipótesis de trabajo planteada en esta tesis

Hasta aquí hemos repasado algunos aspectos sobre el control de las infecciones por *B. pertussis* que aún están pendientes. Como hemos visto, a pesar de tratarse de una enfermedad para la cual existen vacunas desde hace varias décadas, la situación no está totalmente controlada. Esto se debe en parte a que las vacunas actualmente en uso no son totalmente satisfactorias ya sea por las fluctuaciones en la efectividad de las vacunas celulares, como por la corta duración de la inmunidad que confieren tanto las vacunas celulares como las acelulares. A estos aspectos se suma la posibilidad de que las cepas circulantes de *B. pertussis* logren adaptarse para de algún modo, evadir la respuesta inmune generada por estas vacunas.

Sobre estos elementos establecimos como hipótesis de trabajo que la mejora en el control de la enfermedad puede lograrse a través de la disponibilidad de nuevos inmunógenos que puedan mejorar -o complementar- las actuales vacunas acelulares. En el sentido de fundamentar el desarrollo de una nueva vacuna acelular, debemos pensar cómo esta podría impactar en cada uno de los problemas de las actuales vacunas que mencionamos más arriba.

Respecto de la variabilidad en la eficacia de las vacunas, podemos argumentar que las vacunas acelulares resolvieron esta dificultad, justamente por estar formuladas a partir de subunidades purificadas. En este caso la eficacia sería independiente, en principio, de las variables que pudieran afectar al cultivo del cual se obtienen los antígenos. En contraste, las vacunas atenuadas o incluso aquellas formuladas en base a subunidades relativamente complejas (como pueden ser las preparaciones de vesículas de membrana, o los proteoliposomas) serían más directamente influenciadas por las variables que afecten el cultivo del microorganismo, tal como lo hacen con las vacunas de células completas.

La pérdida de la inmunidad se presenta como un problema más complejo para ser resuelto con una vacuna acelular, porque en principio no hay elementos para pensar que una vacuna de este tipo pudiera brindar una protección más duradera que las vacunas más complejas. De hecho, se ha observado que la inmunidad generada por vacunas acelulares cae más rápidamente que la protección lograda por vacunas de células completas. En este sentido, en un trabajo reciente [114] se evalúa, un año después de la inmunización, la

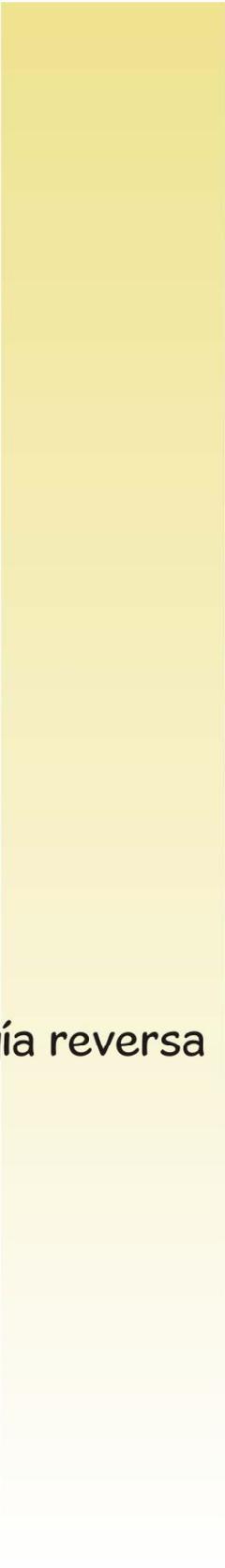
protección generada por la vacunación intranasal con una cepa atenuada de *B. pertussis* o con dos dosis de vacuna acelular, reportándose mayores niveles de protección en el caso de la vacuna atenuada. Por un lado, este panorama puede cambiar con el uso de nuevos adyuvantes diseñados racionalmente en base al actual conocimiento inmunológico. Pero además, una ventaja inherente a la baja reactogenicidad de las vacunas acelulares es que variantes de éstas pueden aplicarse a adolescentes y adultos, con lo cual, mediante sucesivos refuerzos podría lograrse mantener la inmunidad en valores aceptables. La aplicabilidad de las vacunas acelulares en adultos abre la posibilidad a estrategias de tipo cocoon (inmunización de la población de riesgo) y también a la inmunización posparto [95, 115].

Por último, la obtención de nuevos antígenos vacunales de *B. pertussis* sería el paso previo a la obtención de vacunas acelulares que puedan controlar la aparición de cepas resistentes a las vacunas actuales, si se diera el caso.

Tal como la hemos planteado hasta aquí, la hipótesis general de que es deseable identificar nuevos inmunógenos individuales de *B. pertussis* admite una variedad de abordajes experimentales, dado que existen múltiples estrategias válidas para la identificación de nuevos inmunógenos. Algunas de estas estrategias parten de identificar los blancos naturales de la respuesta inmune, como la inmunoproteómica. Otras, en cambio, del conocimiento básico sobre la biología de la interacción patógeno-huésped, como la identificación de proteínas intervinientes en la infección de *B. pertussis* (como es el caso de los actuales inmunógenos incluidos en las vacunas acelulares).

En la próxima sección introduciremos una estrategia con un fundamento algo distinto, llamada vacunología reversa, que es la que emplearemos en este trabajo. En lugar de basarse en la identificación experimental de candidatos, la Vacunología Reversa consiste en el análisis *in silico* mediante programas informáticos, de secuencias genómicas en busca de proteínas cuyas características las hagan parecer buenos inmunógenos. Entre las propiedades de interés, se encuentran –por ejemplo- la localización en la superficie del patógeno y la homología con factores de virulencia conocidos.

Nuestra hipótesis de trabajo se completa entonces con la elección de esta metodología, y podríamos enunciarla como que en vista de la actual situación de control de pertussis, así como previendo que su disponibilidad podría ser beneficiosa en el mediano plazo, es deseable la identificación de nuevos inmunógenos de *B. pertussis*. Esta identificación puede hacerse mediante la aplicación de la estrategia llamada vacunología reversa.



La vacunología reversa

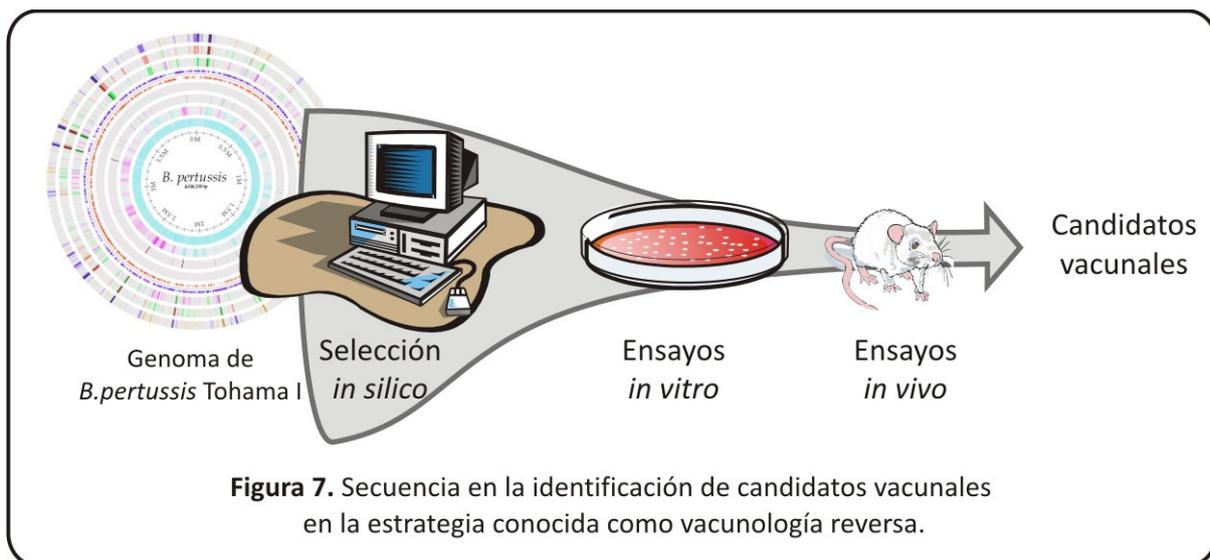
La vacunología reversa

La metodología clásica para el diseño y producción de una vacuna a subunidades consiste en la identificación y purificación de los componentes inmunogénicamente relevantes a partir de cultivos del agente causal de la patología. Esta metodología en general se restringe a aquellos antígenos que se expresan en cantidades suficientes como para poder obtenerlos a partir de un cultivo *in vitro* [116]. Una vez identificados cada uno de los candidatos, el procedimiento de purificación suele resultar trabajoso porque requiere la puesta a punto de la metodología para cada antígeno particular [117].

Una estrategia alternativa, la vacunología reversa, fue propuesta en el año 1999, algunos años después de la aparición de los primeros genomas completos. La idea central de esta nueva estrategia es utilizar las secuencias genómicas disponibles para identificar posibles candidatos vacunales [118, 119]. Su nombre hace referencia al dogma central de la Biología Molecular: la búsqueda de candidatos vacunales se realiza no entre los productos finales de la síntesis proteica como en la metodología clásica más arriba descrita, sino en la secuencia de ADN. El primer insumo de esta estrategia es entonces la secuencia genómica de un patógeno.

Sobre el genoma se definen, en primera instancia, los marcos de lectura abiertos (u ORFs, por *Open Reading Frames*) que en el caso de los genomas bacterianos son varios

miles. Aunque en principio todos ellos podrían ser útiles como inmunógenos, trabajar con un número grande de candidatos implicaría enormes cantidades de tiempo y recursos. El desafío que se plantea entonces en esta metodología es cómo seleccionar de entre los miles de candidatos disponibles en un genoma, aquellos que tengan más posibilidades de brindar protección al ser empleados como componentes de una vacuna. La vacunología reversa requiere así el establecimiento de criterios de selección de candidatos que pueden describirse como una serie de filtros que se aplican en forma secuencial. La selección de los candidatos incluye dos etapas. La primera etapa consiste en la selección *in silico* la cual requiere el uso de programas de computación, y la segunda etapa implica la evaluación funcional de los candidatos elegidos mediante la realización de experimentos *in vitro* y/o *in vivo* (Figura 7). Los algoritmos de trabajo *in silico* disponibles permiten identificar con cierto grado de precisión, aquellos ORFs que correspondan a proteínas expuestas en la superficie del patógeno, o bien que codifiquen para posibles factores de virulencia, entre otros posibles criterios (ver más abajo) [120].



La aplicación de los criterios de selección de los candidatos basados en la localización y función permite llegar a un número de ORFs que va entre el 20 y el 30% del total contenido en los genomas. Este número de ORFs resulta así manejable experimentalmente en el laboratorio. Los candidatos seleccionados son luego clonados, expresados y purificados como proteínas recombinantes en *E. coli* para finalmente ser evaluados en su potencial inmunogénico y protector.

La vacunología reversa además de la economización de tiempo y recursos tiene como ventaja la posibilidad de ser aplicada incluso a microorganismos no cultivables. Como mencionamos al recorrer la historia de las vacunas, este ha sido uno de los mayores escollos en el desarrollo de las mismas. Otro adelanto novedoso de esta estrategia es que los

posibles candidatos vacunales pueden elegirse entre la totalidad de proteínas que un patógeno puede sintetizar, sin restringirse solo a las proteínas que se expresan en un cultivo *in vitro*. Esta metodología permite de esta manera trabajar con aquellas proteínas que sean expresadas únicamente durante la infección en el huésped.

Por último, queremos destacar un aspecto que normalmente no se menciona en la bibliografía al respecto, pero que podría constituir una ventaja experimental. En la aplicación de las metodologías clásicas para la búsqueda de inmunógenos individuales, ha sido frecuente el fraccionamiento de preparaciones del patógeno para comprobar luego el poder protector de cada una de estas fracciones (por ejemplo, en [121]). Luego de algunos pasos de purificación se cuenta con una preparación relativamente homogénea y las propiedades inmunogénicas pueden asignarse razonablemente a sus componentes mayoritarios. Si bien este razonamiento es perfectamente válido, en general resulta dificultoso comprobar la ausencia de contaminantes en una muestra que incluso pueden resultar tóxicos. En el caso de la vacunología reversa, al obtener los candidatos como proteínas recombinantes en *E. coli* en lugar de purificarlos directamente de un cultivo del patógeno, nos aseguramos que en la preparación no habrá factores contaminantes provenientes de éste último. Podemos pensar entonces que este sistema de prueba de candidatos podría simplificar el problema de asignar a un determinado antígeno individual el poder protector observado experimentalmente.

En la Tabla 4, tomada de una revisión del año 2003 sobre la metodología [116] se comparan algunos aspectos del abordaje clásico y de la vacunología reversa.

Vacunología convencional	Vacunología reversa
Restringida a los antígenos más abundantes	Todos los antígenos inmunogénicos
Restringida a los antígenos expresados <i>in vitro</i>	Antígenos expresados <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i>
Aplicable a microorganismos cultivables	Aplicable a microorganismos cultivables o no cultivables
Modelos animales esenciales	Modelos animales esenciales
Los correlatos de la protección son útiles	Los correlatos de la protección son necesarios
Antígenos maduros	Pueden incluirse formas no maduras de los antígenos
	El correcto plegado de las proteínas recombinantes puede ser importante
	La expresión y análisis de grandes cantidades de antígenos es importante
Pueden incluirse todos los componentes bacterianos	Restringida a antígenos proteicos

Tabla 4. Características sobresalientes de la metodología convencional o clásica y de la vacunología reversa. Fuente: Adu-Bobie, J., B. Capecchi, et al. (2003). *Two years into reverse vaccinology*. *Vaccine* 21(7-8): 605-10.

El primer paso de la estrategia

El caso testigo de la vacunología reversa lo constituye el trabajo de Pizza y colaboradores con *Neisseria meningitidis* grupo B, o meningococo B [122]. Este microorganismo puede colonizar el tracto respiratorio superior, sin causar enfermedad, hasta en el 10% de la población [123]. Sin embargo, las llamadas cepas hipervirulentas pueden ocasionalmente causar infecciones sistémicas, meningitis y hasta la muerte. En 1969 se pudo determinar que la protección contra este patógeno se correlaciona con el título de anticuerpos bactericidas en suero [124], una propiedad que puede medirse *in vitro*. Desde 1984 existen vacunas contra *N. meningitidis* formuladas en base a polisacáridos conjugados, sin embargo se ha encontrado que estas vacunas no son efectivas para el grupo etario más comúnmente afectado por las complicaciones de esta infección, que son los niños. Por otro lado, se presenta un problema adicional en el caso del serogrupo B: el polisacárido de cubierta sintetizado por este grupo bacteriano tiene una significativa similitud estructural con componentes celulares humanos. De usarse como vacuna sería probablemente poco inmunogénico o, peor aún, podría desencadenar una reacción auto inmune.

El grupo de Rino Rappuoli y Mariagrazia Pizza se propuso, entonces, desarrollar una nueva vacuna contra *N. meningitidis*, y el primer paso en su estrategia consistió en obtener la secuencia del genoma completo de la cepa MC58 de este microorganismo. A partir de la secuencia del genoma definieron los ORFs, y trabajaron sobre las secuencias peptídicas primarias resultantes. Usando algoritmos de predicción de la localización subcelular, eligieron 570 ORFs que, según estas predicciones, estarían localizados en la superficie del patógeno. Clonaron y lograron expresar y purificar 350 de estos ORFs, a partir de los cuales obtuvieron antisueros policlonales en ratones. Con los sueros así obtenidos, realizaron distintos ensayos *in vitro*: determinaron si los candidatos se encontraban accesibles a anticuerpos en la superficie del patógeno, midieron el poder bactericida contra *N. meningitidis*, y por último extendieron este ensayo a distintos aislamientos clínicos del microorganismo [122].

Como repasa Rappuoli en una revisión reciente [125], durante los años siguientes el mencionado grupo de investigación publicó varios artículos científicos en los que se reporta la caracterización de los candidatos identificados, algunos de los cuales están actualmente siendo evaluados en ensayos clínicos.

Otros ejemplos de aplicación de la vacunología reversa en bibliografía

Con posterioridad a este trabajo, se reportaron abordajes similares para otros patógenos, de los cuales resumimos algunas características en la Tabla 5 (páginas 46 y 47) [122, 126-139].

De esta tabla surge que todos los trabajos se han hecho sobre genomas bacterianos, para los cuales por un lado se dispone de las secuencias genómicas y, por el otro, de herramientas bioinformáticas confiables para la predicción de la localización subcelular⁹.

A continuación haremos una revisión y algunas consideraciones sobre estos trabajos y las metodologías utilizadas en cada uno, que nos permitirá fundamentar nuestra propia elección de un determinado esquema de trabajo. Aunque no todos los trabajos de la Tabla 5 cubren la secuencia completa de pasos de la estrategia, es decir desde la selección *in silico* a las pruebas de protección en animales, los hemos incluido para mostrar un espectro lo más amplio posible de estrategias de selección y ensayo de candidatos.

Dividimos la revisión de estas experiencias en cuatro aspectos: los criterios de selección *in silico*, las condiciones de obtención de los candidatos vacunales, los ensayos *in vitro*, y los ensayos *in vivo* realizados.

Criterios de selección *in silico* utilizados

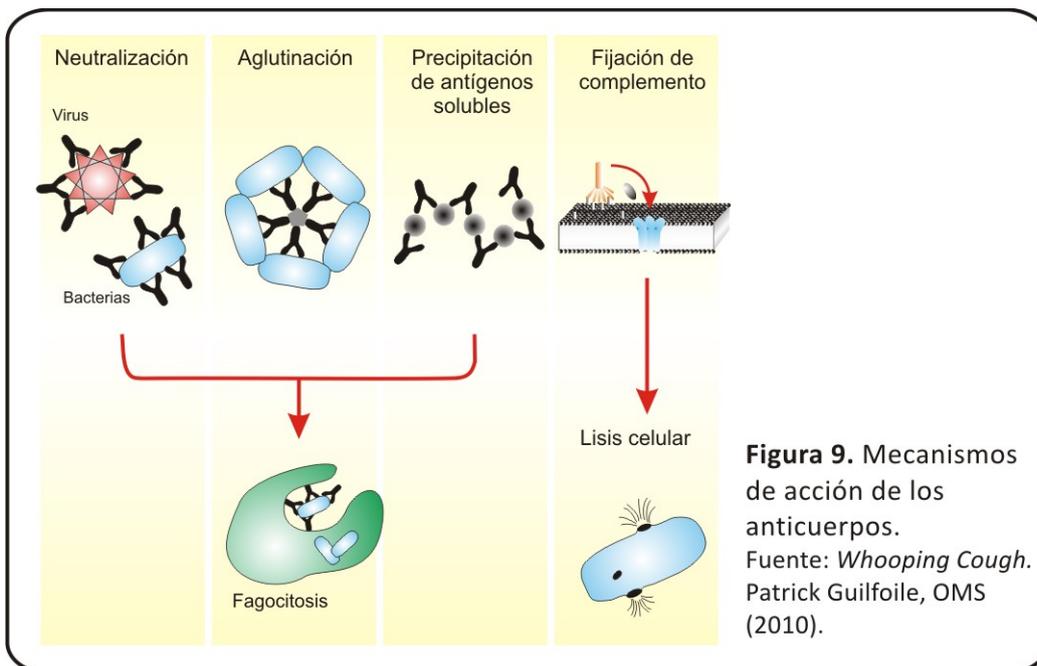
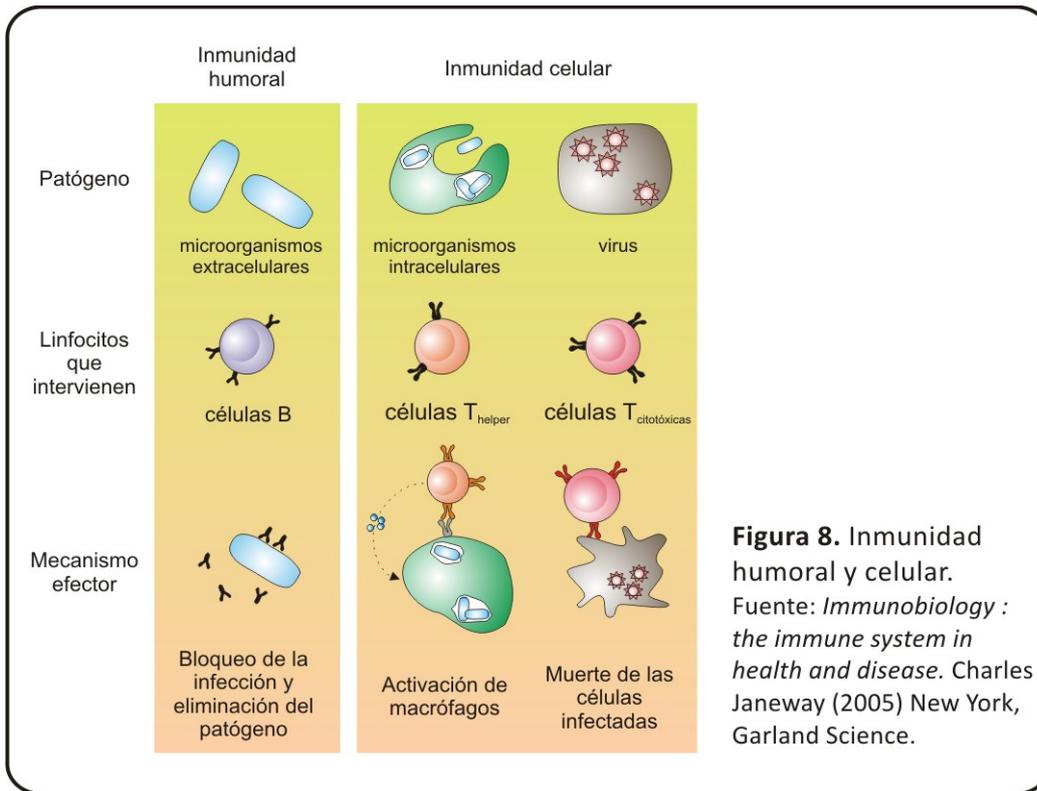
Como puede observarse en la Tabla 5, el criterio más comúnmente utilizado en la selección de candidatos es la predicción de una localización superficial en el patógeno. Esto responde al conocimiento que se tiene de los mecanismos de presentación antigénica que utiliza el sistema inmune. Las respuestas denominadas celulares podrían montarse contra cualquier antígeno del patógeno, ya que las células intervinientes presentan a los linfocitos T_H1 la batería de antígenos resultantes de su fagocitosis (Figura 8). Las respuestas humorales, en cambio, son montadas ante antígenos captados por las células B, que presentan aquellas moléculas internalizadas por medio de sus inmunoglobulinas de superficie [141]. Las células B, entonces, se ven limitadas a presentar los antígenos accesibles en la superficie de los patógenos encontrados en el medio extracelular (Figura 8). Los anticuerpos que se generan pueden luego actuar sobre el antígeno opsonofagocitándolo, neutralizándolo, o activando la vía clásica del complemento [141] todo ello siempre y cuando el antígeno sea accesible a los mismos (Figura 9). Es decir que una respuesta humoral solo tiene sentido si está dirigida contra antígenos accesibles como lo son los de superficie del patógeno.

⁹ Muy recientemente se han publicado los resultados de la aplicación de la vacunología reversa a parásitos protozoarios del género *Cryptosporidium* [140].

Referencia	Patógeno	Criterios de selección <i>in silico</i>	ORFs elegidos	ORFs expresados
Pizza, 2000	<i>Neisseria meningitidis</i> grupo B	Localización en superficie	570	350
Wizemann, 2000	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Localización en superficie Homología a factores de virulencia	110	97
Ross, 2001	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Localización en superficie Homología con proteínas de memb externa Presencia de determinados motivos proteicos	120	107
Montigiani, 2002	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Localización en superficie Homología con proteínas de memb externa Inmunógenos previamente descritos	141	124
Tettelin, 2002	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Localización en superficie	650	291
Ariel, 2003	<i>Bacillus anthracis</i>	Localización en superficie Homología con factores de virulencia ORFs ausentes en bacilos no patógenos	520	No realizan
Maione, 2005	<i>Streptococcus</i> grupo B	Localización en superficie en base a 8 genomas. Seleccionan 396 candidatos comunes a los 8 genomas y 196 de presencia variable.	589	312
Gamberini, 2005	<i>Leptospira interrogans</i>	Localización en superficie Homología a factores de virulencia	206	150
Yang, 2006	<i>Leptospira interrogans</i>	Localización en superficie, trabajan sobre 2 cepas secuenciadas	616	No realizan
Zhu, 2008	<i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i>	Localización en superficie ORFs activados en fase virulenta ORFs comunes a Bp y Bpp ORFs "nodales" en red de interacción de proteínas	191	No realizan
Moriel, 2009	<i>Escherichia coli</i> ExP	Localización en superficie ORFs ausentes en cepas no patógenas en humanos	230	220
Liu, 2009	<i>Streptococcus suis</i> serotype 2	Localización en superficie Homología a factores de virulencia Inmunógenos previamente descritos	153	8 (previamente reportados)
Song, 2009	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	Funcionalidad relacionada a virulencia (lipoproteínas, toxinas, proteínas asociadas al flagelo) Localización en superficie	19	14
Ge, 2010	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Lipoproteínas y proteínas ancladas en la pared celular. Eliminan candidatos con 2 o más dominios TM. ORFs con ortólogos en al menos otros dos <i>Streptococi</i> secuenciados	47	10
Hong, 2010	<i>Haemophilus parasuis</i>	Proteínas de superficie y secretadas Toman como base las proteínas identificadas en geles 2D	42	18

Tabla 5. Resumen de los trabajos publicados en los que se aplicó la estrategia de vacunología reversa.

Ensayos <i>in vitro</i>	ORFs seleccionados <i>in vitro</i>	Ensayos <i>in vivo</i> .	Candidatos protectivos/ candidatos evaluados <i>in vivo</i>	Candidatos protectores/ ORFs elegidos
Confirmación accesibilidad a Ac Poder bactericida de antisuero policlonal Presencia del gen en aislamientos	7	No realizan		
Realizan algunos como caracterización, no como criterios para filtrar los candidatos		Ensayo de protección en ratones	6 de 97	5,45%
WB con suero de ratón y conejo vacunados, y humanos convalescientes Confirmación accesibilidad a Ac Presencia del gen en aislamientos	40	Ensayo de protección en ratones	2 de 15	1,67%
Confirmación accesibilidad a Ac por FACS WB con suero de ratones vacunados	53	No realizan		
Confirmación accesibilidad a Ac por FACS WB con suero de ratones vacunados	55	No realizan		
No realizan				
No realizados como screening, confirman luego de ensayos <i>in vivo</i> la accesibilidad a anticuerpos y el poder bactericida del antisuero generado		Ensayo de protección en ratones.	4 de 312	1,28%
WB con suero de humanos convalescientes	16 de 100			
Presencia del ORF en aislamientos	4 de 10	No realizan		
Eliminan ORFs ausentes en aislamientos según CGH Seleccionan aquellos con mayor nivel de expresión <i>in vitro</i>	226	No realizan		
No realizan				
No realizan		Ensayo de protección en ratones	9 de 220	3,91%
No realizan		Ensayo de protección en ratones	4 de 8	No calculado (los candidatos evaluados surgen de conocimiento previo)
Presencia del ORF en aislamientos Reconocimiento por suero de cerdos inmunes Inmunogenicidad en ratones	6	Ensayo de protección en cerdos	0 de 4	0%
Confirmación accesibilidad a Ac Poder bactericida de antisuero policlonal	9	No realizan		
WB con suero de ratones vacunados con dos serotipos	4	No realizan		



Por otro lado, se sabe que los anticuerpos median las respuestas montadas por la mayoría de las vacunas actualmente en uso [142], lo que justifica esta preferencia en la selección de los antígenos superficiales.

Otro criterio compartido por varios de estos trabajos (6 de los 15 incluidos en la Tabla 5) es la identificación de secuencias con relativa similitud a factores de virulencia conocidos. El fundamento de este criterio es que los anticuerpos generados contra los factores de

virulencia pueden actuar evitando el establecimiento de la infección o bien alguno de los mecanismos de patogenia mediado por éstos (Figura 9).

Según un tercer criterio de selección, empleado en tres de los trabajos citados en la Tabla 5, los investigadores comparan genomas completos de bacterias patogénicas y no patogénicas relacionadas. La idea subyacente a este criterio es que los genes involucrados en la patogenicidad de un microorganismo serán aquellos que las cepas patogénicas posean con exclusividad respecto de las no patogénicas. Entre los casos de la Tabla 5 este criterio ha sido utilizada por Ariel (2003) [127], Maione (2005)[128], y Moriel (2009)[137]. En el primer caso –trabajando sobre el genoma de *Bacillus anthracis*- se toma como criterio de inclusión la ausencia de un determinado ORF en los genomas de bacilos no patógenos relacionados a *B. anthracis*. En el caso de Moriel y colaboradores, el criterio es en cambio de exclusión de candidatos. Al generar su lista de candidatos vacunales los autores eliminan aquellos ORFs que se encuentren en cepas no patógenas de *E. coli*, ya sea que estén o no presentes en la cepa patogénica contra la cual intentan la búsqueda de candidatos. Definen este criterio como “vacunología reversa sustractiva” [137]. Por último, En el trabajo publicado en 2005 por Maione y col., los autores comparan los genomas de 8 cepas patogénicas de *Streptococcus* grupo B, con el objetivo de identificar los ORFs comunes a todas ellas [128]. La extensión de esta idea al análisis de varios genomas ha sido denominada “pangenómica” [143]. Discutiremos algunas posibles implicancias de estos métodos de selección de candidatos vacunales en el próximo apartado, cuando establezcamos nuestro propio esquema de selección *in silico* (ver Selección *in silico* de los candidatos vacunales).

Obtención de los candidatos vacunales

Una vez elegidos los candidatos vacunales, la estrategia continúa con la obtención de los mismos como proteínas recombinantes. En todos los trabajos de la Tabla 5 en que se llega a este paso, la metodología elegida es el clonado de los ORFs de interés en plásmidos de expresión inducible en la bacteria *E. coli*. Este sistema permite obtener las proteínas recombinantes de manera relativamente rápida, y permite también la adición a la secuencia que codifica el potencial candidato vacunal de una marca que permite su posterior purificación por un procedimiento sencillo. En general esta metodología ha tenido muy buenos resultados. Como contracara de esta simplicidad, una desventaja inherente a la obtención de los candidatos como proteínas heterólogas es que el procesamiento postraduccional que podrían sufrir algunos candidatos en su organismo de origen no ocurra en *E. coli*. Como discutiremos más adelante, podemos pensar que las proteínas recombinantes actúan de alguna manera como modelos de sus análogas naturales.

Los candidatos vacunales se obtienen y utilizan como proteínas desnaturalizadas en todos los trabajos en que se reportan ensayos *in vitro* o *in vivo* (11 de los 15 trabajos de la Tabla 5). Esto podría tener consecuencias en cuanto a su inmunogenicidad, como también discutiremos más adelante.

Experimentos *in vitro*

El paso que sigue a la selección *in silico* y expresión y purificación de los candidatos es la realización de ensayos *in vitro* que permitan caracterizarlos. El objetivo general de estos ensayos es comprobar el poder protector en humanos de los candidatos vacunales obtenidos. En el trabajo con *N. meningitidis* descrito más arriba este rol lo cumple la correlación existente entre el poder bactericida de un antisuero y la protección en humanos. Como veremos al introducir los ensayos *in vitro* realizados en este trabajo (ver Selección *in vitro* de los candidatos vacunales) hay casos en los que no se cuenta con un correlato tan claro de la protección en humanos. Esto es de hecho lo que ocurre para la mayoría de los patógenos que son objeto de los trabajos resumidos en la Tabla 5. Como se desprende de dicha tabla, cada uno de estos ensayos resultó satisfactorio, en el sentido de que permitió identificar varios candidatos de entre los ensayados. Los tipos de ensayos más comúnmente utilizados son la inmunodetección con sueros de animales inmunizados con el patógeno inactivado por un lado, y la comprobación de la accesibilidad a los anticuerpos de los candidatos por el otro. En la Tabla 6 resumimos algunas características de los ensayos *in vitro* utilizados en los trabajos de vacunología reversa.

La información obtenida mediante los ensayos *in vitro* permite acotar el número de candidatos a ensayar en la fase siguiente. Esto es muy importante, porque una de las consecuencias de trabajar con el genoma como única referencia es que probablemente algunos de los candidatos inicialmente elegidos podrían no ser sintetizados por el patógeno en ninguna condición. El hecho de que un candidato vacunal sea por ejemplo reconocido por el antisuero de un animal inmunizado con el patógeno completo nos permitiría afirmar que este candidato estaba presente en la preparación que se utilizó en la inmunización, y por lo tanto sería expresado durante el crecimiento *in vitro*. Sin embargo, el no reconocimiento de un candidato por un antisuero -ya sea de animales inmunizados o de pacientes convalecientes- no nos autoriza de por sí a descartarlo: el hecho de que la respuesta generada por la infección natural o la vacunación con el patógeno completo no incluya anticuerpos contra un determinado candidato, no implica que el mismo no pueda ser inmunogénico y protector al ser administrado como vacuna. Esta situación ejemplifica que el paradigma de la vacunología reversa descansa entonces en sucesivos criterios de selección positiva, dejando a un lado -inevitablemente- candidatos cuyo potencial parcialmente se desconoce. En esta estrategia, descartar candidatos sin tener la certeza de que no servirían como antígenos vacunales no supone necesariamente un problema, siempre que se cuente con algunos candidatos con los que seguir adelante.

Volviendo a los distintos ensayos listados en la Tabla 6, vemos que el uso de sueros de humanos convalecientes tiene una ventaja sobre todos los demás, y es que nos informa de manera directa sobre la respuesta inmune del huésped durante la infección. El resto de las metodologías de *screening* involucran en su esquema experimental células del patógeno crecidas *in vitro* y dependen, por lo tanto, de que los candidatos vacunales ensayados se expresen en dicha condición. Por lo tanto, si bien la vacunología reversa permite contemplar en el análisis aquellos candidatos vacunales cuya expresión ocurre solamente *in vivo*, que esto sea realmente factible dependerá de la metodología de selección elegida.

Técnica	Metodología	Implicancias de los resultados	Usado en
Accesibilidad a anticuerpos	El ensayo consiste en medir la unión de anticuerpos contra el candidato a la superficie del patógeno. El suero anti-candidato es obtenido inoculando animales con la proteína recombinante purificada. Este suero puede emplearse como fuente de anticuerpos en ensayos de ELISA que tengan como antígeno células enteras del microorganismo crecidas <i>in vitro</i> , o bien mediante citometría de flujo	Un resultado positivo en este tipo de pruebas indica que el candidato se encuentra accesible a los anticuerpos.	7 de 11 trabajos
Presencia en aislamientos clínicos del candidato	Uso de sueros anti-candidato en ensayos de inmunodetección con proteínas totales de diferentes aislamientos clínicos del patógeno.	Para los candidatos expresados <i>in vitro</i> , un resultado negativo indicaría que el candidato no será efectivo como vacuna contra algunos aislamientos, quedando abierta la posibilidad de que el mismo forme parte de una vacuna con componentes adicionales que lo complementen.	4 de 11 trabajos
Poder bactericida del suero anti-candidato	Los sueros anti-candidato individual se obtienen por inmunización de animales. Se ensaya luego el poder bactericida de los sueros así obtenidos mediante la incubación del suero con el microorganismo y el posterior recuento de microorganismos viables. La lisis bacteriana depende, en estos ensayos, de la activación de la vía clásica del complemento.	Es el ensayo de elección en el primero de los abordajes por vacunología reversa, en el cual un resultado positivo correlaciona con la protección en humanos	3 de 11 trabajos
Inmunodetección de candidatos vacunales con suero policlonal anti-antígenos totales.	Se inoculan animales con una preparación del microorganismo inactivado, generando un antisuero que es enfrentado a los candidatos purificados.	Los candidatos reconocidos: estarían siendo expresados por el microorganismo en el cultivo <i>in vitro</i> ; tendrían poder inmunogénico; serían accesibles a la presentación por células B; y serían capaces de generar una respuesta inmune en el contexto de los demás antígenos presentes (es decir, no serían inmunodominados por otros antígenos de la preparación)	5 de 11 trabajos
Inmunodetección con sueros de humanos convalecientes	Los candidatos purificados son enfrentados a sueros de pacientes convalecientes y sueros control, para evaluar el reconocimiento diferencial de los mismos	Los candidatos reconocidos serían expresados <i>in vivo</i> durante la infección natural en humanos. Aquellos candidatos reconocidos por sueros de pacientes, pero no por los sueros de animales inmunizados con el microorganismo completo, corresponderían a proteínas expresadas únicamente <i>in vivo</i> .	2 de 11 trabajos

Tabla 6. Ensayos *in vitro* utilizados en las aplicaciones de vacunología reversa de la Tabla 5.

Ensayos *in vivo*

Una vez obtenida la lista depurada de candidatos vacunales mediante la selección *in silico* y los ensayos *in vitro*, los candidatos que siguen en pie se evalúan en modelos animales de protección. Este paso es definitorio en la estrategia porque para muchas patologías existen buenos modelos animales que permiten correlacionar de manera confiable sus resultados con la protección en humanos. En seis de los trabajos mencionados en la Tabla 5 los autores utilizan modelos animales de protección, en la mayoría de los casos modelos murinos.

Con la identificación de los candidatos vacunales efectivos en el modelo animal concluye la vacunología reversa propiamente dicha. A modo de comentario y para contextualizar los objetivos de nuestro trabajo debemos decir que esto no implica el logro de una nueva vacuna, sino que este sería el punto inicial del desarrollo el cual contempla varios aspectos técnicos incluyendo los que hacen a la formulación. Esto es la forma de obtención de los inmunógenos (recombinante o a partir de cultivos del microorganismo), la forma de presentación (nativa o desnaturalizada), el uso de adyuvantes, las vías de administración, la combinación con otros antígenos, el número de dosis y cantidades a utilizar, etc. Se completarían luego ensayos preclínicos para luego pasar a los ensayos clínicos de fase I, II, III y IV.

Resumen numérico de los trabajos

Como puede verse también en la Tabla 5, en todos los casos mencionados se parte de genomas bacterianos, que tienen algunos miles de marcos de lectura abierta totales. El análisis bioinformático reduce este número unas 10 veces, quedando un conjunto de entre 100 y 600 candidatos. Luego de las distintas etapas de selección *in vitro* e *in vivo*, en los trabajos descriptos el porcentaje de candidatos finalmente protectores en algún modelo animal varía entre un 1% y un 6% de los candidatos expresados.

Aplicabilidad de la estrategia para *B. pertussis*

Hacia el final de la sección anterior nos referimos a la conveniencia de contar con un repertorio de inmunógenos definidos contra *B. pertussis* más amplio que el actualmente incluido en las vacunas. En este apartado nos proponemos analizar brevemente la factibilidad de la aplicación de la vacunología reversa como estrategia para la identificación de posibles inmunógenos de *B. pertussis*. Cada uno de estos aspectos será retomado luego al analizar los resultados obtenidos en cada paso del trabajo realizado y aquí presentado.

Los genomas completos de las cepas de referencia *B. pertussis* Tohama I, *B. parapertussis* 12822 y *B. bronchiseptica* RB50 están disponibles desde 2003 [100]. Desde el

punto de vista de los criterios de selección *in silico*, se cuenta con algoritmos confiables para la predicción de la localización subcelular de proteínas para bacterias gram negativas como las del género *Bordetella*, según analizaremos en la próxima sección de este trabajo.

En el caso de *B. pertussis* el empleo de la vacunología reversa nos permitiría tener en cuenta desde el comienzo la problemática planteada respecto de la divergencia de cepas [103]. En particular, como desarrollaremos con algún detalle al referirnos a la selección *in silico*, se ha reportado que algunos ORFs están ausentes en los genomas de aislamientos clínicos recientes de *B. pertussis*. La aplicación de una estrategia como la vacunología reversa resulta adecuada, porque nos permite tomar esta información en cuenta desde un principio, evitando elegir candidatos cuya presencia no sea ubicua entre los aislamientos estudiados.

El aspecto distintivo de la vacunología reversa es la posibilidad de identificar antígenos exclusivos del crecimiento *in vivo*. Esto puede resultar interesante en el caso de *B. pertussis*, ya que algunos de sus determinantes antigénicos solo aparecen en el huésped natural como ha sido recientemente reportado por nuestro grupo para el sistema de secreción tipo III [144].

El posterior análisis de los posibles candidatos mediante ensayos *in vitro* debe evaluarse con cuidado para el caso de *B. pertussis*, dado que no existe un ensayo que permita correlacionar en forma directa sus resultados con la protección en humanos, como sí lo había en el caso de *N. meningitidis*. Este hecho, en cierta medida, limita las implicancias de demostrar que un determinado antígeno sea reconocido por un suero obtenido por alguno de los procedimientos mencionados. La presencia de anticuerpos específicos contra el candidato en sueros de ratones vacunados o infectados sería aún así informativa, como hemos discutido más arriba.

En cuanto a los sueros humanos como herramienta de selección de candidatos, se sabe que la infección por *B. pertussis* genera una respuesta humoral en la que el título de anticuerpos específico para *Bordetella* aumenta varias veces en las semanas posteriores a la infección [145]. Este es el fundamento del ensayo de seroconversión utilizado como criterio diagnóstico de pertussis en el laboratorio. En base a este conocimiento, utilizaremos en este trabajo sueros de pacientes con diagnóstico de tos convulsa para seleccionar aquellos candidatos que sean reconocidos por los mismos.

Por último, la evaluación de los candidatos en ensayos *in vivo*, un paso determinante de la estrategia, puede hacerse en un modelo de protección en ratones cuyos resultados correlacionan con la eficacia de las vacunas en humanos [146]. El modelo consiste en efectuar un desafío subletal por vía intranasal, y posteriormente cuantificar las unidades formadoras de colonias presentes en un homogenado de pulmón.

En resumen, la vacunología reversa es un abordaje válido para buscar nuevos inmunógenos de *B. pertussis*, que puede resultar complementario de otras metodologías. Existe para la evaluación de los candidatos un modelo aceptado en animales. En trabajos publicados trabajando con otros patógenos se ha reportado que entre un 1% y un 6% de los candidatos ensayados proporcionan algún nivel de protección en modelos animales.

2

Capítulo segundo

Aplicación de la vacunología reversa
al caso de pertussis

Selección *in silico* de los candidatos vacunales
a partir del genoma de *B. pertussis* Tohama I

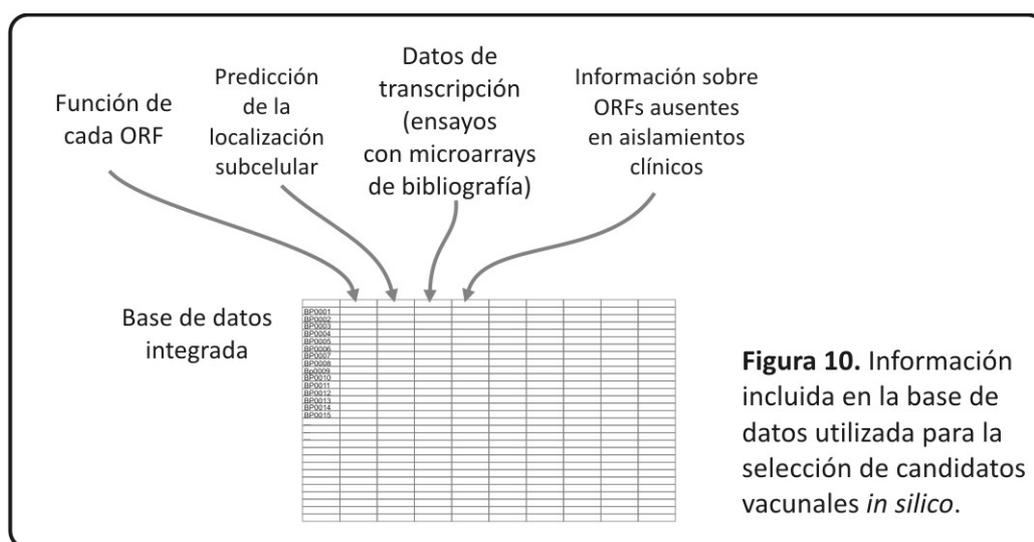
Introducción

En este segundo capítulo de la Tesis presentamos el trabajo que hemos realizado aplicando la estrategia de la vacunología reversa al caso particular de *B. pertussis*. Comenzamos en esta sección con el trabajo *in silico* a partir del cual definimos nuestro grupo de candidatos vacunales. El punto de partida es la publicación de los genomas de *B. pertussis*, junto a los genomas de las otras dos especies de *Bordetella* más estudiadas (*B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*) y consideradas en su conjunto “clásicas” [100].

En la selección de los candidatos utilizamos tres fuentes de datos. En primer lugar la secuencia genómica de *B. pertussis* Tohama I, disponible en el sitio web del Instituto Sanger, que incluye además de las secuencias datos sobre la funcionalidad de cada ORF. Como veremos más adelante, la función de un ORF es asignada en el proceso de anotación del genoma en base a su homología con proteínas presentes en bases de datos. Esta información puede ser relevante a nuestros objetivos permitiéndonos vincular un ORF directamente a una función relacionada a la virulencia, o de forma algo más indirecta informándonos sobre por ejemplo su localización subcelular. En segundo lugar incorporamos en la selección la información recopilada de bibliografía, en donde se presentan los resultados de una serie de trabajos con microarreglos de ADN realizados para conocer la

distribución de cada gen entre los aislamientos circulantes por un lado, y para medir sus niveles de expresión relativos en diferentes condiciones, por el otro. La presencia de un ORF en la población bacteriana circulante es una condición obvia, aunque no suficiente, para que el mismo pueda ser usado efectivamente como un inmunógeno. Por otro lado, el hecho de conocer que un determinado ORF es expresado en mayor proporción durante una determinada condición nos permite hipotetizar que el mismo pudiera tener un rol en el establecimiento de la infección. Por último, tomamos en cuenta la información obtenida utilizando programas de computación para predecir la localización subcelular de cada ORF del genoma. Como ya hemos mencionado, la localización de los candidatos en la superficie del patógeno es un requisito para una respuesta humoral efectiva y por lo tanto este criterio es uno de los más comúnmente utilizados en la selección de candidatos *in silico*.

La metodología seguida consistió así en integrar en una única base de datos la información proveniente de las tres fuentes para cada ORF (Figura 10). Con esta información procedimos a seleccionar –en base a combinar diferentes criterios- aquellos candidatos con los que comenzar el trabajo *in vitro*.



El material de partida es la secuencia genómica disponible desde el año 2003 para tres especies del género *Bordetella*: *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, y *B. pertussis* [100]. Las cepas elegidas para la secuenciación fueron la cepa Tohama I de *B. pertussis* (un aislamiento recuperado en Japón en 1954), la cepa 12822 de *B. parapertussis* (un aislamiento humano recuperado en Alemania, en 1993), y la cepa RB50 de *B. bronchiseptica* (un aislamiento de conejo). No se ha descrito la presencia de plásmidos replicativos para ninguna de estas tres cepas bacterianas, por lo que las secuencias se refieren a un único cromosoma. Algunos de los resultados del análisis comparativo de las tres secuencias se encuentran resumidos en la Tabla 7, elaborada en base a los datos disponibles en el sitio web del Instituto Sanger [147].

Como puede verse en la tabla, el genoma de *B. bronchiseptica* es el de mayor longitud, con 5.338 kilopares de bases y 5.008 secuencias codificantes. Por su parte, el genoma de *B. pertussis*, con 4.086 kilopares de bases y 3.806 secuencias codificantes, contiene el mayor número de secuencias de inserción repetitivas, ausentes en la secuencia de *B. bronchiseptica* (ver Tabla 7). La presencia de estas secuencias ha dado lugar a una hipótesis sobre el proceso evolutivo seguido por esta especie bacteriana. Específicamente se ha planteado la hipótesis que las tres especies bacterianas evolucionaron a partir de un ancestro común, que habría sido similar a *B. bronchiseptica*.

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Tamaño genoma	4.086.186	4.773.551	5.338.400
%G+C	67,72	68,1	68,07
Número de ORFs*	3806	4402	5008
Pseudogenes	359	220	18
Longitud promedio del ORF (pb)	978	987	978
operones ARNr	3	3	3
ARNt	51	53	55
IS481	238	0	0
IS1001	0	22	0
IS1002	6	90	0
IS1663	16	0	0

Tabla 7. Resumen cuantitativo de los genomas de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*.

El conocimiento de la secuencia genómica completa de un microorganismo puede, en principio, explicar algunos aspectos de su biología. Por ejemplo, en el trabajo de Parkhill y col. se describen rutas metabólicas en las que algunas de las secuencias que codifican para las enzimas intervinientes se encuentran presentes como pseudogenes permitiendo explicar así su imposibilidad para fermentar glucosa. Por otro lado, disponer de la secuencia de un genoma completo hace posible además la aplicación de múltiples técnicas que permiten estudios funcionales. Ejemplos de estos estudios son la transcriptómica y la hibridación genómica comparativa (CGH) descritas más abajo, y también la proteómica o la misma vacunología reversa, nuestra estrategia de trabajo.

Construcción de una base de datos unificada para la selección *in silico* de candidatos

Con este material comenzamos a realizar el primer paso del proceso de selección de los candidatos que consistió en la construcción de una base de datos que unifica la información de diferentes fuentes. Comenzaremos describiendo los tipos de datos obtenidos del sitio del Instituto Sanger, donde se encuentra alojada la secuencia genómica de *B. pertussis* [147]. Esta información incluye, además de la propia secuencia de cada marco de lectura abierto u ORF predicho en el genoma, características del posible producto como ser

el peso molecular, el punto isoeléctrico calculado, y la similitud encontrada con otras proteínas presentes en la base de datos Swissprot al año 2003 [148]. En cuanto a la funcionalidad de cada potencial polipéptido, en el mismo sitio se incluye una clasificación de cada ORF utilizando las categorías establecidas por Monica Riley en 1993 para *E. coli* [149].

El número total de secuencias de *B. pertussis* Tohama I es de 3.806, de las cuales 362 se encuentran interrumpidas. Estas secuencias interrumpidas son denominadas pseudogenes porque aunque pueden reconocerse como codificantes, las inserciones o deleciones que presentan hacen que en principio no puedan traducirse en péptidos funcionales. El genoma de *B. pertussis* Tohama I contiene entonces 3.444 secuencias codificantes completas. A su vez, hay presentes en este genoma 260 secuencias designadas como poseedoras de “funciones relacionadas a transposones”, que incluyen las secuencias de inserción repetitivas (o IS) que mencionamos más arriba, y que son en la mayoría de los casos las que se encuentran interrumpiendo la secuencia de los pseudogenes mencionados. Estas 260 secuencias son en realidad muchas repeticiones de 3 secuencias de inserción distintas (238 son copias de la secuencia IS481, 16 de IS1663 y 6 de IS1002). A los efectos de considerar la cobertura o eficiencia sobre el genoma de *B. pertussis* de los análisis discutidos a continuación, consideraremos únicamente las secuencias no repetidas. Además de las citadas secuencias de inserción, hay tres ORFs que se encuentran duplicados en este genoma. El número de ORFs no interrumpidos ni repetidos resulta así 3.209, habida cuenta de que algunos de los ORFs pertenecen a más de uno de los mencionados grupos.

Además de la información referida a las propiedades de cada secuencia mencionadas, cada ORF tiene asociado también un campo denominado “Descripción” en el que figura el nombre que se le ha asignado. Esta descripción es anotada en forma automática por programas informáticos en base a una comparación de cada secuencia con bases de datos de proteínas de función conocida. De las 3.209 secuencias del genoma, casi un 65% (2.070) incluyen en su descripción alguno de los términos “putativo”, “probable”, o “hipotético”. Esto refleja que para este porcentaje de las secuencias no se tenían, en el momento de la publicación del genoma, evidencias concluyentes que permitieran asignarles una función determinada.

Como mencionamos, en este mismo sitio se incluye una clasificación funcional de cada ORF basada en las categorías propuestas por Riley para *E. coli*. Existen otros sistemas de categorías funcionales de genes y proteínas de uso más extendido como por ejemplo la denominada GeneOntology. Sin embargo, esta categorización funcional tiene la ventaja de ser exclusiva de bacterias, y es por lo tanto más específica e informativa. Se trata de una clasificación jerárquica, con seis categorías principales: Metabolismo intermedio, Síntesis de pequeñas moléculas, Metabolismo de macromoléculas, Estructura celular, Procesos celulares, y Otras funciones. Estas categorías se subdividen luego en 59 categorías

secundarias, que a su vez se dividen en categorías terciarias. Según esta clasificación, cada ORF puede pertenecer únicamente a una categoría. En la mencionada base de datos cada ORF, incluso los pseudogenes, tienen asignada una categoría de Riley. En los casos en que esta asignación no puede hacerse debido a la poca información disponible, el ORF resulta incluido en la categoría de “función desconocida”.

Los 3.209 ORFs de *B. pertussis* se encuentran distribuidos en 113 categorías de Riley terciarias distintas. En la Tabla 8 presentamos la distribución de los 3.209 ORFs en estas categorías funcionales. Para simplificar la presentación, y aprovechando que estas categorías están definidas en forma jerárquica, hemos agrupado en la Tabla 8 a los ORFs de *B. pertussis* según su pertenencia a los dos primeros niveles de categorías. En este ordenamiento, los 3.209 ORFs se distribuyen en 22 grupos, según se presenta a continuación:

Categorías de Riley		nº ORFs
Principales	Secundarias	
1. Procesos celulares	1.1 Quimiotaxis y movilidad	45
	1.2 Replicación cromosomal	1
	1.3 Chaperonas	22
	1.4 Detoxificación y respuesta protectora	25
	1.5 Transporte y unión de metabolitos	345
	1.6 Adaptación al estrés	60
	1.7 División celular	20
Total 1		518
2. Metabolismo de macromoléculas	2.1 Degradación de macromoléculas	46
	2.2 Síntesis de macromoléculas	189
Total 2		235
3. Metabolismo de moléculas pequeñas	3.1 Metabolismo de aminoácidos	98
	3.2 Metabolismo de cofactores	87
	3.3 Metabolismo intermedio	76
	3.4 Modificación de AAs, ácidos grasos y cadenas carbonadas	110
	3.5 Fermentación y respiración	121
	3.6 Síntesis de ácidos grasos	21
	3.7 Síntesis de bases nitrogenadas	27
Total 3		540
4. Componentes estructurales	4.1 Componentes estructurales de membrana y de superficie	602
	4.2 Relacionados a ribosomas	55
Total 4		657
5 Relacionados a fagos, transposones e islas de patogenicidad		81
6 Funciones regulatorias generales		282
7 No clasificados		339
0 Función desconocida		557
Total		3209

Tabla 8. Clasificación de los ORFs de *B. pertussis* en las categorías funcionales de Riley. En esta tabla no se han incluido los pseudogenes ni las copias múltiples de un mismo ORF.

A los efectos de nuestro trabajo, nos hemos focalizado en aquellas proteínas potencialmente involucradas en la patogenicidad y/o expuestas en la superficie. En base a

estos criterios confeccionamos un listado de estas categorías definidas incluyendo el número de ORFs presentes en cada una (Tabla 9). Entre las categorías funcionales elegidas tomamos por un lado las que denotan funciones relacionadas al transporte e intercambio de distintas sustancias de la célula con su medio exterior dada su posible exposición en la superficie bacteriana. Este conjunto de ORFs es un grupo relativamente heterogéneo de casi 350 secuencias.

Por otro lado, incluimos una serie de categorías cuyas denominaciones señalan una localización superficial para los ORFs en ellas incluidas. Estas categorías suman otros 360 candidatos. El resto de los ORFs seleccionados en base a este primer criterio corresponden a otras dos categorías, una que agrupa secuencias relacionadas a la patogenicidad y la otra que incluye ORFs relacionados a las respuestas al medio ambiente y el metabolismo del hierro. Los ORFs de ambas categorías podrían estar implicados en el proceso infeccioso *in vivo*. El total de secuencias pertenecientes a la suma de las categorías definidas como de interés es de 794 de los 3.209 ORFs, aproximadamente una cuarta parte del total de ORFs (Tabla 9).

Código Riley	Descripción	Total ORFs	Porcentaje
1.3	Chaperonas	22	0,69%
1.5	Entrada y salida de nutrientes y desechos	345	10,75%
1.6	Adaptaciones/respuesta al medio y almacenamiento de Fe	60	1,87%
4.1.0	Periplasmáticas/ exportadas/ lipoproteínas	274	8,54%
4.1.3	Constituyentes de membrana externa	20	0,62%
4.1.4	Proteínas relacionadas a Polisacáridos de superficie y antígenos	37	1,15%
4.1.5	Estructuras de superficie	8	0,25%
5.1.5	Relacionados a patogenicidad	28	0,87%
Total de ORFs en categorías de interés		794	
ORFs no repetidos, excluyendo pseudogenes		3209	24,74%
Total de ORFs de <i>B. pertussis</i> Tohama I		3806	20,86%

Tabla 9. Distribución de los ORFs de *B. pertussis* en las diferentes categorías de Riley definidas como de interés en nuestro trabajo.

Continuamos con la selección de los candidatos incorporando datos provenientes de ensayos con microarreglos de ADN que recopilamos de la bibliografía que fue apareciendo a lo largo del desarrollo de nuestro trabajo.

Los ensayos sobre *B. pertussis* realizados con esta tecnología pueden dividirse en dos grupos: aquellos que indagan sobre la presencia o ausencia de los ORFs de la cepa secuenciada en diferentes aislamientos clínicos por un lado, y aquellos que determinan el nivel de transcripción relativo de cada ORF en dos condiciones comparadas por el otro.. Como se muestra a continuación hemos tomado información de ambos abordajes para realizar la selección:

i) Inclusión de los ORFs transcriptos diferencialmente en la fase virulenta de B. pertussis

De manera general los ensayos de expresión diferencial se realizan utilizando como material para la hibridización en el microarreglo, ADN obtenido por retrotranscripción de ARN mensajero. Este ARN se purifica de las diferentes condiciones que se quiere comparar. Dado que este tipo de experimentos permite medir los niveles relativos de expresión de cada transcripto, es posible identificar aquellos ORFs que cambian sus niveles de expresión entre las condiciones ensayadas. Para *B. pertussis* se han publicado resultados de varios de estos experimentos en los que se exploran distintas condiciones: cambios de fase de crecimiento, presencia o ausencia de determinados nutrientes, contacto con células humanas, entre otros [150-153]. Algunas de las condiciones específicas ensayadas pueden ser de especial utilidad para la vacunología reversa, como veremos a continuación.

En particular en nuestro trabajo analizamos los datos comparativos obtenidos entre la fase fenotípica de *B. pertussis* conocida como virulenta vs fase fenotípica de no virulencia o avirulenta. Para la comprensión del significado de fase virulenta y fase avirulenta puede remitirse al Recuadro 3 de esta presentación.

Recuadro 3. Fases de crecimiento en *Bordetella*

En *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, la expresión de la mayoría de los factores de virulencia conocidos se encuentra regulada por un sistema de dos componentes llamado BvgAS (por *Bordetella* virulence genes) [154-156]

Esta regulación se denomina modulación fenotípica, designándose a las bacterias que expresan los factores de virulencia como Bvg+ o virulentas. La fase opuesta se denomina como de avirulencia y se designa Bvg-. Entre estos dos fenotipos existen, además, una serie de fenotipos intermedios, que presentan la expresión simultánea de proteínas características de ambas fases e incluso de proteínas propias de una fase descrita como intermedia. Experimentos realizados con mutantes de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* bloqueados en las fase Bvg+ o Bvg- permitieron establecer que la fase Bvg+ es necesaria y suficiente para que se desarrolle la infección, mientras que la fase Bvg- sería incapaz de iniciar la infección [157].

El sistema de dos componentes está compuesto por un sensor BvgS que ante determinadas señales del entorno inicia una cascada de fosforilaciones que terminan en la activación de la proteína efectora BvgA. La proteína BvgA tiene la propiedad de unirse al ADN de la bacteria en determinadas zonas, promoviendo la expresión de un conjunto de genes (llamados genes *vag* o *virulence activated genes*) [158]. Uno de estos *vag*, el producto del gen BvgR, tiene a su vez actividad inhibitoria sobre la expresión de otro conjunto de genes, denominados *vrg* o *virulence repressed genes*.

A pesar de conocerse con detalle el mecanismo molecular de este sistema de dos componentes, no se conocen aún las señales moduladoras de este sistema *in vivo*. En condiciones *in vitro* a una temperatura de crecimiento de 37°C predomina la fase virulenta y se observa la transcripción de los factores de virulencia. La adición al medio de MgSO₄ o ácido nicotínico determina la modulación hacia la fase avirulenta.

El primer experimento comparativo entre las dos fases fue realizado cuando solo estaba disponible un borrador del genoma y se limitó a analizar un total de 200 ORFs [152]. En un experimento posterior [151] se analizó la expresión diferencial de genes en cepas mutantes constitutivas en la expresión de la fase fenotípica virulenta. Los investigadores encontraron un total de 262 ORFs que estando presentes en el genoma de *B. pertussis* Tohama I se veían sujetos regulación del sistema de dos componentes denominado BvgAS que media el cambio de fase virulenta -avirulenta.

A los efectos de la selección de candidatos, de estos 262 ORFs regulados positivamente por el sistema BvgAS debemos descontar aquellos que son en realidad pseudogenes o secuencias repetidas, con lo que este número se reduce a 239 ORFs.

ii) Exclusión de ORFs ausentes en aislamientos clínicos

Para estudiar la presencia o ausencia de ORFs en aislamientos clínicos, el genoma completo de la cepa a ensayar es digerido con enzimas y marcado con el fluoróforo, y luego enfrentado al microarreglo. Luego de un tiempo en condiciones que favorezcan la hibridación entre el ADN ensayado y el microarreglo, éste se lava para quitar las porciones de muestra que no se han unido a la placa. Todos los ORFs en común entre la cepa de referencia y la cepa en estudio darán una señal. En cambio, no habrá hibridación (ni señal) en los marcadores correspondientes a los ORFs que se encuentren en la cepa de referencia, pero no en la cepa ensayada. Este tipo de experimentos no permite, por su diseño, identificar secuencias que sean exclusivas de cepas distintas de la de referencia (en base a la cual se elaboran los ADN de prueba). Desde la perspectiva de la vacunología reversa, estos experimentos son particularmente útiles porque permiten descartar aquellos candidatos seleccionados sobre el genoma de la cepa de referencia que, por algún motivo, no se encuentren presentes en los aislamientos circulantes. Se han publicado los resultados de varios de ensayos de este tipo, realizados con cepas de *B. pertussis* [105, 150, 159-163].

Del mismo modo que en el apartado anterior, recopilamos datos bibliográficos referidos a experimentos de hibridación comparativa que nos permitieran obtener esta información. A continuación resumimos los esquemas experimentales de los trabajos de donde provienen los resultados recopilados.

El primero de estos experimentos, realizado por Brinig y colaboradores fue publicado en 2006 [150]. En este trabajo los autores comparan 137 cepas aisladas en distintos periodos y zonas geográficas, en busca de “regiones de diferencia” (RD). Estas regiones de diferencia se definen como aquellas porciones cromosómicas que, estando presentes en el genoma de referencia en base al cual se construyó el microarreglo, no se encuentran en las cepas comparadas. Análisis similares, pero restringidos a aislamientos franceses en un caso [160] y finlandeses en el otro [161] fueron publicados por grupos de esos dos países. Más adelante,

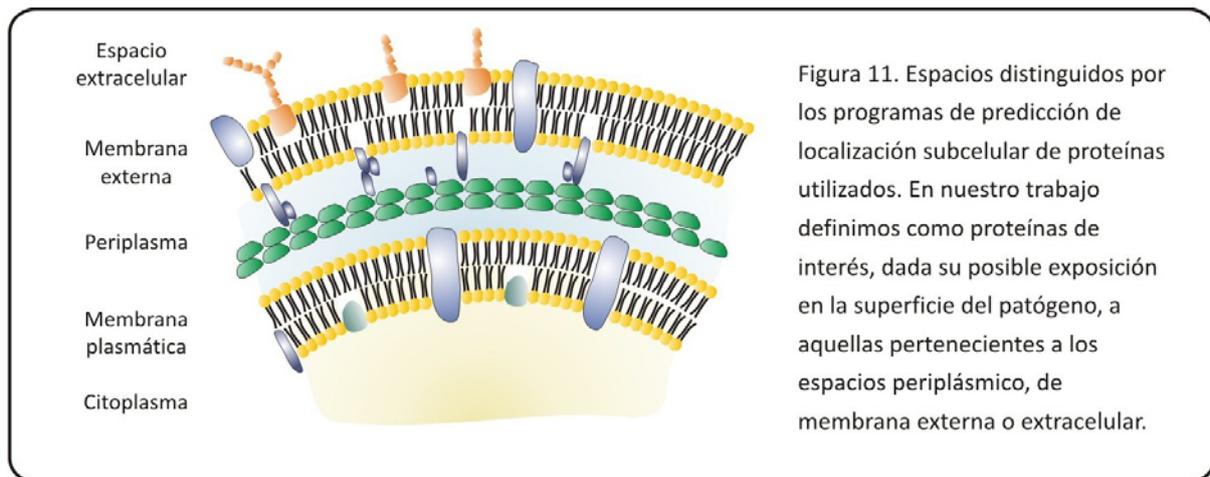
en 2008, los datos anteriores se completaron con ensayos que incluyeron tanto cepas francesas como finlandesas [159], y por otro lado cepas holandesas [162]. Esta misma estrategia comparativa fue utilizada por el grupo de Nicole Guiso para analizar las cepas aisladas en Senegal entre 1991 y 1995, país que, como ya mencionamos, la vacunación masiva comenzó a realizarse recién en 1987 [105]. El más reciente de estos trabajos, publicado por el grupo de Mooi en 2010, involucra un análisis comparativo de 171 cepas de distintos orígenes geográficos y temporales [163].

Los ensayos de este tipo han permitido, como se describió más arriba, identificar aquellos ORFs cuya presencia no es ubicua entre los aislamientos de *B. pertussis*. En función de nuestro objetivo, estos ORFs deben ser -en lo posible- evitados como candidatos vacunales. Al solapar los resultados de los distintos experimentos, encontramos que el número total de ORFs cuya presencia no es ubicua es de 523. Descontando los pseudogenes y secuencias repetidas, el número de ORFs de presencia variable es de 447 sobre un total de 3.209.

La base de datos sobre la que seleccionar los candidatos vacunales inicialmente contaba con la información obtenida del sitio web del Instituto Sanger (secuencias, funcionalidad, etc.). A esta base agregamos en este punto la información sobre los 239 ORFs regulados positivamente por el sistema BvgAS, así como los 447 ORFs de presencia variable en aislamientos clínicos.

El tercer y último conjunto de datos que incorporaremos surge de la utilización de algoritmos informáticos para la predicción de la localización subcelular de cada ORF del genoma. Este criterio responde a que desde el punto de vista inmunológico la respuesta que una proteína puede generar no es independiente de su localización subcelular. Las proteínas expuestas en la superficie bacteriana serán, en principio, los blancos reconocidos tanto por la respuesta humoral como por la celular, mientras que los antígenos no accesibles podrán ser objeto únicamente de respuestas de tipo celular. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que la mayoría de las vacunas actualmente en uso se basan en la acción de anticuerpos protectores, focalizaremos nuestro trabajo hacia los candidatos que serían accesibles en la superficie, siguiendo en este aspecto los pasos de los trabajos reseñados en la Tabla 5.

B. pertussis es una bacteria gram negativa, grupo para el cual la definición de “espacios” subcelulares más habitual distingue entre el citoplasma, la membrana interna, el periplasma, la membrana externa y por último el espacio extracelular (Figura 11). Una vez generadas las predicciones para cada ORF, el criterio que utilizaremos será tomar como “superficie” las tres localizaciones más externas. En principio, entonces, nuestra lista de candidatos debe incluir a todos aquellos ORFs que codifiquen para proteínas periplásmicas, de membrana externa o bien exportadas.



Para obtener esta información, utilizamos algoritmos informáticos que basados en la secuencia primaria predicen la localización subcelular. Al momento de elegir qué programa utilizar consideramos varios de entre los de libre acceso [164-176], y escogimos finalmente dos de ellos.

En esta elección priorizamos en primer lugar la fiabilidad del resultado, de manera de minimizar los falsos positivos. Según ese criterio descartamos utilizar aquellos programas que fuerzan necesariamente una predicción asignando cada ORFs a alguna localización, aún en los casos en que la información sea pobre o insuficiente. Estos programas dan una cobertura, expresada como porcentaje de secuencias para las cuales el programa asigna una localización, que por definición es del 100%, pero necesariamente cometen más errores que aquellos que pueden dar como una respuesta posible una “localización desconocida”.

Como un segundo criterio en la elección de los programas consideramos la cobertura reportada por los autores de cada uno sobre otros genomas bacterianos. Por último, priorizamos aquellos programas que brindaran la posibilidad de procesar varias secuencias en simultáneo, dado que en nuestro esquema es necesario obtener esta información para la totalidad del genoma.

De entre los programas analizados elegimos dos de ellos, llamados PSORTb 2.0 [177, 178] y Proteome Analyst (PA) [179]. En esta elección tuvimos en cuenta que, por su forma de funcionamiento, estos dos programas utilizan distintos aspectos de la información, como veremos a continuación. Ambos programas logran además muy buenas coberturas por separado (superiores al 50%). El propósito de usar dos programas fue entonces llegar a un porcentaje de cobertura mayor, basándonos en la idea de que como ambos programas se basan en información de distinta índole, sus predicciones serían parciales pero no completamente redundantes. Como criterio adicional para utilizar estos dos programas podemos citar que ambos utilizan las mismas 5 localizaciones subcelulares: citoplasma, membrana interna, periplasma, membrana externa y espacio extracelular.

Con posterioridad a nuestra elección este criterio ha sido recomendado por los autores del paquete PSORT [180, 181]. Al inicio de nuestro trabajo las versiones disponibles de estos programas informáticos eran la versión 2.0 para PSORTb, y la versión 2.5 para Proteome Analyst.

Características de los programas utilizados

El paquete **PSORTb 2.0** consta de 5 módulos que tienen como objetivo predecir, en base a un único criterio cada uno, la localización subcelular. Los cinco módulos mencionados analizan: 1) la posible homología con las secuencias presentes en una base de datos de proteínas cuya localización se ha determinado experimentalmente; 2) la presencia de determinados motivos funcionales en las secuencias, que puedan relacionarse con una localización subcelular; 3) una serie de algoritmos de tipo Support Vector Machines (SVM), cada uno entrenado en base a un grupo de secuencias de cada localización subcelular; 4) un algoritmo tipo Hidden Markov Model (HMM) que analiza la secuencia en busca de dominios transmembrana; y 5) un algoritmo que busca en la secuencia péptidos señal utilizando en primera instancia un HMM, y un SVM si éste no arroja resultados positivos. Todos los módulos se basan en el análisis de la secuencia primaria de las potenciales proteínas, y utilizan como referencia comparativa un grupo de secuencias bien caracterizadas experimentalmente. Dicho grupo consta de 1.443 proteínas pertenecientes a los 5 espacios subcelulares [182, 183]. Cada uno de los módulos arroja como resultado una predicción positiva con un valor numérico asociado que expresa su nivel de fiabilidad, o bien una “localización desconocida”. Luego, los resultados de los 5 módulos son integrados mediante un algoritmo basado en probabilidades condicionales (o Bayesiano), para obtener así una predicción final, también con un índice de fiabilidad asociado. Los autores recomiendan un valor de corte por debajo del cual las predicciones no serían confiables.

El programa **Proteome Analyst** (PA) no trabaja sobre la secuencia primaria de cada péptido, sino sobre las anotaciones asociadas. El análisis comienza con una búsqueda de proteínas homólogas a la secuencia problema, en la base de datos SWISSPROT [148]. Esta base de datos es no redundante, y además está mantenida manualmente, de modo que la información allí compilada se considera más confiable que la incluida automáticamente en otras bases de datos de proteínas [181]. Una vez identificadas las secuencias homólogas con ciertas restricciones en cuanto al porcentaje de homología y el largo relativo de las secuencias, el programa recupera de SWISSPROT la información pertinente de algunos campos específicos. Los campos consultados son: *Swissprot keywords field*, *Interpro numbers*, y *Subcellular location field*. A partir de las palabras claves recuperadas se obtiene, con un índice de fiabilidad asociado, información de la posible localización.

El porcentaje de cobertura individual de ambos programas sobre el genoma de *B. pertussis* fue similar, y resultó cercano a los valores reportados por los autores para otras

bacterias gram negativas [178, 179]. El total de ORFs que consideramos al hacer este cálculo fue de 3.209, ya que tanto los pseudogenes como las repeticiones de una misma secuencia fueron excluidos del análisis. La cobertura del paquete PSORTb 2.0 fue del 58,3% (1.872/3.209), algo superior al 55,2% del programa Proteome Analyst (1.773/3.209), considerando en ambos casos todas las localizaciones (Tabla 10).

Combinando sus resultados, los programas predicen alguna localización para 2.433 ORFs. La cobertura combinada de ambos programas resultó entonces del 75,8% (2.433/3.209), obteniéndose un rendimiento significativamente superior que para los programas utilizados de forma individual. En general, las predicciones generadas por los dos programas coinciden. Sin embargo, para 65 secuencias (el 2,71% de las 2.433 secuencias con alguna predicción) los resultados fueron contradictorios entre ambos programas¹⁰. En resumen, descontando estas 65 secuencias llegamos a una cobertura del 73,7%. La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos por cada programa, mientras que la Tabla 11 muestra los resultados de un programa cruzados con los correspondientes al otro.

Localización subcelular	ORFs asignados por PSORTb 2.0	de interés	ORFs asignados por Proteome Analyst	de interés
No clasificadas	1337		1436	
Citoplasma	1087		960	
Membrana citoplasmática	596		462	
Periplasma	111		251	
Membrana externa	67	189	51	351
Prot. extracelulares	11		49	
Total clasificadas	1872 (cob 58,3%)		1773 (cob 55,2%)	

Tabla 10. Resultados de la predicción de localización subcelular para los 3209 ORFs analizados según los paquetes PSORTb 2.0 y Proteome Analyst.

	Proteome Analyst						Total ORFs
	No clasificadas	Citoplasma	Membrana citoplasmática	Periplasma	Membrana externa	Proteínas extracelulares	
No clasificadas	776	371	55	99	7	29	1337
Citoplasma	452	560	42	26		7	1087
Membrana citoplasmática	176	26	365	23	4	2	596
Periplasma	4	2		103		2	111
Membrana externa	25	1			40	1	67
Prot. extracelulares	3					8	11
Total	1436	960	462	251	51	49	3209

Tabla 11. Predicción de la localización subcelular de los ORFs de *B. pertussis* según los programas PSORTb 2.0 y PA.

¹⁰ Tomamos como contradictorias las predicciones de ambos programas cuando uno de ellos clasificó un determinado ORF como citoplasmático o de membrana interna, mientras que el otro lo hizo en el otro grupo de localizaciones (periplasma, membrana externa o espacio extracelular). Es decir que no consideramos contradictorias aquellas predicciones que, aun sin ser idénticas, refieren al mismo grupo de localizaciones.

Desde el punto de vista de nuestro trabajo, el interés está puesto en las proteínas de superficie, las cuales definimos como pertenecientes al periplasma, la membrana externa o el espacio extracelular. Al comparar el rendimiento para estas localizaciones (Tabla 10) vemos que mientras que PA permite identificar por sí solo 351 secuencias de interés, PSORTb identifica 189. Son comunes a ambos programas 154 secuencias.

A primera vista, el uso de dos programas en lugar de uno permitiría aumentar el porcentaje de cobertura, y este efecto se observa efectivamente a nivel del genoma completo. En general las predicciones de ambos programas coinciden, como puede observarse en la Tabla 10, en la cual vemos que la mayoría de los ORFs se ubican en una diagonal con predicciones coincidentes. Sin embargo, al utilizar dos programas aparecen también algunas predicciones contradictorias. Parece razonable asumir que –en promedio– las predicciones comunes a ambos programas probablemente tengan un error menor, a la vez que las predicciones contradictorias sean menos fiables.

Al analizar los resultados obtenidos vemos que la estrategia de usar dos programas tiene entonces dos efectos, por un lado se añaden predicciones efectuadas por uno u otro programa y por el otro se restan predicciones que resultan contradictorias. En el caso de las secuencias de interés, el programa PA por sí solo identificó 351 secuencias, a las cuales habría que añadir 35 secuencias identificadas exclusivamente por PSORTb. Sin embargo, de la superposición de ambos programas resultan 65 proteínas con localización contradictoria (Tabla 11), dando un total de 321 secuencias de superficie (351+35-65). Si estas consideraciones son ciertas, el efecto de combinar los programas puede verse como un aumento en la especificidad de las predicciones, a expensas de la cobertura.

El desempeño del programa Proteome Analyst, que utiliza únicamente información ya disponible relacionada a las secuencias en lugar de efectuar alguna predicción a partir de la secuencia primaria, señala la potencialidad del gran cúmulo de información almacenada en bases de datos de acceso libre. A modo de caracterización adicional, comparamos el desempeño de ambos programas sobre el grupo de ORFs para los cuales se dispone de menos información. Incluimos en este grupo de ORFs a los pertenecientes a la categoría de “función desconocida” de la clasificación funcional de Riley (Riley 0.0.0). Como puede observarse en la Tabla 12, para este grupo de proteínas el programa PSORTb tiene un desempeño significativamente superior que el PA, dado que éste último depende fundamentalmente de la existencia de homólogos.

ORFs en categoría 0.0.0 de Riley	Programa	No clasificadas	Citoplasma	Membrana citoplasmática	Periplasma	Membrana externa	Proteínas extracelulares	Total ORFs clasificados	
112	PSORTb 2.0	78	33			1		34	30,4%
112	PA	109	2	1				3	2,7%

Tabla 12. Predicción de localización subcelular según ambos programas utilizados para los ORFs de *B. pertussis* pertenecientes a la categoría 0.0.0 de Riley (función desconocida).

Esta comparación ilustra las ventajas y desventajas del tipo de información en que se basa cada uno de los programas. Mientras que la predicción de la localización subcelular en base a características de la secuencia primaria parece tener un rendimiento relativamente bajo en algunos casos, es una alternativa válida en el caso de proteínas para las que no se dispone aún de homólogos caracterizados experimentalmente.

Los resultados de esta etapa de trabajo están conformados por la información de localización subcelular predicha para un 71% del genoma de *B. pertussis*. Estos datos fueron volcados a la base de datos que construimos, completando así el esquema que presentamos al comenzar esta sección. Pasaremos ahora a algunos análisis de conjunto que realizamos sobre los resultados obtenidos y la información recopilada, y por último describiremos el proceso de selección de candidatos seguido¹¹.

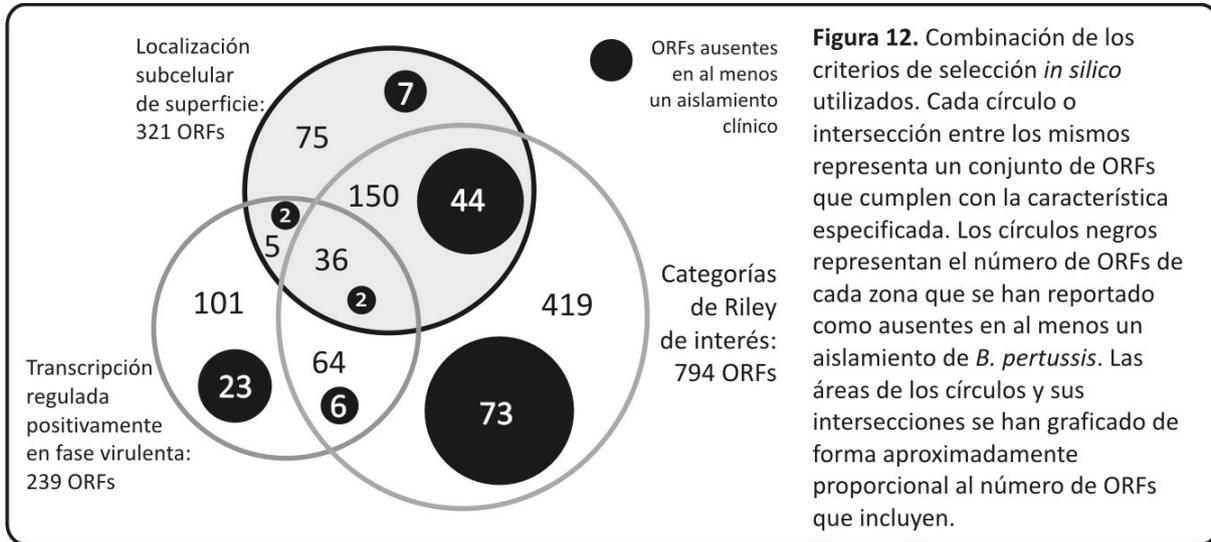
Integración de la información y selección final de los candidatos

La Figura 12 resume algunos resultados obtenidos hasta aquí. En esta figura, los círculos y sus intersecciones representan el número de ORFs que cumplen con cada uno de los criterios utilizados. El área de cada zona del gráfico es aproximadamente proporcional al número de ORFs que contiene. Como puede verse en la figura, los criterios arrojan conjuntos de ORFs parcial pero no totalmente solapados. Los círculos negros dentro de cada zona representan el conjunto de ORFs encontrados en regiones de diferencia en aislamientos clínicos, por lo que estos ORFs no serían recomendables como candidatos vacunales.

El principal criterio en la vacunología reversa es la selección de los ORFs para los que pueda predecirse una localización de superficie. A este grupo pertenecen 321 ORFs, como mencionamos antes. Los otros dos criterios de selección positiva utilizados en este trabajo fueron la regulación positiva en fase virulenta y la pertenencia a alguna categoría funcional de interés. Al integrar los resultados de este análisis con los correspondientes a los demás criterios, vemos que algunos de los 321 candidatos cumplen también con otro(s) criterio(s) de interés. Siempre refiriéndonos a la Figura 12, vemos que la intersección de los tres conjuntos incluye 38 candidatos, dos de ellos de presencia variable en aislamientos clínicos. La intersección del conjunto de localización superficial con el conjunto de candidatos de modulación positiva por el sistema BvgAS incluye 7 candidatos. En total, 55 (44+7+2+2 en la

¹¹ Con posterioridad a que efectuáramos nuestros análisis, los autores del paquete PSORT generaron una nueva versión del mismo (PSORTb 3.0) [181]. Uno de los propósitos de este trabajo, según los autores, fue lograr un porcentaje de cobertura mayor al 50% obtenido por la versión 2.0 para genomas de bacterias gram negativas. El programa PSORTb 3.0 arroja una cobertura del 71,6% para las 3.209 secuencias incluidas en nuestro análisis, en contraste con el 58,3% de la versión 2.0. Aún con esta mejora sigue siendo útil combinar los resultados con del programa Proteome Analyst: la suma de ambos conjuntos de predicciones alcanza a una cobertura del 79%. En cuanto a los candidatos de superficie (321 en la combinación de PSORTb 2.0 y PA) el número asciende a 342. Esta versión del programa es la que utilizamos en la selección de candidatos que siguieron a esta Tesis.

Figura 12) de estos 321 ORFs pertenecen a alguna de las regiones de diferencia encontradas en diversos aislamientos.



Si bien todos los ORFs incluidos en estos grupos podrían ensayarse como candidatos vacunales, algunos presentan, en virtud de cumplir con dos o más de los criterios utilizados, mayor interés. En la Tabla 13 contabilizamos el número de candidatos según cumplan con uno o más de los criterios utilizados en este trabajo. El total de candidatos resulta ser de 615, de los cuales 211 tendrían una localización en la superficie de la bacteria.

Criterio de selección positiva	ORFs
Localización de superficie predicha	68
Localización de superficie predicha + Regulación positiva en fase virulenta	3
Localización de superficie predicha + Categoría funcional de interés	106
Localización de superficie predicha + Categoría funcional de interés + Regulación positiva en fase virulenta	34
Categoría funcional de interés	346
Categoría funcional de interés + Regulación positiva en fase virulenta	58
Total	615

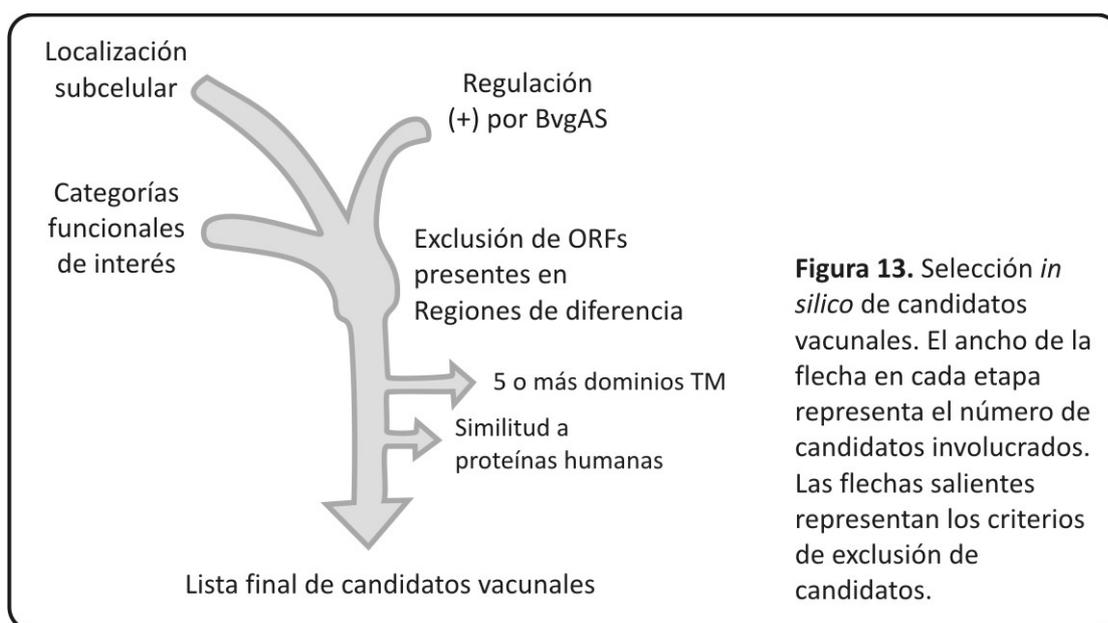
Tabla 13. Número de ORFs del genoma de *B. pertussis* que cumplen con cada uno de los criterios de selección *in silico* utilizados o sus combinaciones.

La selección de candidatos vacunales se hizo en función de los criterios resumidos en la Tabla 13. Ante la imposibilidad de trabajar con todos los candidatos que surgen de este análisis, procedimos a seleccionar algunos de estos ORFs para seguir adelante con los siguientes pasos de la estrategia.

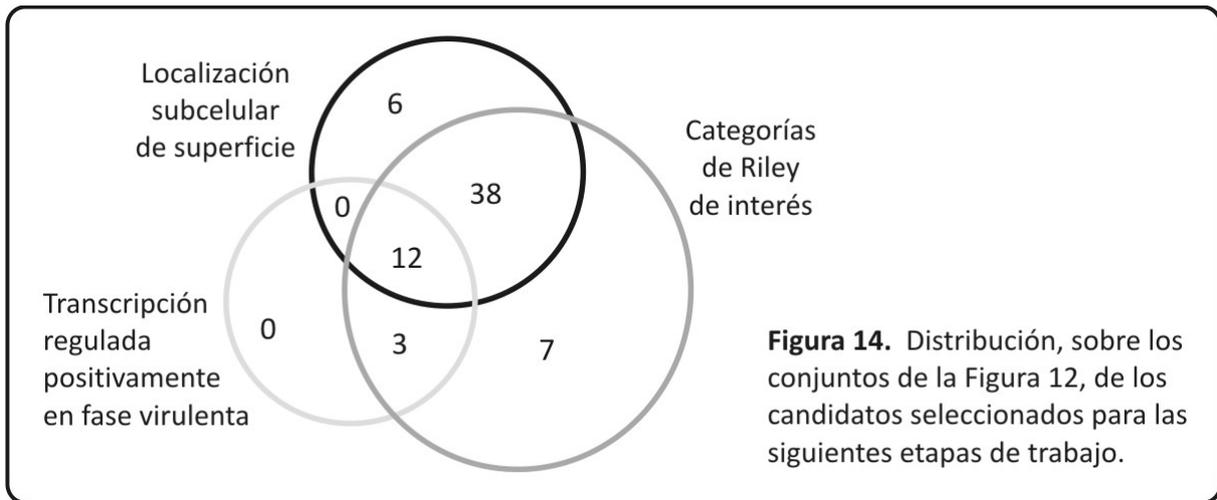
Al momento de seleccionar un candidato particular tomamos dos criterios de exclusión adicionales. Según el primero de ellos, excluimos aquellos ORFs que tuvieran 5 o más dominios transmembrana. Este criterio responde a las dificultades técnicas que suele presentar el trabajo con estas proteínas que tengan varios dominios transmembrana [127]. Como predicción de la presencia de estos dominios, tomamos la efectuada por el módulo

HHTM del programa PSORTb 2.0. Por otro lado, descartamos los ORFs que presentaran cierto nivel de homología con proteínas humanas. El uso como inmunógenos de candidatos que tuvieran similitud con proteínas del genoma humano podría ser inefectivo, o peor aún, causar una reacción autoinmune. Para cumplir con este criterio de exclusión realizamos para cada candidato elegido una búsqueda de homólogos en el genoma humano, utilizando el algoritmo BlastP disponible en Internet (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Los parámetros que utilizamos fueron: Algoritmo: Blastp, Base de datos de proteínas: No redundante, y Organismo: Homo sapiens (taxid:9606), dejando el resto de los parámetros del algoritmo en su valor por defecto. Se tomó como punto de corte un valor del parámetro E menor o igual a 10^{-10} .

Más allá de los criterios de exclusión mencionados, en esta elección de candidatos procuramos tomar ORFs provenientes de los distintos subgrupos de la Tabla 13. Esquematizamos el procedimiento seguido en la Figura 13. En la Figura 14 mostramos la distribución de estos ORFs elegidos, en total 67. Los candidatos elegidos se encuentran detallados en la Tabla 14, donde incluimos además algunas características de los mismos.



Por otro lado, con la idea de incluirlos como posibles controles en algunos de los futuros experimentos, elegimos 8 ORFs correspondientes a factores de virulencia conocidos de *B. pertussis*: los 5 ORFs correspondientes a las distintas subunidades de la toxina pertussis, los dos correspondientes a las subunidades fimbriales (fim2 y fim3) y el ORF que codifica para la proteína de resistencia al suero o BrkA. Seleccionamos para trabajar en las siguientes etapas, en total, 67 candidatos vacunales y 8 ORFs correspondientes a factores de virulencia.



Indice	ORF	Peso Molecular (kDa)	Producto
1	BP1628	38,6	wza, putative capsular polysaccharide export protein
2	BP1989	62	putative exported protein
3	BP2019	18,6	putative lipoprotein
4	BP2396	57,6	putative binding-protein-dependent transport periplasmic protein
5	BP2661	39,4	putative exported protein
6	BP3006	20,2	putative lipoprotein
7	BP3342	17,8	putative peptidoglycan-associated lipoprotein
8	BP3716	40	putative exported protein
9	BP3802	59	putative extracellular solute-binding protein
10	BP3831	36,6	putative ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein
11	BP0736	89,5	bfrF, putative ferric siderophore receptor
12	BP0857	81,3	bfrE, probable TonB-dependent receptor for iron transport
13	BP1138	89,8	bfrH, putative ferric siderophore receptor
14	BP1364	28,2	putative amino-acid ABC transporter, periplasmic aa binding protein
15	BP2090	39,5	putative ABC-transporter substrate-binding protein
16	BP2235	63,3	bscC putative type III secretion protein
17	BP3052	57,1	putative gamma-glutamyltranspeptidase
18	BP3196	40	putative amino acid binding precursor protein
19	BP3595	69,2	putative outer membrane protein
20	BP3812	52,6	putative outer membrane efflux protein
21	BP0057	32,4	amino-acid ABC transporter binding protein precursor
22	BP0558	36,1	amino acid-binding periplasmic protein
23	BP0763	50,2	cyaE, cyclolysin secretion protein
24	BP1277	39,3	livJleu/ile/val-binding protein precursor
25	BP1285	39,6	livJleu/ile/val-binding protein precursor
26	BP1767	45,4	phg autotransporter
27	BP1882	93,3	fimC, fhaA outer membrane usher protein precursor
28	BP2901	80,2	bfeA, ferric enterobactin receptor
29	BP3315	65,6	copA, copper resistance protein
30	BP3663	79,9	bfrC, ferric siderophore receptor
31	BP2674	21,4	fimX, fimbrial protein
32	BP3270	30,6	putative thiol:disulphide interchange protein (periplasmic)
33	BP0346	38	bhuS, putative hemin transport protein
34	BP0418	33,9	putative exported protein
35	BP0542	33,9	putative exported protein

Tabla 14. Lista de candidatos vacunales de *B. pertussis* elegidos.

Indice	ORF	Peso Molecular (kDa)	Producto
36	BP0826	53,4	outer membrane component of multidrug efflux system
37	BP0840	41	outer membrane porin protein precursor
38	BP0986	48,8	cusC, ibeBprobable outer membrane lipoprotein
40	BP1126	50,1	odhL, 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, E3 component
41	BP1160	33	putative lipoprotein
42	BP1507	32,3	putative extracellular solute-binding protein
43	BP1532	28,3	putative amino acid-binding periplasmic protein
44	BP1580	24	probable cytochrome C
45	BP1631	75,7	wcbA, kpsC, lipAcapsular polysaccharide export protein
46	BP2204	27,4	putative outer membrane (scaffolding) protein
47	BP2337	67,6	putative phospholipase
48	BP2526	49,6	putative secretory apparatus
49	BP2889	16,2	putative c cytochrome
50	BP3150	46,7	wbpO, polysaccharide biosynthesis protein
51	BP3568	40,3	putative exported protein
52	BP0347	91,7	bhuR, outer membrane heme receptor
53	BP0456	82,1	hemC, putative heme receptor
54	BP0943	20,9	ompA, outer membrane protein A precursor
55	BP1201	66,2	tcfA, tracheal colonization factor precursor
56	BP1251	26,3	putative toxin
57	BP1428	20,9	putative outer membrane protein
58	BP1834	19,9	putative fimbrial protein
59	BP1883	39,2	fimD, fhaE fimbrial adhesin
60	BP2219	35,4	putative cell surface protein
61	BP2327	62,2	putative outer membrane protein
62	BP2463	81,5	fauA, ferric alcaligin siderophore receptor
63	BP3077	77,8	putative outer membrane protein
64	BP3405	39,1	ompQ, outer membrane porin protein OmpQ
65	BP3495	57,4	cpn60, groEL, mopA, groL60 kDa chaperonin
66	BP3790	92,6	putative bacterial secretion system protein
67	BP3793	25,9	putative bacterial secretion system protein
68	BP3794	29,4	putative bacterial secretion system protein
69	BP1119	22,2	fim2, serotype 2 fimbrial subunit precursor
70	BP1568	21,8	fim3, serotype 3 fimbrial subunit precursor
71	BP3494	103,3	brkA, serum resistance protein
72	BP3783	29,9	ptxA, pertussis toxin subunit 1 precursor
73	BP3784	24,7	ptxB, pertussis toxin subunit 2 precursor
74	BP3785	16,5	ptxD, pertussis toxin subunit 4 precursor
75	BP3786	14,4	ptxE, pertussis toxin subunit 5 precursor
76	BP3787	24,9	ptxC, pertussis toxin subunit 3 precursor

Tabla 14. Lista de candidatos vacunales de *B. pertussis* elegidos (continuación).

Discusión

Con el objetivo de favorecer la claridad de la exposición, hasta aquí hemos presentado el esquema de selección *in silico* como una secuencia lineal de pasos. Algunos de estos pasos implican en realidad optar entre distintas alternativas metodológicas, por lo que en este punto queremos discutir el porqué de algunas de las opciones elegidas y explicar por qué no hemos hecho uso de otras herramientas disponibles.

Siguiendo la misma secuencia que estructura esta sección, comenzaremos por justificar nuestra elección del genoma de *B. pertussis* Tohama I como base para nuestro trabajo.

Genoma de *B. pertussis* Tohama I como material de trabajo

La vacunología reversa se basa en la identificación de posibles candidatos vacunales a partir de la secuencia genómica. Por lo tanto, es importante que el genoma sobre el que se trabaje sea representativo de la población bacteriana circulante. El genoma de una única cepa siempre es necesariamente una muestra limitada de esta población, ya que es esperable que los distintos aislamientos no sean idénticos a nivel genético. Como hemos mencionado ya, esto puede significar que algunos aislamientos posean ORFs que al no ser comunes a los demás, no resulten buenos candidatos vacunales. El problema de la variabilidad genética de una bacteriana desde el punto de vista de la vacunología reversa ha dado lugar al concepto de pangenoma [184]. Según este concepto teórico, el pangenoma representa el repertorio de todos los genes presentes en las distintas cepas de una especie. En algunas especies bacterianas el pangenoma es numéricamente cercano al número de ORFs presentes en los genomas individuales, mientras que en otras es varias veces más grande. Esto dependerá, entre otras cosas, de las posibilidades de transferencia horizontal de genes de cada especie, y de sus posibilidades para compartir un nicho de crecimiento [143]. Dos ejemplos opuestos representan las especies *Bacillus anthracis* y *Streptococcus agalactiae*. Para ambas especies se han obtenido varias secuencias genómicas completas, y la integración de estos datos llevó a proponer la definición de pangenoma cerrado para aquellos casos en que el número total de ORFs “converge” (como en *B. anthracis*); y de pangenoma abierto en los casos en que este número aumenta con cada nueva cepa secuenciada, como sucede en el caso de *S. agalactiae* [143]. La Figura 15, tomada de un trabajo de Rappuoli y col. [125], ilustra estas dos situaciones.

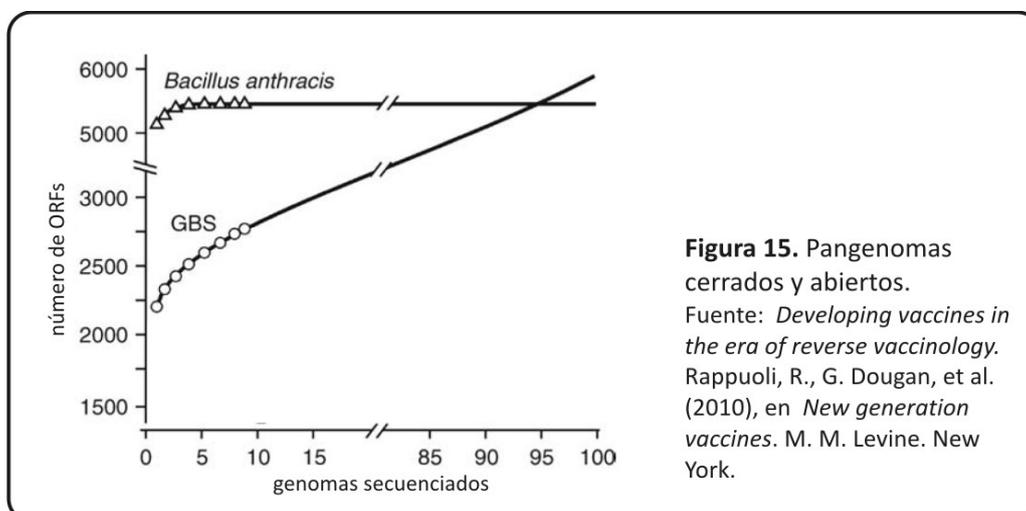


Figura 15. Pangenomas cerrados y abiertos.
Fuente: *Developing vaccines in the era of reverse vaccinology*. Rappuoli, R., G. Dougan, et al. (2010), en *New generation vaccines*. M. M. Levine. New York.

Como mencionamos en la sección anterior (Tabla 5), la aplicación de la vacunología reversa al caso de *S. agalactiae* por Maione y col. involucró la comparación de múltiples genomas. En el caso de este trabajo los investigadores tomaron candidatos tanto de entre los ORFs comunes a todos los genomas secuenciados como de entre los presentes solamente en algunos de ellos. La mayoría de las proteínas que finalmente mostraron poder protector en ratones no provenían de los candidatos comunes, sino que pertenecían a lo que nosotros hemos denominado genes de presencia variable en el caso de *B. pertussis*. Según los autores, esto puede deberse a que los componentes comunes a todos los genomas sean pobremente inmunogénicos, mientras que los ORFs variables estarían sujetos a una mayor presión selectiva por parte del sistema inmune. Esta presión selectiva sería la que determinaría la ausencia de estos ORFs en algunos aislamientos [128]. Sobre esta hipótesis, destacan la utilidad de contar con múltiples genomas completos a fin de identificar candidatos que al ser utilizados en forma conjunta proporcionen protección contra la totalidad de la población bacteriana circulante.

En el caso de *Bordetella* no disponemos aún de varios genomas de aislamientos como para hacer estas comparaciones. Sin embargo, el actual conocimiento sobre la genética de este microorganismo permite hipotetizar que la situación de *B. pertussis* quedaría mejor representada mediante un pangenoma cerrado. En primer lugar, se ha señalado la evolución de este género como caracterizada por la pérdida gradual de genes [163, 185]. Por otro lado, la transferencia horizontal de genes (THG) no es un mecanismo común en *B. pertussis*. De hecho este microorganismo es considerado clonal en el sentido evolutivo del término [186], aunque se han reportado algunos casos donde la THG es una hipótesis factible [187]. Nos hemos referido ya a la existencia de genes de presencia variable en aislamientos clínicos de *B. pertussis* a lo largo de esta sección. Para completar este panorama, podemos mencionar que en un trabajo del año 2008, Caro y colaboradores demuestran que la cepa Tohama I no posee en su genoma algunas zonas que sí se encuentran en otros aislamientos clínicos analizados [188]. Estas zonas serían, por lo tanto, regiones de diferencia ausentes del genoma de Tohama I. Las regiones de diferencia identificadas comprenden 46kpb conteniendo 42 ORFs presentes tanto en *B. parapertussis* 12822 como en *B. bronchiseptica* RB50. La presencia de estos ORFs en las otras dos especies de *Bordetella* y la ausencia de zonas exclusivas de *B. pertussis* (que los autores del trabajo no encontraron) soportan la hipótesis del decaimiento en el número de genes. Si esto es así, aún cuando la cepa Tohama I y otras cepas de *B. pertussis* puedan perder regiones distintas a lo largo de sus trayectos evolutivos, podríamos asumir que el repertorio completo de ORFs se encontraría en *B. bronchiseptica*. Esto es lo que se ha descrito para el caso de algunos factores de virulencia como las proteínas asociadas al metabolismo del hierro [100, 189]. La publicación, en Junio de 2011, del genoma completo correspondiente a una segunda cepa de *B. pertussis* (la cepa

CS, utilizada en China para la producción de vacuna acelular) mostró que para esta cepa se mantiene esta tendencia, ya que la misma no contiene ningún ORF que no se encuentre en las cepas de *B. bronchiseptica* o *B. parapertussis* secuenciadas en 2003 [190].

En este sentido, podría pensarse entonces en hacer la selección de candidatos vacunales sobre el genoma de *B. bronchiseptica* RB50, para asegurarse que los candidatos elegidos abarcaran el espectro completo de ORFs potencialmente presentes en la población circulante de *B. pertussis*. Esto sería equivalente al procedimiento utilizado en el caso de *S. agalactiae* grupo B por Maione y col., considerando a *B. bronchiseptica* RB50 como el “pangenoma” de *B. pertussis*.

Esta alternativa, sin embargo, presenta una complicación técnica. Se ha encontrado que cada aislamiento individual de *B. pertussis* tiene solo unos pocos de los ORFs de presencia variable [163]. Como el número de ORFs exclusivos de *B. bronchiseptica* es muy grande (alrededor de 1.800), la probabilidad de que cualquier cepa de *B. pertussis* exprese los candidatos que surgieran de tal análisis sería muy baja.

En principio, entonces, asumimos como válido efectuar la búsqueda de candidatos vacunales sobre el genoma de la única cepa secuenciada en el momento en que iniciamos nuestro trabajo, para luego comprobar la presencia de los mismos en los aislamientos circulantes.

En este apartado hemos analizado la posible utilidad de la aproximación pangenómica al caso de *B. pertussis*. Un aspecto relacionado a este es la comparación de los genomas de las tres especies de *Bordetella* secuenciadas en 2003. Este fue en realidad uno de los motivos para secuenciar tres especies bacterianas muy relacionadas, y pensamos que repasar sus resultados puede enriquecer el panorama que hemos descripto.

Comparación de genomas entre las Bordetella clásicas

En su concepción original, y tal como lo plantean sus autores, el proyecto de secuenciación de las tres especies de *Bordetella* clásicas tenía como uno de sus objetivos principales la comparación de los tres genomas, bajo la motivación de hallar genes responsables de la adaptación de *B. pertussis* al humano [100]. Las tres especies del género *Bordetella* tienen diferente rango de huéspedes: mientras que *B. bronchiseptica* coloniza un amplio rango de mamíferos (pero no en forma habitual a los humanos), distintas cepas de *B. parapertussis* infectan alternativamente ovinos o humanos, y *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano.

Una vez completadas las secuencias, los investigadores identificaron los genes ortólogos entre las tres especies, para así comparar la dotación relativa de genes entre las mismas. Los genes de interés en relación con la infección en humanos serían aquellos presentes en las especies capaces de infectar humanos pero ausentes de *B. bronchiseptica*.

En este primer estudio, tomando en consideración los tres genomas de referencia secuenciados, se encontraron 114 ORFs únicos de *B. pertussis* Tohama I; 50 ORFs únicos de *B. parapertussis* 12822 y 23 ORFs compartidos por *B. pertussis* y *B. parapertussis*, pero ausentes en *B. bronchiseptica* [100]. Poco tiempo después, experimentos de hibridación comparativa (CGH) demostraron que muchos de estos ORFs se encontraban presentes en realidad en otras cepas de *B. bronchiseptica*: así es que de los 114 ORFs exclusivos de *B. pertussis* solo 11 se confirmaron como tales, y ninguno de los 50 de *B. parapertussis* [185]. Por otro lado, de los 11 ORFs propios de *B. pertussis* Tohama I, 9 no se encuentran en la cepa de *B. pertussis* 18323, que ha sido aislada de pacientes humanos, por lo que los productos de estas secuencias codificantes no serían estrictamente necesarios para ocupar este nicho. En resumen, solo pudieron identificarse dos ORFs como exclusivos de las especies capaces de infectar humanos [101]. Al contrastar los datos surgidos de reportes posteriores [163] puede observarse que incluso estos dos ORFs resultan estar ausentes en otros aislamientos humanos de *B. pertussis*. Los autores exponen como conclusión de esta serie de trabajos que no se encontraron genes cuya presencia resultara determinante de la patogénesis en humanos [100, 101].

Además de la búsqueda de genes exclusivos de cada especie, en el trabajo de Parkhill y col. se hace un análisis, más particularizado, sobre los factores de virulencia conocidos. En este sentido los autores tienen en cuenta, además de su presencia, la variabilidad existente en las secuencias de estos genes, con la misma idea de encontrar determinantes de la especificidad de huésped para estas especies bacterianas. Los resultados indicaron que la mayoría de los factores de virulencia están presentes en las tres especies secuenciadas. En el caso de los genes para las adhesinas (*fhaB*, *fhaS* y *fhaL*) los mismos están presentes en los tres genomas, aunque con alguna variación en sus secuencias. Para otros grupos de genes implicados en la virulencia, como las secuencias codificantes para las subunidades fimbriales, los autotransportadores, o las proteínas implicadas en la captación de hierro, se encontró que *B. bronchiseptica* tendría el repertorio completo de los mismos, el cual se encontraría parcialmente presente en *B. pertussis* o *B. parapertussis* [100]. Por lo tanto, estos análisis no arrojaron tampoco datos que permitan asignar claramente la capacidad de *B. pertussis* y *B. parapertussis* de infectar humanos a algún conjunto de genes o alelos en particular.

La ausencia de genes específicos que pudieran estar implicados en el fenotipo diferencial observado era inesperada. Esto llevó a proponer una hipótesis alternativa sobre la relación evolutiva entre los tres genomas. En esta hipótesis juegan un rol central las secuencias de inserción repetitivas que, mediante eventos de recombinación homóloga entre diferentes copias, podrían provocar la pérdida o inversión de porciones del cromosoma bacteriano, dando como resultado la disminución o reordenamiento del material genético [101]. El número de repeticiones de estas secuencias es mucho mayor en

B. pertussis que en *B. bronchiseptica* (Tabla 7). En la hipótesis propuesta, los reordenamientos a nivel ADN podrían ser los responsables de cambios en la expresión y regulación génica que determinaría la especificidad de nicho [101]. Una de las lecciones aprendidas a partir de éste y otros proyectos de secuenciación es que la complejidad de los sistemas vivos es tan alta que resulta difícil a veces establecer modelos explicativos que incluyan únicamente el nivel del ADN. El ejemplo de *Bordetella* nos lleva a pensar en forma crítica el criterio más general de selección de candidatos a partir de la comparación de genomas.

Algunas reflexiones en torno de las comparaciones entre genomas

La estrategia de comparación de genomas entre las especies de *Bordetella* comparte algunos supuestos con dos criterios de selección *in silico* de candidatos que mencionamos en la sección anterior: la comparación del genoma de *B. anthracis* con el de bacilos no patógenos relacionados en busca de genes exclusivos del patógeno [127], y la “vacunología reversa sustractiva” en la que se eliminan como candidatos aquellos ORFs presentes en cepas no patógenas de *E. coli* [137]. Pensamos que los implícitos que suponen estos planteos merecen alguna reflexión, que puede extenderse al caso de la pangenómica, y a la que nos dedicaremos a continuación.

Tanto la pangenómica como los criterios de comparación de genomas hacen uso de la gran cantidad de información que representan las múltiples secuencias de una misma especie bacteriana o de especies relacionadas. Esto resulta muy interesante, y una de sus ventajas es que es una estrategia que no requiere demasiados recursos ni tiempo. Sin embargo, debemos mencionar también que hacer un análisis comparativo para genomas completos solo es posible al nivel del ADN. El planteo de estas mismas comparaciones a nivel proteómico implicaría tanto o más trabajo que la vacunología reversa de la cual sería parte. Estos abordajes comparten, como consecuencia, una visión según la cual siguiendo la secuencia “gen – proteína – fenotipo”, los genes podrían ser individualmente responsables de fenotipos complejos, como la habilidad de infectar tejidos humanos o de causar determinados síntomas de una enfermedad. Vimos que en el caso de *Bordetella* esto parece no ser así. Desde ya, a pesar de la limitación que mencionamos, esta visión ha demostrado ser bastante adecuada para algunas toxinas bacterianas a las que ya hemos hecho referencia como la toxina diftérica, la tetánica o la toxina pertussis, moléculas a las que se les han atribuido buena parte de los mecanismos de patogenicidad de los microorganismos que las producen. Sin embargo, este razonamiento deja de lado la complejidad –para muchos sistemas bien documentada- que puede tener la interacción entre un patógeno y su huésped, que involucra múltiples genes sometidos a sistemas regulatorios. En un ejemplo todavía muy simplificado, podemos pensar que la habilidad de infectar un determinado

huésped dependiera de genes regulatorios y a través de estos, del entorno sensed por el patógeno, y no básicamente de genes efectores. Para tal grupo de patógenos, si aplicáramos la estrategia anterior ningún gen efector sería seleccionado positivamente, porque estaría presente tanto en las cepa infectivas como en la cepas comensales. Por el mismo motivo, todos los genes efectores serían eliminados al aplicar la vacunología reversa sustractiva. Este ejemplo podría aplicarse a *N. meningitidis*, el patógeno objeto de la primera aplicación de la vacunología reversa, donde la misma población bacteriana que en un determinado ambiente (el tracto respiratorio superior del 10% de la población) se mantiene como comensal genera, en otras condiciones, una infección generalizada. Por este motivo, y aunque representan una herramienta útil y relativamente económica en recursos, pensamos que los resultados de estas comparaciones entre genomas deberían someterse a un análisis pormenorizado antes que ser utilizados de manera acrítica.

Por otro lado hay, en la comparación de genomas, otro presupuesto adicional que no siempre se cumple. Al focalizarse en la presencia o ausencia de los candidatos vacunales, además de identificar el fenotipo con la posible expresión de un gen individual, se reduce la acción del gen a su sola presencia. El ejemplo de la toxina pertussis resulta en este caso nuevamente ilustrativo: los cinco ORFs necesarios para que *B. pertussis* sintetice esta proteína multimérica están presentes tanto en su genoma como en los de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. Sin embargo, estas dos últimas especies del género *Bordetella* no expresan la toxina, debido a una mutación en la secuencia que promueve la transcripción del operón *ptx*. En los esquemas anteriores la toxina pertussis no hubiera sido seleccionada por comparación entre genomas, y hubiera sido descartada por la sustracción de los genes comunes a estas tres especies, de las cuales *B. bronchiseptica* rara vez infecta humanos. Como mencionamos en la introducción de nuestro trabajo, esta toxina ha sido el principal antígeno utilizado en el desarrollo de las vacunas acelulares.

Podemos concluir que aplicar la comparación de genomas como forma de incluir candidatos no plantea problemas conceptuales a la estrategia mientras no sea el único criterio seguido. Sin embargo, parece ser más conflictivo el criterio de selección negativa o sustractiva, que podría llevarnos a dejar fuera del grupo de potenciales candidatos, alguna proteína que en realidad sí debería considerarse. Por supuesto, el peso de estas críticas debe evaluarse teniendo en cuenta que la vacunología reversa no depende de encontrar necesariamente todos los candidatos vacunales, es decir, no pretende exhaustividad.

En el apartado siguiente volveremos sobre un aspecto metodológico de la vacunología reversa. Se trata de una metodología de la que no hemos hecho uso en nuestro trabajo, aunque representa un campo de trabajo relativamente extenso dentro de la bioinformática.

Esta metodología está referida a la predicción de inmunogenicidad de las proteínas a partir de la secuencia primaria de las mismas.

Algoritmos de predicción de inmunogenicidad

Como mencionamos al introducir la vacunología reversa, el establecimiento de una respuesta inmunológica adaptativa ante una señal de peligro por parte del sistema inmune involucra siempre alguna clase de linfocitos T (con la excepción de algunos antígenos llamados T independientes). En el caso de las respuestas ante antígenos proteicos, con los que trata la vacunología reversa, este reconocimiento depende de la interacción molecular entre los receptores de las células T (TCR) y los complejos formados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y péptidos provenientes de la degradación enzimática de proteínas propias o extrañas. Según la teoría de la selección clonal, durante el desarrollo y maduración de la población de células T, aquellas cuyos TCR particulares reconocen péptidos propios unidos a moléculas MHC son eliminados de la población, minimizando la posibilidad de reacciones autoinmunes. Los péptidos presentados pueden ser de origen citoplasmático (en las infecciones virales) o bien provenir del medio extracelular (del cual son captados por fagocitosis o internalizados al ser reconocidos por inmunoglobulinas solubles o ancladas a la membrana de algunos tipos celulares). Los péptidos de origen citoplasmático son presentados en la superficie celular de todas las células nucleadas del organismo, unidos a las moléculas MHC clase I o MHC I. Los péptidos provenientes del medio externo a la célula son presentados por las células agrupadas bajo la denominación de células presentadoras de antígenos (APC): células dendríticas, macrófagos y células B por medio de las moléculas MHC clase II.

Ambos tipos de moléculas MHC son estructuralmente similares, y presentan una hendidura central que queda expuesta en la superficie, en la cual se une en forma muy estable los péptidos presentados. Las moléculas MHC I unen péptidos de entre 8 y 10 aminoácidos, y la interacción involucra los extremos de estos péptidos. Las moléculas MHC II, en cambio, unen péptidos de entre 11 y 25 aminoácidos, que sobresalen a ambos lados de la hendidura central, y la interacción más importante se establece con la zona media de estas cadenas. Estos aspectos estructurales de la interacción tienen importantes consecuencias desde el punto de vista de la predicción de la afinidad por secuencias específicas, como veremos a continuación.

La detección a partir de la secuencia aminoacídica de los epitopes presentes en una proteína es de un gran interés desde el punto de vista inmunológico. El problema de la búsqueda de epitopes dentro de una cadena de aminoácidos dada es levemente distinto del problema de identificar proteínas inmunogénicas como un todo. Ambos problemas están

relacionados, aunque el segundo es de un nivel un poco más complejo porque implica, para su resolución, la capacidad de establecer una jerarquía de epitopes sobre la cual poder comparar el potencial de distintos candidatos. Sobre ambos problemas se viene trabajando en los últimos 15 años, aunque los avances no son parejos en todos los casos.

Los métodos predictivos de la inmunogenicidad se basan en que la composición y secuencia de los epitopes reconocidos por una molécula de MHC no son arbitrarios, sino que siguen cierto patrón que podría detectarse en la secuencia de las proteínas problema para predecir la presencia de epitopes. Estos métodos funcionan aceptablemente bien para el caso de epitopes MHC I que, como mencionamos, tienen una longitud restringida, lo que simplifica el problema. La fiabilidad de los métodos predictivos depende de la cantidad de datos colectados para cada haplotipo particular, y para estas moléculas se cuenta en general con un apropiado conjunto de datos experimentales. En una revisión reciente Davies y Flower [191] indican que si se disponen de datos de afinidad para más de 100 secuencias peptídicas y una molécula de MHC I pueden aplicarse los métodos que resultan más exactos: redes neuronales y bayesianas. A medida que la cantidad de datos disponibles disminuye, estos métodos no pueden aplicarse y la fiabilidad es menor.

El caso de la unión de péptidos a moléculas MHC II, necesario para el establecimiento de respuestas adaptativas contra patógenos extracelulares, resulta más complejo dado que se ha encontrado que los péptidos tienen cierta flexibilidad en la unión. Los métodos predictivos para MHC II no resultan aún de ninguna utilidad práctica según los mismos autores [191], debido en parte a la falta de un buen conjunto de datos experimentales. Existen, no obstante, algunos paquetes que realizan la predicción de epitopes MHC II [192-197]. Una desventaja común a todos ellos es que estos métodos no se basan en datos de afinidad en función de la composición aminoacídica, sino en la predicción de zonas superficialmente expuestas o de hidrofobicidad.

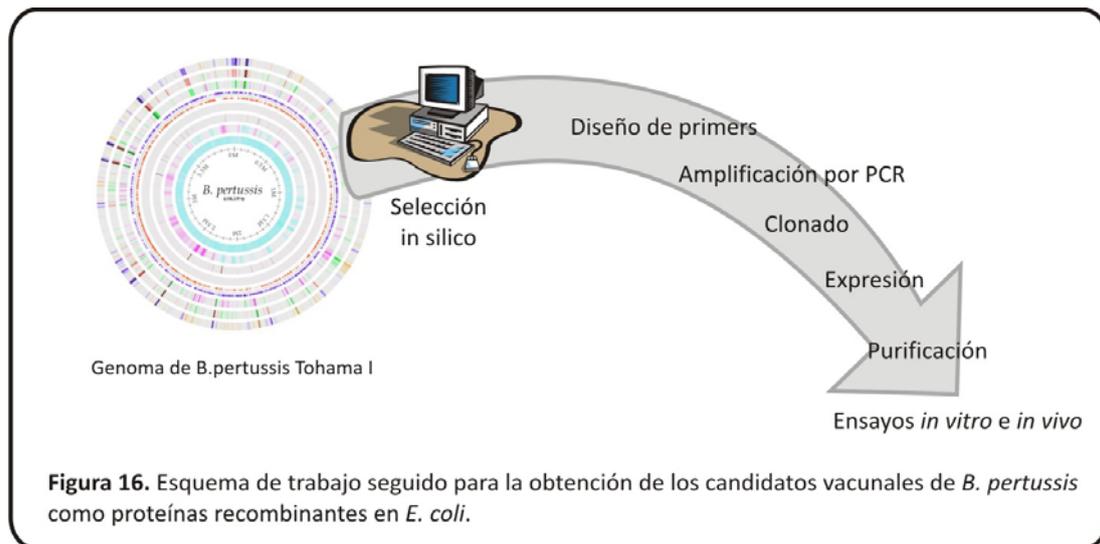
La respuesta montada ante un patógeno como *B. pertussis* dependerá fundamentalmente de la presentación por MHC II, ya sea para la generación de anticuerpos como para el establecimiento de una respuesta de tipo T_H1 . Por estos motivos es que decidimos, a pesar del potencial interés de estas herramientas para nuestro propósito, no utilizarlas en esta etapa.

Obtención de los candidatos vacunales

Introducción

En esta sección describimos los pasos seguidos para el clonado, la expresión y purificación de los candidatos vacunales elegidos. Mostramos los resultados obtenidos y planteamos algunas conclusiones en base a nuestra experiencia. La obtención de los candidatos es un procedimiento técnico que presentaremos de una forma más o menos lineal, siguiendo los pasos que componen esta metodología. Dejaremos los detalles experimentales para el anexo de Metodología presentado al final de este trabajo.

Como esquematizamos en la Figura 16, la metodología comienza con el diseño de primers específicos para amplificar las secuencias seleccionadas como potenciales candidatos vacunales. En los siguientes pasos se obtienen amplicones de estas secuencias, que son luego insertados en vectores de expresión, y transformados en bacterias capaces de expresarlas como proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes se obtienen como proteínas fusionadas a secuencias que permiten luego su detección y posterior purificación por cromatografía de afinidad, según detallamos también más abajo.



El objetivo de la serie de pasos que describiremos (clonado, expresión y purificación) es la obtención de forma relativamente rápida, con cierto grado de pureza, y en las cantidades necesarias, de proteínas con la secuencia de los candidatos vacunales elegidos. Aunque, por simplicidad, en lo sucesivo hagamos referencia a estas proteínas recombinantes como los “candidatos vacunales”, no debemos perder de vista que las mismas son, de alguna manera, un modelo de los candidatos más que los candidatos en sí, y que sus características inmunogénicas podrían diferir de las de éstos. Las diferencias entre los candidatos vacunales y sus análogos recombinantes responden a varias causas que son inherentes a la metodología. Entre ellas podemos mencionar por un lado la posible ausencia de modificaciones postraduccionales en *E. coli*. Por otro lado, es previsible la ausencia del entorno natural en que los candidatos vacunales adoptan su conformación nativa en *B. pertussis*, por ejemplo porque no ocurra la integración en la membrana o por la ausencia de chaperonas específicas que fueran necesarias en el proceso. A estas posibles diferencias introducidas por el uso de proteínas recombinantes, debemos agregar otras surgidas de cuestiones operativas como la presencia de la secuencia adicional (marca de polihistidina) y la forma desnaturalizada en que suelen utilizarse las proteínas.

Pasos seguidos en la obtención de los candidatos vacunales de *B. pertussis*

Existen diversas herramientas de ingeniería genética que permiten el clonado y expresión de proteínas en *E. coli* y otros sistemas [198]. A lo largo de nuestro trabajo usamos en particular dos vectores distintos, denominados pEntr/SD/D-Topo (Invitrogen) y pET200 (también de Invitrogen). Estos vectores tienen algunas diferencias, a las que nos referiremos

más adelante. Vamos a centrarnos ahora en algunos de sus aspectos en común que deben tenerse en cuenta al momento de diseñar los primers para el clonado de cada ORF.

El clonado consiste en la ligación del amplicón de interés en un vector que será luego introducido en bacterias aptas para la síntesis de proteínas recombinantes. A diferencia de los métodos clásicos, que involucran cortes con enzimas de restricción y una posterior ligación, el sistema que usamos consiste en un vector que se adquiere linealizado, y que tiene en los extremos una enzima topoisomerasa unida en forma covalente, este sistema se denomina Invitrogen TOPO Cloning[®]. Cuando el amplicón se une con el vector linealizado, las topoisomerasas unidas a sus extremos actúan catalizando la unión covalente del amplicón, a la vez que se escinden a sí mismas [199]. Se genera así un plásmido recombinante circular con el inserto deseado.

Además uno de los extremos de los vectores TOPO es romo, pero el otro es una simple hebra no apareada de cuatro bases, GTGG (Figura 17). Los amplicones a clonar se obtienen por PCR, diseñando los primers de manera tal que los amplicones comiencen con la secuencia CACC complementaria de la secuencia anterior. Así, la secuencia no apareada invade el amplicón en su extremo complementario y se aparea con éste. De esta forma el sistema favorece el clonado direccional y en el marco de lectura deseado de los amplicones (Figura 17).

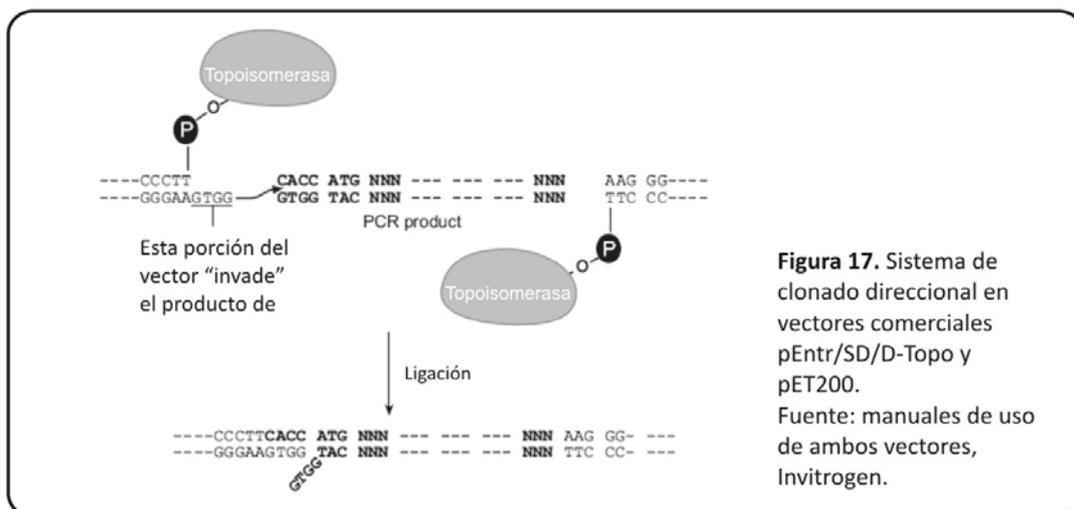


Figura 17. Sistema de clonado direccional en vectores comerciales pEntr/SD/D-Topo y pET200. Fuente: manuales de uso de ambos vectores, Invitrogen.

Diseño de primers

Como mencionamos en la sección anterior, seleccionamos *in silico* 67 candidatos vacunales, más 8 ORFs correspondientes a factores de virulencia conocidos. El número total de ORFs que intentamos clonar fue entonces de 75. En base a las secuencias obtenidas de la plataforma GeneDB del Instituto Sanger, diseñamos primers correspondientes a los candidatos vacunales seleccionados *in silico* utilizando el programa Primer3, de libre acceso (<http://frodo.wi.mit.edu/>) [200].

Como mencionamos más arriba, todos los primers situados al comienzo de cada ORF incluyen la secuencia inicial CACC, complementaria del extremo libre presente en los vectores de clonado. Como regla general incluimos en el amplicón la secuencia completa del candidato vacunal. Sin embargo, para poder obtener primers adecuados para algunos ORFs con un alto porcentaje de bases G y C en la zona 5', tuvimos que eliminar sus tripletes iniciales. Por este mismo motivo en el caso del candidato 52 (o BP0347) utilizamos solamente la porción correspondiente al dominio receptor de esta secuencia (se trata de un receptor para el grupo hemo, ver la Tabla 14).

Los primers obtenidos se encuentran listados en la Tabla 15, así como los tamaños esperados para cada amplicón. En la tabla indicamos el número de "tripletes eliminados".

Amplificación de las secuencias por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Utilizando los primers de la Tabla 15 amplificamos los ORFs seleccionados mediante PCR sobre un molde de ADN preparado a partir de un cultivo de *B. pertussis* Tohama I en medio sólido (ver punto 2 de la sección Metodología). Para reducir la posibilidad de obtener amplicones con errores que pudieran provocar cambios en la secuencia o bien llevar a la interrupción de la traducción de las proteínas resultantes, utilizamos en la amplificación una polimerasa con mayor fidelidad en la síntesis de ADN (*Pfx*[®] platinum polimerase, de Invitrogen).

Obtuvimos amplicones del tamaño esperado y con una especificidad adecuada para 71 de los 75 ORFs elegidos. Las condiciones de reacción para la amplificación de cada uno de los ORFs candidatos pueden encontrarse en la sección Metodología. En la Figura 18 incluimos, a modo de ejemplo, fotografías de electroforesis en geles de agarosa 1% de algunos de los productos de PCR obtenidos.

Índice	ORF	Secuencia del primer 5'	Secuencia del primer 3'	Tamaño del producto esperado (en pb)	Tripletes iniciales eliminados
1	BP1628	CACCATGAACCATAGACTCA	TCTTCGGCATTGGTGCTAC	1134	
2	BP1989	CACCATGAAACGTACAATCG	GCAGTGTGCCCATGTTTC	1734	
3	BP2019	CACCATGGCGACCCATCC	CGCTTCAGGCACACAACT	727	
4	BP2396	CACCATGATGAAAAGTTCTGC	GTGCACGAAAAGGAACACG	1703	
5	BP2661	CACCCAGCGACGTCGTTTTTC	CCACTACCACGGGCACTATG	1243	
6	BP3006	CACCATGACCCAGTATTTC	CAGCGACGAGCTCCTGATA	703	
7	BP3342	CACCATGAAGTCGCGCATTG	CGCGCATGAAAATATCCAG	595	
8	BP3716	CACCAAACCTGTGGAAAATC	GATCGTGGAGCACATCTCG	1217	
9	BP3802	CACCCGTATTTCTCCATTC	CCTCACGTTACGGCATCAC	1613	
10	BP3831	CACCAAGATGCTCAAGCTG	GGCGTTTCGATTGGTAGTC	1161	
11	BP0736	CACCGTGGTAATTACTTTCAATC	TTCCTACCATTTGTACGTG	2451	
12	BP0857	CACCTTGAAATCCCTGGACTC	CGGTCTGTTTTCAGCACTTG	2410	
13	BP1138	CACCGTGTTCCTCGCAGTC	AATCGCATTCTTCGGATGAC	2512	
14	BP1364	CACCATGAACTTCTCCTTGC	CAGAACGAATCGAGCATGAG	897	
15	BP2090	CACCATGAACACAAGCAAGG	GTTTGTCTGGACTGGGATGG	1209	
16	BP2235	CACCGCAATAGGTCGGCTTG	CGACGTGATCCTCATGGTC	1981	
17	BP3052	CACCGTGATGAAGTTCGATTG	TGGTGTCGTACGTCTTCGAG	1701	
18	BP3196	CACCAAGCGGATACACAGAC	ACTTCCCAGCTGACGTCCT	1244	
19	BP3595	CACCATGAAATCCCGCTCAC	ACGGTCAGAGCGATCAGG	1949	
20	BP3812	CACCATGCCTGGTTTCCGATTC	GGCTTACGCTCACACCTACC	1648	
21	BP0057	CACCATGAAGATAAGTACGG	GAAAAATATGCCAATTCCAG	1104	
22	BP0558	CACCATGAAGATCGCACAA	AAGATTTCTGCTGCTGATC	1088	
23	BP0763	CACCGTGCAAGTCAGG	GTAGATCCATCACCATCACC	1529	3
24	BP1277	CACCATGAAGTTTTCGCAAC	TGAAGAACTGCTGGGTAAGT	1262	
25	BP1285	CACCATGAACAAGGCATTC	GAAGGGCTCTGACGTATTC	1254	
26	BP1767	CACCATGAAACCGACTT	AATCCTCGTAGACCATGAGA	1351	
27	BP1882	CACCATGAAACAGATACCA	GTGTCTGGTCGGAGATGA	2796	
28	BP2901	CACCTTCGCGCTGCATTA	GCACGGTCTGCTGGA	2365	5
29	BP3315	CACCATGAGCAGAGCAGTTT	GATACTGAAATTCGGCATGT	1805	
30	BP3663	CACCGTGCCTCGTCTACT	CAAGTGGTTCGTCTCTTGT	2212	
31	BP2674	CACCATGCAAGCCAAAACG	AAGTCATACATCGGCGTCAG	771	
32	BP3270	CACCGGGCCGTCGTT	GCCGTGGTAGTCACCAGTAT	897	2
33	BP0346	CACCATGACCGAACCGACCTT	CGCATAGACGATTTCCGGTA	1182	
34	BP0418	CACCATGCATTCCAGGAC	CCAACCTTCGTGCATGAG	1051	
35	BP0542	CACCATGAAAGGATATGCAA	AACCAGGTTTCATGACGAAAG	1096	
36	BP0826	CACCATGACGCATCC	TGACAGAGGCGGATTGAT	1537	
37	BP0840	CACCATGAAAAAGACTCTGC	CGCAAACCTTTGGATTGT	1332	
38	BP0986	CACCATGAAACCTGTCGT	GGCCTGTCTGTTTGGAC	1417	
40	BP1126	CACCATGTCCAAACAATTC	GTATTCGCGGACGTTTCAT	1547	
41	BP1160	CACCATGATGAAAACCTCG	ACATGGAAATGGCAGTCC	1015	
42	BP1507	CACCATGCTCATGCGTCGT	CAGGGACCAGGTGTTGTC	958	
43	BP1532	CACCATGAAGATCAAAGC	GCCGAACAGAAGAACAGC	901	
44	BP1580	CACCATGCACCCACAC	CAGTGCGTGCTTCATTTG	729	
45	BP1631	CACCATGATCGAGCTTCA	GCCACCGTGTAGTTGAC	2189	

Tabla 15. Primers utilizados para amplificar la secuencia correspondiente a cada ORF de *B. pertussis* seleccionado y tamaño de los amplicones esperado. Número de índice de 1 a 68: ORFs correspondientes a candidatos vacunales; índices de 69 a 76: ORFs correspondientes a factores de virulencia.

Indice	ORF	Secuencia del primer 5'	Secuencia del primer 3'	Tamaño del producto esperado (en pb)	Tripletes iniciales eliminados
46	BP2204	CACCATGACAATGAAGCA	TGGTCGAACAGGAGAAGG	944	
47	BP2337	CACCATGCCCGCCGCTAC	AGCGGGTGATCTACATGG	2059	
48	BP2526	CACCCGGTCCCGGCTAC	CAGATCCTCCAGCAGAC	1584	3
49	BP2889	CACCATGAAGAACTGTCC	ACTTCTTCTGCGGAACG	461	
50	BP3150	CACCTTGCGCATTGATGA	GCGATTTCGTCATGGAGTT	1302	
51	BP3568	CACCATGCGCAAGCATT	CGACAGCGGTTTACAGGT	1178	
52	BP0347	CACCTTCTCGCCAAGCTG	CATTCTCCAGGGTATGGTT	868	570*
53	BP0456	CACCGCCTGTCGCTTG	CGACACCTTAAGGACGAGT	2368	17
54	BP0943	CACCATGAACAAACCTCCA	AGCGCTGCAATTAGTTCTTG	596	
55	BP1201	CACCATGCACATTTACGG	CATGAGGACTGACATCTGC	2017	
56	BP1251	CACCATGAAGCGGATCTC	ACAACCTTTTTACATGCAG	740	
57	BP1428	CACCATGATGTCTGATTTT	AAGCTGATTTCTCGTTTC	743	
58	BP1834	CACCATGTCACACAGATT	ACGCCAGTTCAGCAAG	656	
59	BP1883	CACCCGCGTAATTTCTT	TCGTTGCGTCAGTCATAGT	1101	3
60	BP2219	CACCATGGGCAAGTCAGTC	GGCAGACTCGTTTTTCATGC	1133	
61	BP2327	CACCCATGCCCTCCTT	AGCGGCTGGCCGAGAT	1742	10
62	BP2463	CACCGATCCCGCTCACT	GTTCTACAGGGGTTTCTTG	2295	2
63	BP3077	CACCTTGATATGTTATATCGTT	TATCGACCACCCAGGTCTA	2256	
64	BP3405	CACCATGCGTCGTCTTCT	TTTCATATACCCGCCATAGG	1199	
65	BP3495	CACCATGGCTGCCAAGCA	GGAAGGCGGGACTTAGAA	1660	
66	BP3790	CACCCAGACCGCATTTG	GACAGCAGGATTCGTGAC	2497	6
67	BP3793	CACCTTGACGCCTGACCA	ATGATCTTCTCCTGCTCGT	878	6
68	BP3794	CACCGCACGGATGATG	GGCGAAAACAGGGATT	875	
69	BP1119	CACCGTGTACCCATGCAA	CGATCAATTGCTGGACCATT	802	
70	BP1568	CACCATGTCCAAGTTTTATAC	GCTGAAGGACAAGATGGTCT	729	
71	BP3494	CACCATGTATCTCGATAGATTCC	GACTTCTAAGTCCCGCCTTC	3237	
72	BP3783	CACCATGCGTTGCACTCG	TGGGCCAGGTCTAGAACGAA	824	
73	BP3784	CACCATGACCGCAAGACG	AGTGGGGAAGCGTCTCAGCA	693	
74	BP3785	CACCATGCTGAGACGCTTCC	AGCACGGACAACAGGATGGA	509	
75	BP3786	CACCCGGCAAGCAGGATT	AGCACCAGGATGGGCAGAAT	535	
76	BP3787	CACCATGCTGATCAACAACAA	ACATGGACAGGCGAACAGAT	721	

Tabla 15. Primers utilizados para amplificar la secuencia correspondiente a cada ORF de *B. pertussis* seleccionado y tamaño de los amplicones esperado (continuación). Número de índice de 1 a 68: ORFs correspondientes a candidatos vacunales; índices de 69 a 76: ORFs correspondientes a factores de virulencia.

*En el caso del candidato BP0347 incluimos solamente el dominio receptor.

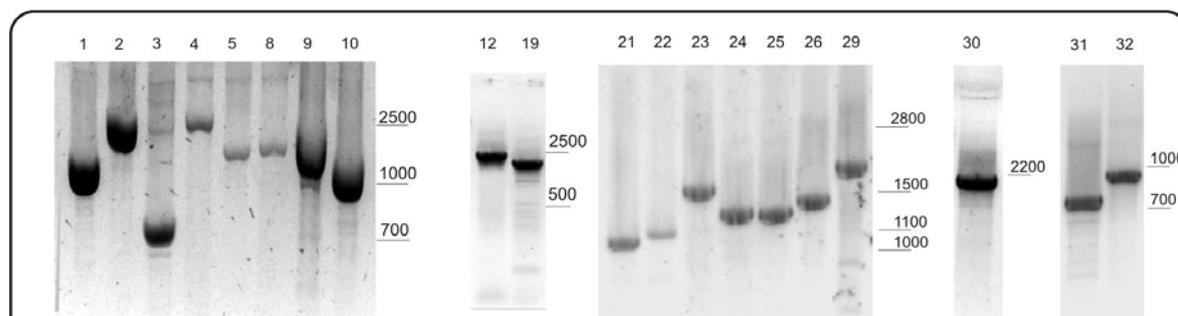


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v de los amplicones obtenidos para algunos de los candidatos seleccionados. Los índices numéricos refieren a la Tabla 14. Visualización de los productos mediante tinción con bromuro de etidio.

Clonado y obtención de los vectores de expresión

Luego de la obtención de los amplicones, la estrategia continúa con el clonado de cada uno en vectores adecuados. Como mencionamos, utilizamos inicialmente el sistema de clonado pEntr/SD/D-Topo (Invitrogen), que luego cambiamos por el sistema pET200 (también de Invitrogen). Ambos sistemas facilitan el clonado direccional, y en el marco de lectura correcto, de los amplicones de interés. El procedimiento seguido con ambos vectores tiene algunas diferencias, que describimos a continuación y esquematizamos en la Figura 19.

El vector pEntr -que usamos inicialmente- es parte de un sistema muy versátil, que permite transferir el inserto clonado entre distintos vectores. Este vector fue diseñado para facilitar la expresión de un mismo ORF en diferentes organismos como bacterias y plantas, por ejemplo, o bien para probar distintas alternativas de clonado cambiando la secuencia que se fusiona a la proteína de interés o incluso su ubicación en el extremo N o C terminal (sistema Gateway®, de Invitrogen) [201]. Para este fin el vector tiene, flanqueando la posición donde se inserta el amplicón, las secuencias correspondientes a dos sitios de recombinación (Figura 19). Una vez clonado el fragmento deseado en este vector, la construcción puede ser trasladada a otro vector, sin modificarse el marco de lectura, mediante una reacción de recombinación catalizada enzimáticamente (Figura 19). El vector pEntr es el vector de entrada de este sistema. Para lograr la expresión en bacterias -como es nuestro propósito- es necesario transferir luego el inserto clonado a un vector adecuado, que en nuestro caso fue el pDest17 (Invitrogen) [199].

El vector pET200, en cambio, posee las características necesarias para la expresión en bacterias de la secuencia de interés (sitio de unión a ribosomas, marca de histidina y codón de inicio), y carece de las secuencias necesarias para transferir este inserto mediante recombinación a otros vectores del sistema [202]. Este vector fue el que finalmente elegimos, porque permite la expresión en bacterias en un único paso, evitándose la recombinación. En la Figura 20 resumimos el esquema seguido con cada uno de los vectores mencionados.

En ambos casos para el clonado de las secuencias elegidas ajustamos la cantidad de cada producto de PCR obtenido según las recomendaciones del fabricante. Cada una de las mezclas de ligación se transformó en células de *E.coli* TOP10 (competentes químicas, de origen comercial, incluidas en el kit). Los transformantes conteniendo las secuencias de interés fueron seleccionadas de acuerdo a la resistencia a antibiótico y mediante ensayos de

PCR empleando primers específicos según especificamos en la sección Metodología (punto 2).

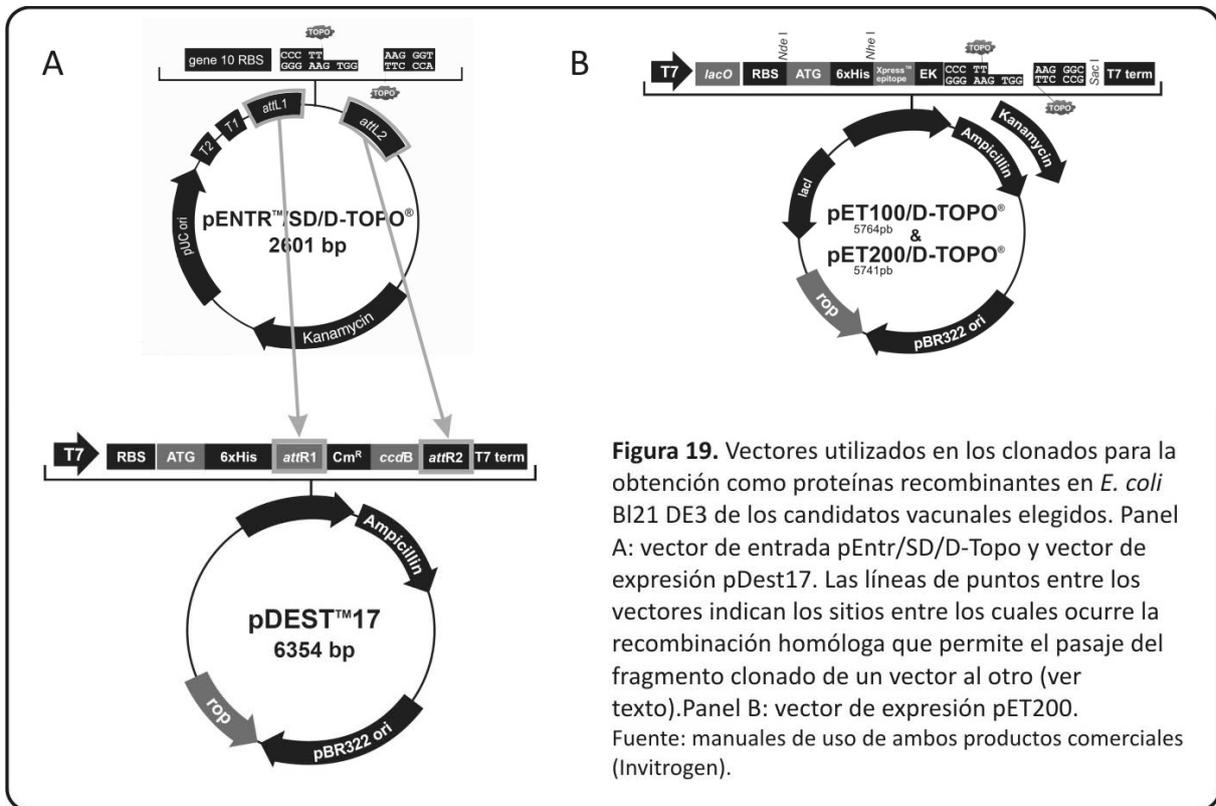
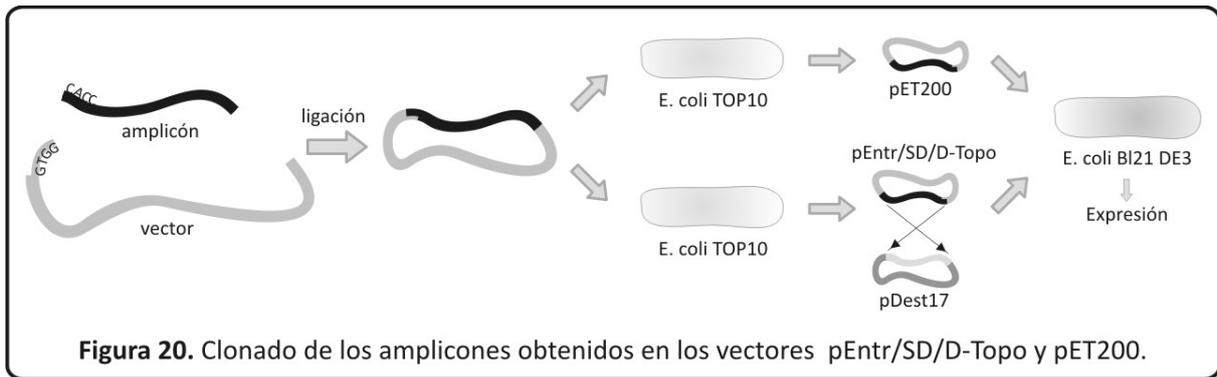


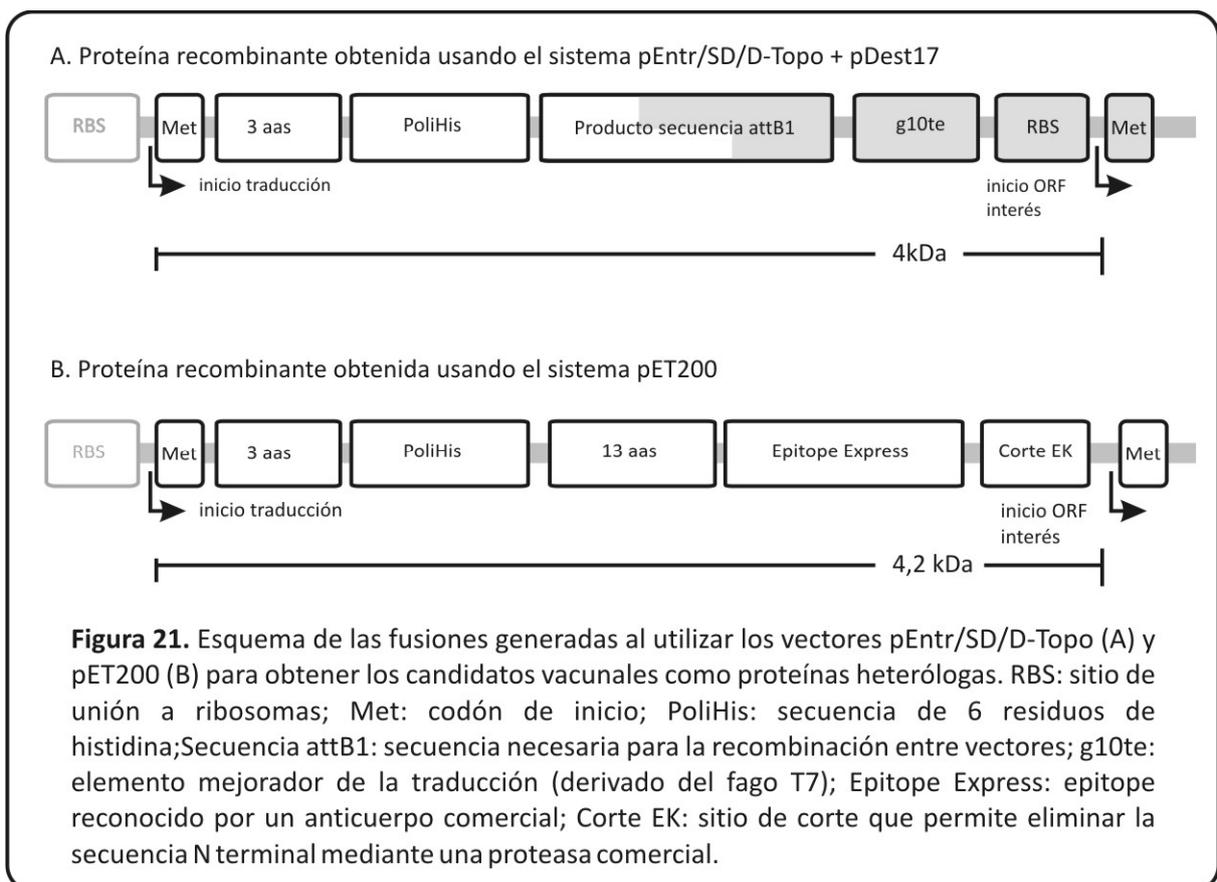
Figura 19. Vectores utilizados en los clonados para la obtención como proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 DE3 de los candidatos vacunales elegidos. Panel A: vector de entrada pEntr/SD/D-Topo y vector de expresión pDest17. Las líneas de puntos entre los vectores indican los sitios entre los cuales ocurre la recombinación homóloga que permite el pasaje del fragmento clonado de un vector al otro (ver texto). Panel B: vector de expresión pET200. Fuente: manuales de uso de ambos productos comerciales (Invitrogen).

Obtención de plásmidos de expresión

Cuando empleamos el vector pET200 no requerimos ningún paso adicional de clonación para expresar las proteínas de interés en bacterias. Para las construcciones en las que empleamos el plásmido pEntr empleamos el vector pDest17 en la expresión, y previamente transferimos el clonado mediante la enzima comercial LR recombinasa (Invitrogen). Realizamos cada uno de los pasos siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las construcciones que obtuvimos fueron transferidas a células de *E. coli* TOP10 competentes mediante un proceso de transformación química (ver punto 4 de la sección Metodología). Seleccionamos los transformantes conteniendo los plasmidos recombinantes de interés mediante el crecimiento en medio sólido con antibióticos específicos (Ampicilina) y ensayos de PCR utilizando primers específicos. A partir de los clones así seleccionados realizamos el aislamiento de los plásmidos pDest17 recombinantes (Figura 20).



La Figura 21 muestra esquemáticamente la secuencia resultante de los clonados en ambos sistemas. Ambos vectores de expresión incluyen las secuencias promotoras y de unión a ribosomas en la posición adecuada para permitir la expresión de la secuencia de ADN de interés. Seguidamente ambos vectores contienen un codón para la metionina, tres codones que codifican para otros tres aminoácidos y luego la secuencia correspondiente a la marca de polihistidina que en estos vectores se agrega entonces en el extremo N terminal (Figura 21).



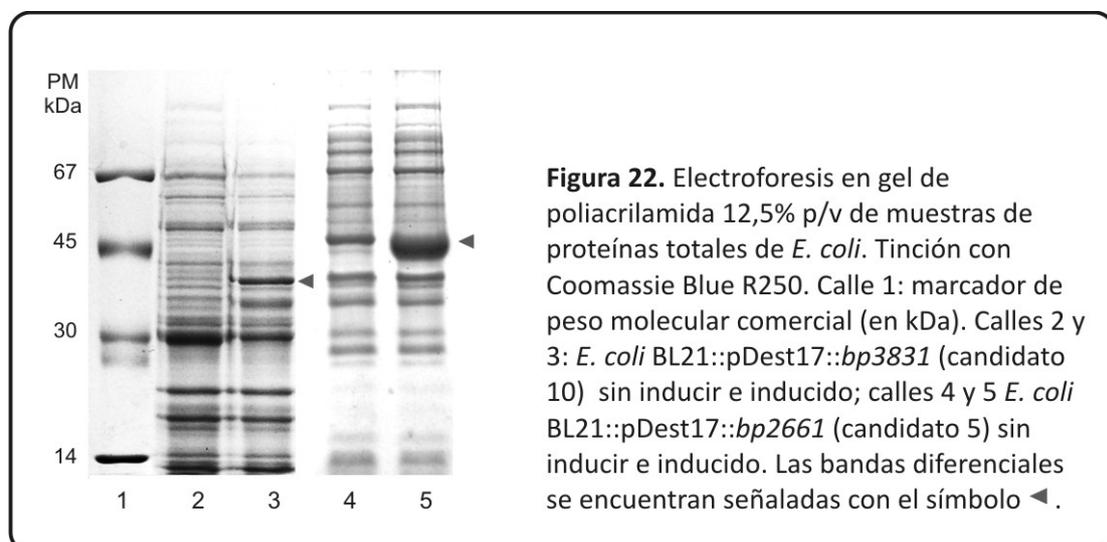
A partir de aquí, como muestra la figura, las secuencias de ambos vectores difieren fundamentalmente en que el vector pDest17 incluye la secuencia necesaria para la

recombinación de los amplicones, y ésta queda necesariamente posicionada dentro de la zona a ser traducida. El vector pET200 incluye en esta zona un epítipo que permite la detección específica de las proteínas recombinantes obtenidas. Así, con ambos vectores se obtienen productos con un aumento en el peso molecular del candidato original de unos 4kDa (Figura 21).

Expresión de las proteínas recombinantes

La expresión de los productos clonados en los dos vectores que utilizamos se halla bajo control de un promotor de la polimerasa del bacteriófago T7, que no es reconocido por las ARN polimerasas naturales de *E. coli*. Esto tiene la ventaja de evitar la expresión en niveles significativos de productos que pudieran ser potencialmente tóxicos para esta bacteria. Por este motivo, la expresión no se hace en las cepas usadas para la propagación del clonado (*E. coli* TOP10) sino en la cepa BL21 DE3 de *E. coli*. Esta cepa incluye en su genoma la secuencia de la ARN polimerasa del fago T7. La expresión de esta polimerasa se encuentra, a su vez, bajo control del promotor *lac*, de manera que puede inducirse por el agregado de IPTG al cultivo. Como consecuencia de la inducción, entonces, la polimerasa T7 transcribirá grandes cantidades de ARNm para la proteína clonada, que será luego traducido por la maquinaria de la célula. Por otro lado, la cepa BL21 DE3 ha sido privada de dos enzimas cuya ausencia mejora el rendimiento en proteínas recombinantes: por un lado, de la principal proteasa de *E. coli* encargada de la destrucción de proteínas defectuosas (codificada por el gen *lon*) y, por el otro, de la ARNasaE: una enzima que degrada el ARNm no protegido por ribosomas [203].

La expresión de las proteínas heterólogas en las bacterias recombinantes fue evaluada mediante corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida. La presencia de bandas diferenciales del peso molecular esperado en los cultivos después de la inducción respecto de los no inducidos sería indicativa de la correcta construcción recombinante. A modo de ejemplo, incluimos en la Figura 22 los perfiles proteicos comparativos sin inducir e inducido correspondientes a los candidatos 5 y 10 de la Tabla 14.



En la Figura 23 de la próxima página mostramos los perfiles proteicos obtenidos de clones recombinantes en los que se verificó mediante ensayos de PCR específicos la presencia del ORF seleccionado. Para simplificar la presentación no incluimos la condición sin inducir. Como se observa en la figura, la cantidad relativa de la proteína heteróloga respecto del total resultó ser muy variable, siendo en algunos casos una banda muy notoria y en otros una banda apenas perceptible como diferencial respecto del cultivo no inducido.

La identidad de las proteínas recombinantes obtenidas fue confirmada por espectrometría de masa del tipo UV MALDI-TOF. Para esto, sometimos a una digestión con tripsina el material proveniente de las bandas observadas como diferenciales incluidos en la Figura 23. La metodología permite obtener un espectro en el que se identifican una serie de picos, que corresponden a la masa de los péptidos en los que se ha tripsinizado la proteína a identificar. Luego se comparan, mediante programas informáticos, los espectros de masa experimentales con los obtenidos en una digestión *in silico* (ver detalles en el punto 13 de la sección Metodología). En la Tabla 16 resumimos los resultados de la identificación de los candidatos vacunales.

En total logramos expresar en *E. coli* e identificar 52 de las 75 secuencias elegidas. Los resultados en cuanto a rendimiento para los dos vectores utilizados fueron:

pENTR + pDEST17: sobre 96 reacciones de ligación, obtuvimos (luego de chequear varias colonias provenientes de cada ligación) 19 ORFs como proteínas recombinantes, lo que nos da un rendimiento global del procedimiento del 19,8%. La reacción de recombinación arrojó en todos los casos buenos resultados y no resultó limitante.

pET200: sobre 135 reacciones de ligación realizadas, obtuvimos (luego de chequear varias colonias provenientes de cada ligación) 39 ORFs como proteínas recombinantes, lo que nos da un rendimiento global del procedimiento del 29%.

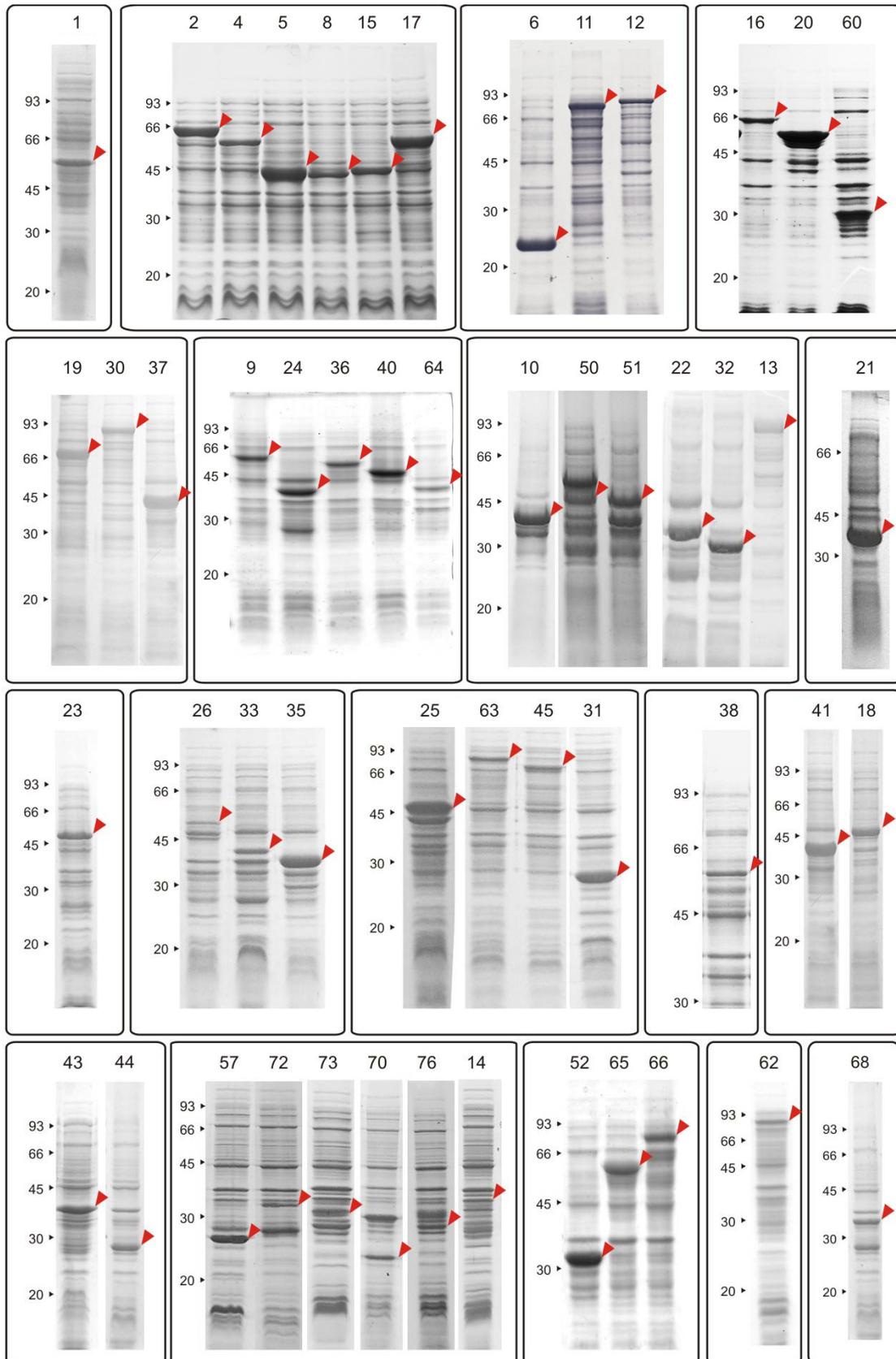


Figura 23. Electroforesis en geles de poliacrilamida 12,5% p/v de preparaciones de proteínas totales de los 52 clones de *E. coli* BI21 DE3 productores de los ORFs clonados como proteínas recombinantes. Tinción con Coomassie Blue R250. El índice sobre cada calle designa los candidatos vacunales y factores de virulencia según los códigos de la Tabla 14. Los ◀ marcan la posición de los candidatos vacunales. A la izquierda de cada figura se ha indicado el peso molecular en kDa.

Indice	ORF	Score MASCOT	Cobertura de la secuencia (%)	Picos coincidentes	Indice	ORF	Score MASCOT	Cobertura de la secuencia (%)	Picos coincidentes
1	BP1628	103	33	9	32	BP3270	110	59	13
2	BP1989	94	19	8	33	BP0346	136	34	10
4	BP2396	116	33	18	35	BP0542	105	49	13
5	BP2661	350	32	7	36	BP0826	214	37	16
6	BP3006	76	40	5	37	BP0840	116	50	14
8	BP3716	116	51	9	38	BP0986	107	45	17
9	BP3802	116	22	14	40	BP1126	153	44	13
10	BP3831	99	34	10	41	BP1160	181	36	9
11	BP0736	208	36	23	43	BP1532	126	60	13
12	BP0857	167	30	16	44	BP1580	90	48	6
13	BP1138	110	23	11	45	BP1631	379	51	28
14	BP1364	239	53	15	50	BP3150	142	44	16
15	BP2090	84	14	3	51	BP3568	98	37	11
16	BP2235	315	39	16	52	BP0347	138	23	14
17	BP3052	145	41	12	57	BP1428	92	39	7
18	BP3196	71	29	7	60	BP2219	124	59	14
19	BP3595	141	37	15	62	BP2463	177	41	19
20	BP3812	94	36	15	63	BP3077	196	28	15
21	BP0057	215	38	9	64	BP3405	128	42	11
22	BP0558	99	32	9	65	BP3495	140	42	16
23	BP0763	140	43	16	66	BP3790	96	26	14
24	BP1277	95	35	8	68	BP3794	104	49	10
25	BP1285	148	36	11	70	BP1568	87	26	12
26	BP1767	184	39	11	72	BP3783	264	55	9
30	BP3663	110	20	8	73	BP3784	135	38	8
31	BP2674	62	31	4	76	BP3787	87	27	9

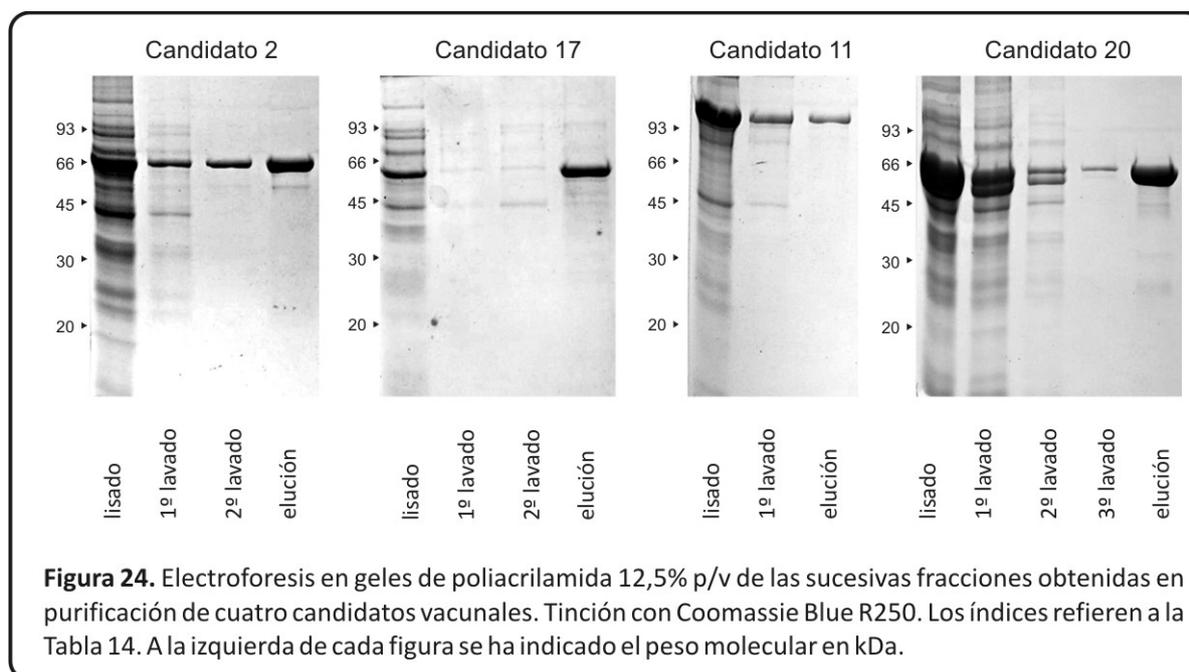
Tabla 16. Identificación por espectrometría de masa (MALDI-TOF) de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* BI21 correspondientes a los candidatos vacunales.

Purificación de los candidatos vacunales

Como ya mencionamos, los sistemas de clonado que utilizamos permiten la expresión de los candidatos vacunales con una marca de polihistidina que permite la purificación de las proteínas recombinantes por medio de una cromatografía de afinidad, aprovechando la propiedad de estos residuos aminoacídicos de formar un complejo tipo quelato con iones de metales divalentes, como el cobalto o el níquel [204, 205].

Para la purificación de los candidatos vacunales, realizamos de cultivos de cada cepa recombinante que luego cosechamos y sometimos a lisis por sonicación (ver punto 9 de la sección Metodología). Efectuamos luego una purificación en condiciones desnaturizantes en sistema batch en columna, incubando los lisados con una resina que posee sitios de unión a histidina y sobre la que se forma el complejo proteína-níquel (resina NiNTA, Invitrogen). Luego de algunos lavados para eliminar los contaminantes no unidos a la columna, eluimos cada proteína recombinante estableciendo condiciones en las que el complejo pierde estabilidad. Analizamos luego el grado de pureza de cada candidato vacunal purificado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de las fracciones de lavado y elución obtenidas.

La pureza lograda luego de una única purificación varió considerablemente con la cantidad de proteína presente en la muestra en relación a las proteínas de la cepa recombinante. Aquellas proteínas presentes en una alta cantidad (30 mg/L de cultivo o más) se obtuvieron en un alto grado de pureza (no detectándose proteínas contaminantes al analizar las muestras por SDS-PAGE y tinción con colorante Coomassie blue), pero sí aparecieron impurezas cuando la cantidad relativa de proteína de interés era más baja (10 mg de proteína por litro de cultivo o menos). La Figura 24 muestra, a modo de ejemplo, los perfiles de las distintas fracciones de purificación colectadas para cuatro de los candidatos vacunales obtenidos.



Luego de la purificación y con el objetivo de eliminar de la preparación los reactivos introducidos durante la purificación, las fracciones conteniendo cada candidato vacunal fueron sometidas a diálisis. Luego de este paso la mayoría de las proteínas resultaron ser al menos parcialmente insolubles. En la Figura 25 pueden verse las preparaciones obtenidas para cada uno de los 52 candidatos vacunales purificados.

Resumen de resultados y conclusiones

En total, de los 75 ORFs elegidos pudimos amplificar por PCR 71 de ellos, los cuales clonamos en vectores de expresión. A partir de estos 71 candidatos clonados, expresamos y purificamos 52 proteínas recombinantes, 48 correspondientes a los 67 candidatos vacunales seleccionados y 4 correspondientes a los factores de virulencia (Tabla 17).

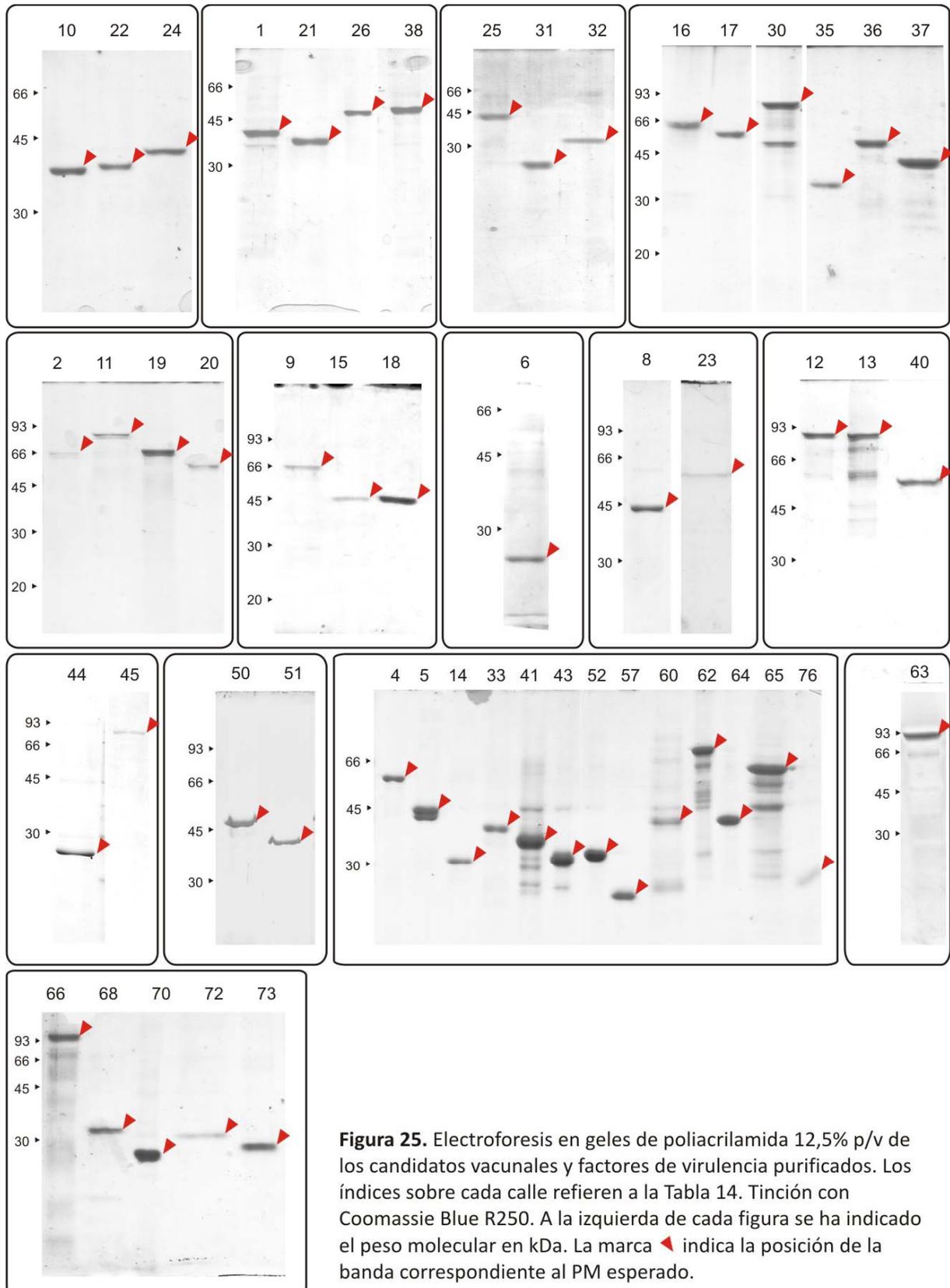


Figura 25. Electroforesis en geles de poliacrilamida 12,5% p/v de los candidatos vacunales y factores de virulencia purificados. Los índices sobre cada calle refieren a la Tabla 14. Tinción con Coomassie Blue R250. A la izquierda de cada figura se ha indicado el peso molecular en kDa. La marca ◀ indica la posición de la banda correspondiente al PM esperado.

	Candidatos vacunales	Factores de virulencia
Elegidos	67	8
Amplificados PCR	65	6
Clonados	65	6
Expresados	48	4
Purificados	48	4

Tabla 17. Resumen numérico de los resultados para los distintos pasos de la obtención de los ORFs elegidos como proteínas recombinantes.

A continuación nos referiremos al rendimiento en la obtención de los candidatos vacunales. En cuanto al rendimiento del proceso completo, podemos decir que, en general, el paso limitante fue la obtención de un buen número de colonias tras la primera ligación de cada producto de PCR en los vectores. En los casos en que obtuvimos varios clones transformantes en este primer paso, por lo general uno o más de ellos resultó expresar la proteína clonada al cabo del procedimiento completo. Por otro lado, en los casos en que obtuvimos pocos o ningún clon en la primera ligación, tras repetir este paso sí pudimos obtener un número adecuado de clones, por lo que pensamos que la variabilidad en el rendimiento se debe más al proceso de ligación en sí que a alguna característica intrínseca a los candidatos.

Más allá de esto, puede resultar interesante comparar el rendimiento de la metodología de obtención de proteínas recombinantes como un todo en función de algunas variables como el largo en pares de bases de cada amplicón, o el número de dominios transmembrana predichos. En nuestra experiencia, si bien los ORFs de más de 2.000 pares de bases resultaron relativamente más complicados de amplificar por PCR, no encontramos para estos candidatos que el rendimiento fuera mucho menor que para el promedio (la eficiencia global fue de 52/75 o 69%, y la de los amplicones de 1.900 o más pares de bases fue de un 64%). Para los amplicones de menos de 600pb, por otro lado, el rendimiento sí es significativamente menor que para el promedio (4/12 o 33%). En este punto debemos hacer una aclaración, y es que nuestra forma de trabajo consistió en obtener los candidatos vacunales no todos a la vez, sino secuencialmente en grupos de 10. Por este motivo, los candidatos de un grupo que en un primer momento no pudimos clonar exitosamente pasaron posteriormente por nuevos intentos de clonado. Por este motivo tuvimos éxito con muchos de los primeros candidatos (32 expresados sobre 38), y el rendimiento considerando los últimos candidatos fue menor (20 de los últimos 37 candidatos). Si bien es cierto que los ORFs de menor longitud son más abundantes entre los estos últimos (Tabla 14), debemos notar que los candidatos 3 y 7 (ambos de alrededor de 18kDa) pasaron por varios intentos de clonado sin éxito en la obtención de las proteínas recombinantes.

En cuanto al número de dominios transmembrana, en nuestra experiencia no encontramos una mayor dificultad para el clonado y expresión de ORFs con uno o dos dominios transmembrana predichos respecto de los ORFs sin estos dominios.

Por otro lado, como mencionamos más arriba, el nivel de pureza logrado mediante la purificación por cromatografía de afinidad se vio fuertemente influido por los niveles de expresión de las distintas proteínas elegidas. En ocasiones resulta difícil eliminar las proteínas contaminantes aún después de una segunda purificación de aquellos candidatos que se expresan en bajas cantidades (menos de 10mg por litro de cultivo de *E.coli*).

En el caso de uno de los candidatos, el candidato 23 o BP0763 encontramos que pasado un tiempo de su primera obtención y purificación, no pudimos volver a obtenerlo como proteína recombinante a partir de los stocks de *E. coli* Top10 almacenados a -20°C. No pudimos determinar la causa de este inconveniente. Como resultado de esta etapa contamos entonces con 47 proteínas recombinantes en forma purificada, con las que continuaremos con los siguientes pasos de la estrategia.

Respecto de la clasificación en las categorías funcionales ya mencionadas, encontramos que de las 48 proteínas obtenidas, 22 de ellas pertenecen a las categorías de transporte de metabolitos (correspondiendo 7 de las 22 al metabolismo del hierro). Otras 19 proteínas pertenecen a categorías que las señalan como proteínas de superficie. Estas 19 proteínas se dividen en 7 de membrana externa, 8 exportadas o periplasmáticas, y 4 que forman parte de estructuras o antígenos de superficie. Por otro lado, 2 proteínas tienen asignada la función de chaperonas periplasmáticas, y otras 2 pertenecen a la categoría de proteínas relacionadas a la virulencia. Por último, 2 de las proteínas obtenidas estarían involucradas en el metabolismo energético y 1 está clasificada como de función desconocida.

En las próximas dos secciones nos referiremos a los ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados para determinar el potencial inmunogénico de cada candidato.

Selección *in vitro* de los candidatos vacunales

Criterios para la selección *in vitro* de candidatos vacunales

Una vez obtenidos los candidatos vacunales como proteínas recombinantes purificadas, la estrategia de la vacunología reversa continúa con el tamizado de los candidatos, manteniendo aquellos que muestren mejores perspectivas como antígenos vacunales.

Como mencionamos con anterioridad, si queremos efectuar una selección *in vitro* de los candidatos, debemos poder medir en el laboratorio alguna propiedad de éstos que se encuentre relacionada con la protección en humanos. Stanley Plotkin utiliza el término “correlato de la protección” para designar estas propiedades de una vacuna que pueden ser medibles experimentalmente, y que además se relacionan causalmente con la protección. Según esta definición un correlato de la protección debe establecerse en función de un parámetro observable como por ejemplo evitar cierta manifestación clínica, como podría ser reducir el número de días de tos en el caso de pertussis [206]. Los correlatos pueden ser absolutos o relativos. Un correlato absoluto implica que esta relación entre la medida *in vitro* y la protección se cumple en el 100% de los casos, mientras que un correlato relativo se

verifica en un porcentaje menor. Cuando simultáneamente se pueden correlacionar con la protección dos o más parámetros, llamamos a éstos co-correlatos de la protección [206].

Como ya hemos mencionado, en el caso de *N. meningitidis* grupo B, los investigadores utilizan un ensayo *in vitro* que correlaciona con la protección en humanos: el poder bactericida de los sueros específicos contra los candidatos vacunales [122]. En este caso, se sabe que uno de los mecanismos de respuesta involucrados en la infección por neumococos es la lisis mediada por el complemento [124], de ahí que si el antisuero generado ante un candidato vacunal muestra un buen poder bactericida, probablemente tenga también cierto poder protector.

Con el objetivo de establecer nuestra elección particular de ensayos *in vitro*, pasamos a exponer a continuación algunos aspectos de la patogenia de *B. pertussis* y la respuesta inmune montada ante esta bacteria. El conocimiento de la respuesta inmune ante la infección natural y la vacunación con un microorganismo es el aspecto central del desarrollo racional de vacunas, ya sea mediante vacunología reversa u otras estrategias relacionadas [207].

Patogenia de B. pertussis y respuesta inmune

La infección comienza cuando bacterias provenientes de un individuo infectado ingresan en las vías respiratorias de un individuo susceptible. A través de moléculas agrupadas bajo la categoría de adhesinas, la bacteria se ancla fuertemente al epitelio ciliado respiratorio. Las proteínas involucradas en esta adhesión son principalmente la toxina pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA), pero las fimbrias (Fim), la proteína pertactina (Prn), y la proteína de resistencia al suero (BrkA), cumplen también un rol. Aunque *B. pertussis* no invade mayormente el tejido, la toxina PT pasa al torrente sanguíneo, donde ejerce sus efectos sistémicos (linfocitosis e hipoglucemia) [40]. Por otro lado, las proteínas adenilato ciclasa –hemolisina (AC-Hly, que ingresa en el citosol de las células del hospedador), BrkA y la propia PT tienen la propiedad de influir en las respuestas de las distintas poblaciones celulares que conforman el sistema inmune [43, 208-210]. Otras dos toxinas, la citotoxina traqueal y la toxina lábil al calor, producen daño en el epitelio bronqueoalveolar [211].

Ante esta batería de factores de virulencia, el sistema inmune monta a su vez una respuesta dual: por un lado se desarrolla una respuesta celular que culmina con la activación de neutrófilos y macrófagos, y por el otro se generan anticuerpos capaces de reconocer distintos antígenos bacterianos [92]. Se cree que ambos tipos de respuesta tienen roles complementarios en la resolución de la infección [146].

En este contexto, los correlatos con la protección contra *B. pertussis* difícilmente puedan pensarse como en otras infecciones en las que la patogenia está mediada por

toxinas únicas, como la difteria o el tétanos, y el nivel de anticuerpos anti toxina actúa satisfactoriamente como un correlato absoluto [206]. La búsqueda de correlatos *in vitro* de la protección depende, al menos en parte, de disponer de un conocimiento más acabado de la interacción patógeno-huésped implicada en esta infección. En este sentido se han realizado numerosas investigaciones para establecer el perfil de respuesta generado ante la infección y la vacunación con *B. pertussis*.

Como veremos más en detalle al introducir los ensayos *in vivo* que realizamos, el modelo animal más utilizado para el estudio de la infección por bacterias del género *Bordetella* es el modelo de infección en ratones. Los experimentos realizados con cepas de ratones mutantes, deficientes en distintas funciones del sistema inmune, han resultado muy útiles en una primera caracterización del tipo de respuesta suficiente para eliminar la infección. En primer lugar, estos ensayos han demostrado que la eliminación de *B. pertussis* del tracto respiratorio inferior del ratón depende de la respuesta inmune adaptativa. Además, tanto las células T como las células B resultan necesarias para la adecuada resolución de la infección [92]. Se ha hipotetizado que esto podría deberse a la existencia de una fase de infección intracelular por *B. pertussis* (clásicamente considerada como una infección extracelular) [212].

Por otro lado, se han realizado numerosos ensayos con ratones inmunocompetentes, con la idea de caracterizar los mecanismos de reacción ante la infección y la inmunización con *B. pertussis*. Estos experimentos han demostrado que los mecanismos de respuesta inmune ante la infección, la vacunación con vacunas de células completas, o la vacunación con vacunas acelulares difieren cualitativamente entre sí [92]. Como resumen de estos trabajos, en general podemos decir que la respuesta inmune ante la infección por vía intranasal o la inmunización por vía intraperitoneal con células completas de *B. pertussis* presenta un perfil que ha sido catalogado clásicamente como de tipo Th1 (inmunidad celular), mientras que la vacuna acelular activaría una respuesta de tipo Th2 (inmunidad humoral) [146, 213]. En el primer tipo de respuesta, el rol central en la protección estaría a cargo de las células efectoras de la respuesta adaptativa: macrófagos y neutrófilos. El panorama de la respuesta celular se ha complejizado con el descubrimiento, relativamente reciente, de que un nuevo perfil denominado Th₁₇ estaría involucrado en la respuesta a *B. pertussis* y a otras infecciones que no son efectivamente eliminadas por las respuestas Th₁ o Th₂, así como en enfermedades autoinmunes [214]. Según la serie de trabajos que abordan esta hipótesis, la respuesta inmune ante la infección comenzaría con el reconocimiento del lipopolisacárido de *B. pertussis* por un receptor de la inmunidad innata llamado TLR4 (toll-like- receptor 4) [43]. La secuencia de señales necesarias para la diferenciación de la población Th₁₇ en humanos no se conoce aún en su totalidad, pero se sabe a partir de

trabajos en otros sistemas que la interleuquina IL6 y el factor TGF β son necesarios para iniciar la diferenciación de linfocitos Th₀ en Th₁₇ [214]. Una vez establecida en el sitio de la infección, la población Th₁₇ es la responsable de la secreción de IL17, que estaría implicada en la respuesta celular, estimulando la fagocitosis por parte de los macrófagos [215] y el reclutamiento de neutrófilos [214]. El mecanismo se ha estudiado, con resultados concordantes, en el modelo de infección de ratones tanto sin inmunizar como inmunizados con vacunas de células completas [215, 216].

El establecimiento de una respuesta tipo Th₁₇ podría explicar el perfil observado en cuanto a la respuesta celular, y concuerda con experimentos anteriormente realizados, que asignaban a esta respuesta inmunitaria un rol en la defensa ante *B. pertussis*, en los que se tomaba como principal marcador de respuesta celular la producción de IFN- γ [44]. Como mencionamos, la vacunación de ratones con vacunas de tipo acelular induce en cambio una respuesta de tipo Th2, y en este contexto la protección estaría mediada fundamentalmente por anticuerpos, aunque debemos tener en cuenta que en ninguno de los casos que citamos la polarización de la respuesta inmune es absoluta.

Las evidencias sobre la respuesta inmune en humanos indican que la polarización de la respuesta no se observa tan claramente en este huésped. Los perfiles observados en niños vacunados con los distintos tipos de vacunas no son tan definidos, encontrándose para las vacunas de célula completa un perfil tipo Th₁ [217], y para las acelulares un perfil más bien mixto Th₁/Th₂ [218, 219] especialmente luego de transcurrido un tiempo considerable desde el momento de la vacunación, aunque esto último podría estar influenciado por la existencia de infecciones no detectadas [220, 221].

Sin embargo, dentro del esquema de nuestra estrategia, son las respuestas humorales las más relevantes, porque éste es el modo de conferir protección de todas las vacunas a subunidades existentes¹². Por este motivo consideraremos a continuación la producción de anticuerpos contra *B. pertussis* y su grado de correlación con el estado de protección.

Rol de los anticuerpos en la infección por B. pertussis

Existen múltiples evidencias sobre el rol de los anticuerpos en la protección contra *B. pertussis*. Dada la importancia de este aspecto en lo que hace a nuestra estrategia, y en vistas a que ha sido un tema discutido en la bibliografía, pensamos que vale la pena repasar con cierto detalle estas evidencias.

Nos referiremos a tres tipos de experimentos distintos tendientes a establecer el rol de los anticuerpos en la defensa ante la infección por *B. pertussis*. En primer lugar mencionaremos ensayos en los que se ha intentado comprobar la funcionalidad *in vitro* de

¹² Como ya mencionamos, estos podría cambiar en los próximos años en base al uso de nuevos adyuvantes inductores de respuestas de tipo celular. Ver por ejemplo las referencias [222, 223].

los anticuerpos generados. Consideraremos luego las diversas experiencias de protección pasiva en animales y humanos (seroterapia), y por último la información obtenida en base a los ensayos clínicos de vacunas.

Respecto de los ensayos *in vitro* se ha descrito que los anticuerpos monoclonales contra diversos antígenos superficiales de *B. pertussis* inhiben la adherencia de esta bacteria a células epiteliales humanas [224, 225]. Estos ensayos involucraron tanto anticuerpos contra antígenos con un rol conocido en la adhesión (PT, PRN y FHA) como otros no relacionados directamente a la misma (*outer membrane protein P* u *ompP*)[224]. En un trabajo referido a los mecanismos de protección de los anticuerpos se investigó la capacidad de distintos sueros de individuos vacunados para promover la fagocitosis *in vitro*. Los investigadores encontraron que los anticuerpos anti - Prn pero no los anticuerpos contra el resto de los componentes incluidos en las vacunas acelulares, tienen la propiedad de favorecer la fagocitosis. Estos autores proponen que este sería uno de los mecanismos involucrados en la protección [225]. Por otro lado, se ha descrito que el suero de ratones inmunizados con distintas vacunas acelulares inhibe los efectos letales de la toxina pertussis sobre embriones de pollo [226]. Los ensayos brevemente citados aquí indican que los anticuerpos contra *B. pertussis* son funcionales y podrían tener un rol en la protección. En este sentido también se ha podido detectar la capacidad bactericida de sueros inmunes contra *B. pertussis*. En este tipo de ensayos, realizados fundamentalmente por los grupos de Alison Weiss y Eric Harvill, se han encontrado que el suero obtenido de individuos infectados es capaz de provocar la lisis de *B. pertussis in vitro*, lisis que estaría mediada por la vía clásica del complemento. Ambos grupos han intentado determinar, con algunos resultados parcialmente contradictorios, el rol de los distintos factores que afectan la resistencia de esta bacteria al suero [37, 227].

Los ensayos de inmunización pasiva en ratones, comúnmente utilizados para evaluar el rol de los anticuerpos, han sido revisados por Mooi y de Greeff en 2007 [228]. Estos autores llegan a la conclusión que en su conjunto los experimentos de protección pasiva en animales demuestran el rol de los anticuerpos en la protección contra *B. pertussis*. En la Tabla 18, elaborada a partir de la información incluida en el mencionado trabajo, se resumen los principales resultados de estos experimentos. En todos los casos podemos observar que el grupo de animales que recibe los anticuerpos muestra menor sintomatología, mayor sobrevivencia o un menor nivel de colonización bacteriana. Es importante remarcar también que existen reportes (no incluidos en la Tabla 18) según los cuales no se ha observado protección pasiva luego de transferir el suero de ratones infectados por vía intranasal o bien vacunados con preparaciones de células completas [229-231]. Contrariamente a estos trabajos y en un trabajo reciente del grupo de Camille Locht los autores reportan haber observado protección pasiva en ratones SCID luego de transferirles suero de ratones infectados con una cepa de *B.*

pertussis atenuada [232]. Estas diferencias podrían deberse, entre otros, a aspectos experimentales como el título de anticuerpos generado en cada esquema experimental y el momento de la infección en que son obtenidos.

Es importante recordar en este punto que el título específico logrado contra los antígenos incluidos en las vacunas acelulares es mucho mayor que el inducido por las vacunas de células enteras, lo que podría explicar también algunas contradicciones observadas.

	Antígeno	Fuente de anticuerpos	Modelo animal	Desafío	Resultados respecto de los controles
Huang et. al. (1962) [233]	Vacuna celular	Mono	Mono	Intranasal	Protección contra tos y leucocitosis
Sato et. al. (1981) [234]	FHA o PT	Conejo	Ratón	Intranasal	Mayor sobrevida, menor colonización, menor leucocitosis
Sato et. al. (1984) [235]	PT	Monoclonal	Ratón	Intracerebral, intranasal	Mayor sobrevida
Sato y Sato (1985) [236]	FHA o PT	Ratón	Ratón	Intranasal	Mayor sobrevida, menor leucocitosis
Oda et. al. (1985) [237]	varios	Calostro humano	Ratón	Intranasal	Mayor sobrevida, mayor ganancia de peso, menor leucocitosis
Kimura et. al. (1990) [238]	FHA	Cabra, rata	Ratón	Intranasal	Menor colonización
Olander et. al. (1990) [239]	Células enteras, FHA, PT	Ratón	Ratón	Intranasal	Mayor sobrevida
Shahin et. al. (1990) [240]	PRN	Monoclonal	Ratón	Intranasal	Mayor sobrevida, menor leucocitosis
King et. al. (2001) [33]	PRN	Monoclonal	Ratón	Intranasal	Menor colonización
Hellwig et. al. (2001) [241]	Vacuna celular	Conejo	Ratón	Intranasal	Menor colonización

Tabla 18. Experimentos en animales en los que se han encontrado evidencias del rol de la inmunización pasiva en la protección contra *B. pertussis*. FHA: hemaglutinina filamentosa, PT: toxina pertussis, PRN: pertactina. Fuente: *The case for maternal vaccination against pertussis*. Mooi, F.R. y S.C. de Greeff, *Lancet Infect Dis*, 2007. 7(9): p. 614-24.

La terapia de pacientes con síndrome coqueluchoide mediante la administración de suero anti - *B. pertussis* fue una práctica relativamente extendida antes de la disponibilidad de vacunas y antibióticos [1, 26]. Lamentablemente, muchos de los estudios sobre la efectividad de este tipo de tratamientos se realizaron, en su momento, sin incluir controles en los mismos. Uno de los estudios en los que sí se incluyeron controles indicó que la eficacia

de la seroterapia sería cercana al 40%, lo que permite asignar algún rol protector para los anticuerpos generados en el hombre [26]. El interés por la seroterapia se vio renovado años más tarde, con la aparición de las vacunas acelulares que como mencionamos inducen altos títulos de anticuerpos contra sus componentes [242]. En un experimento realizado en 1991 se transfirió el suero inducido en individuos vacunados con formulaciones acelulares, a individuos con diagnóstico de tos convulsa. Los resultados indicaron que la duración de la tos se redujo de 21 días (grupo no tratado) a 9 días en los individuos tratados con suero anti - PT o anti - PT y anti - FHA [242]. En otro estudio posterior, sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grupos tratados o sin tratar con suero anti - PT [26].

Los ensayos clínicos realizados al licenciar las vacunas acelulares son otra fuente de datos respecto del posible rol de los anticuerpos en la inmunidad a pertussis. En estos ensayos se midieron los niveles de anticuerpos contra los antígenos utilizados en cada formulación, y aunque en todos los casos se encontró un aumento en el título de los mismos, no pudo establecerse una relación concluyente entre el nivel de los anticuerpos y el nivel de protección [88-91, 243]. Sin embargo, estudios posteriores demostraron una menor susceptibilidad a desarrollar casos severos de pertussis en los chicos que tuvieran niveles altos de anticuerpos anti - PT, anti - PRN y anti - PT, o anti - PRN y anti - Fim [34, 244]. Resultados similares fueron reportados tras un ensayo clínico en Alemania, en el cual se encontró que el título de anticuerpos anti - Prn y anti - PT fue significativamente menor entre quienes contrajeron la infección [35]. Estas últimas son algunas de las evidencias más directas para asignar un rol a los anticuerpos en la protección contra *Bordetella* en humanos [92].

Por otra parte se han realizado una serie de experiencias tendientes a indagar si la vacunación de embarazadas permitiría prevenir la infección por pertussis. Es un hecho documentado para otras enfermedades que los bebés tienen durante sus primeros meses de vida cierta protección ante ciertas enfermedades infecciosas como difteria, poliomielitis o sarampión [228]. Dado que no se tienen evidencias de que las células de memoria maternas puedan atravesar la barrera transplacentaria, se considera que la protección por vía materna depende de los anticuerpos. Este es el caso de la vacuna contra tétanos neonatal, aplicada durante el tercer trimestre de embarazo [245]. En el caso de pertussis de hecho se ha comprobado en ratones que la vacunación de las hembras preñadas con vacunas acelulares brinda protección a su descendencia [236, 246]. En un estudio de 1946 esto mismo se observó en humanos utilizando en este caso las vacunas de células completas, en un estudio sobre 100 bebés de madres vacunadas y 100 de madres no vacunadas [247].

A modo de resumen de las evidencias repasadas hasta aquí, podemos decir que en determinadas condiciones, como las que representa la infección natural, la respuesta inmune dominante probablemente sea la inmunidad celular. Sin embargo, otras situaciones

como la inmunización empleando unos pocos inmunógenos purificados (como en el caso de las vacunas acelulares), llevan a que el sistema inmune responda de una manera diferente, generando un alto título de anticuerpos. El resultado final en ambos casos es que la infección se resuelve de forma adecuada.

Las evidencias descritas son compatibles con la idea de que los anticuerpos otorgan protección contra la infección por *B. pertussis* cuando están presentes por encima de determinados niveles. Sobre esta base es que nos planteamos identificar de entre nuestro repertorio de candidatos vacunales, aquellos reconocidos por la respuesta humoral montada ante el microorganismo completo. Cerrando el círculo, en nuestra hipótesis algunos de estos candidatos podrían luego, al ser usados como inmunógenos, generar un nivel de anticuerpos que resultara protector.

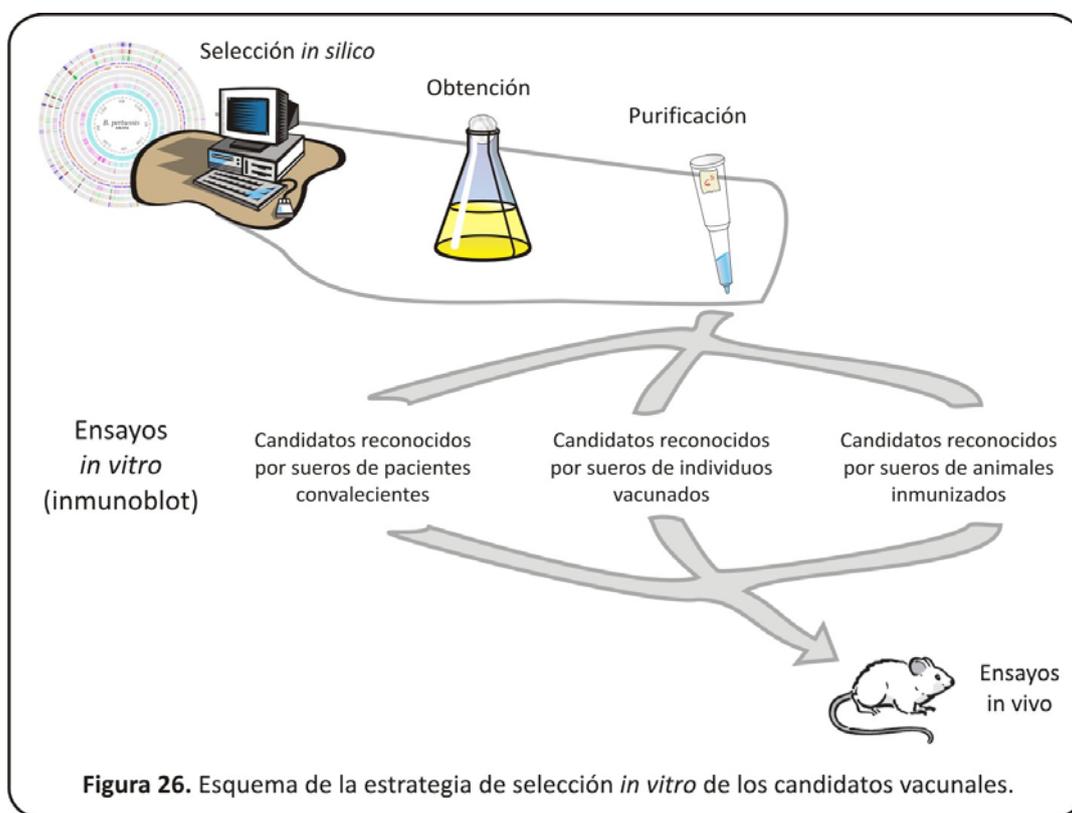
Teniendo en mente lo expuesto hasta aquí debemos establecer un algoritmo de trabajo que nos permita seleccionar los candidatos vacunales con mayores chances de resultar protectores para ensayarlos en experimentos con animales.

Estrategia de selección *in vitro* seguida en este trabajo

Dada la falta de un ensayo funcional único y específico, y debido a la dependencia no controlable (por el estado actual de conocimiento) de las condiciones experimentales de los diferentes ensayos posibles, en una primera instancia decidimos aplicar como criterio de selección el reconocimiento antígeno anticuerpo. En particular, evaluaremos el reconocimiento de nuestros candidatos vacunales por sueros de individuos infectados e individuos vacunados. Como discutimos en la sección “La vacunología reversa”, el reconocimiento de los candidatos vacunales por anticuerpos presentes en suero de pacientes con pertussis nos indicaría que estos candidatos serían expresados durante la infección natural, y serían también inmunogénicos en estas condiciones. Este mismo esquema puede repetirse con suero de individuos vacunados, y así evaluar si los candidatos vacunales seleccionados serían blancos de la respuesta inmune que sigue a la vacunación. En este caso, dado que la vacuna de células completas se obtiene a partir de cultivos de *B. pertussis*, el reconocimiento indicaría que los candidatos vacunales serían expresados *in vitro* por esta bacteria. La información sobre la expresión de los candidatos vacunales, ya sea *in vitro* o *in vivo*, es valiosa en sí misma. En este sentido debemos recordar que, sumando todos los resultados publicados sobre ensayos de transcripción génica hasta el momento, se tienen evidencias de que aproximadamente un 50% de los ORFs de *B. pertussis* son transcritos en alguna condición. El reconocimiento específico de un candidato a través de la técnica de inmunoblot por ejemplo, nos indicaría que éste es expresado *in vitro* o *in vivo*

según el caso. Nos permitiría además tener una primera aproximación sobre la inmunogenicidad de los candidatos elegidos.

El esquema general de trabajo que seguimos en los ensayos *in vitro* se encuentra esquematizado en la Figura 26. Nos focalizamos en primer lugar en el uso de sueros provenientes de humanos en el estadio de convalecencia de la enfermedad, siguiendo la idea que una de las principales ventajas de la vacunología reversa radica en la potencial identificación de candidatos vacunales que solo sean expresados *in vivo*. Complementamos este análisis empleando sueros de individuos vacunados que, como veremos, desarrollan un alto título antipertussis. Por último, describiremos también los resultados encontrados al evaluar el reconocimiento de los candidatos purificados por sueros de ratones inmunizados. Los candidatos identificados mediante estos tres esquemas complementarios de inmunoblot serán ensayados luego en el modelo animal de protección en ratones (Figura 26).



En el diseño de un ensayo de inmunoblot debimos ajustar las condiciones relativas a la muestra por un lado -en este caso nuestros candidatos vacunales-, y a los sueros por el otro. Nos detendremos en la forma de presentación de los candidatos vacunales para luego continuar con la metodología de selección y uso de los distintos sueros.

Obtención de los candidatos vacunales

Tal como describimos al referirnos a la expresión y purificación de los candidatos, éstos se purificaron en condiciones desnaturalizantes utilizando soluciones de guanidinio 6M en el paso de la unión a la resina, y de urea 8M en todos los pasos restantes. Asimismo, las condiciones de siembra y de corrida electroforética fueron también desnaturalizantes. Aunque no es lo ideal desde el punto de vista de que nuestras proteínas recombinantes deben representar lo mejor posible a los candidatos naturales, hay razones para evitar -en un primer screening- la obtención de los candidatos en su conformación nativa. En primer lugar, como las propiedades de estas proteínas son en general desconocidas, no se dispone de información estructural que permita caracterizar la conformación de las mismas, y lo mismo ocurre con sus posibles funciones. Si bien a partir de las bases de datos existentes y de programas de predicción de estructura de proteínas podría abordarse este aspecto, esto excede nuestro actual propósito. A su vez, trabajar con un número relativamente grande de proteínas restringe el tiempo disponible para estandarizar las condiciones de obtención de cada una de ellas. De modo que, en lo que sigue, dejamos de lado los epitopes conformacionales. Esta metodología de selección no quita que en pasos posteriores de la estrategia, una vez identificados algunos candidatos, los mismos se obtengan en condiciones nativas incluso a partir de un cultivo de *B. pertussis* como parte de un proceso de optimización de su poder protector.

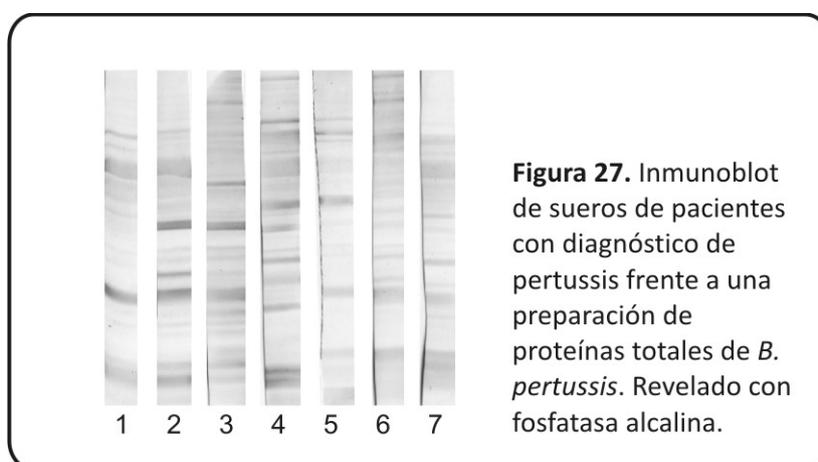
Variables que afectan la elección de los sueros

La elección de los sueros humanos debe realizarse atendiendo las múltiples variables que pueden afectar los resultados y, por ende, las conclusiones a las que pueda llegarse. Entre las variables epidemiológicas podemos mencionar la edad de los pacientes, su estado de vacunación, la metodología diagnóstica empleada, y la fase de la enfermedad por la que cursaba el paciente al momento de la toma de muestra. En el Recuadro 4 se incluye una breve descripción de fases clínicas de pertussis.

Todas estas variables, de alguna manera controlables, se suman a la influencia de las infecciones previas que cada individuo haya tenido. Es esperable que los sueros humanos posean una gran variedad de anticuerpos generados contra los antígenos que cada individuo haya encontrado en su trayectoria de vida reciente. Algunos de estos anticuerpos pueden reconocer proteínas de *B. pertussis* aunque no provengan de una infección por esta bacteria, dando lugar a reacciones cruzadas. En este sentido se han descrito por ejemplo reacciones cruzadas entre antígenos de *B. pertussis* y anticuerpos provenientes de infecciones por otras especies de *Bordetella*, por bacterias del género *Haemophilus* y por *Mycoplasma pneumoniae* [248]. La variabilidad en la respuesta ante distintos antígenos puede verse influenciada, además, por el haplotipo de cada individuo. Por lo tanto, aún cuando la respuesta contra *B. pertussis* fuera relativamente homogénea en cuanto a los antígenos

principales reconocidos, esperaríamos encontrar entre los sueros cierto nivel de heterogeneidad en los anticuerpos presentes.

Para ejemplificar lo antes dicho, en la Figura 27 mostramos el resultado de enfrentar algunos sueros de pacientes infectados a una preparación de proteínas totales de *B. pertussis*. Los 7 sueros incluidos en esta figura pertenecen a pacientes con diagnóstico de infección reciente que presentaron un alto título de anticuerpos anti - *B. pertussis* (1/1.280 o mayor, medido por ELISA). Como puede verse en la figura, todos los sueros ensayados reconocen varias bandas de esta preparación de proteínas totales. Sin embargo, los perfiles varían entre sí tanto en la intensidad de algunas bandas reconocidas por varios de ellos, como en el reconocimiento de otras.



Esta heterogeneidad podría resolverse utilizando en nuestros ensayos un gran número de sueros. Sin embargo, el trabajo con un número de aproximadamente 50 candidatos hace que esta posibilidad no sea la más adecuada. En su lugar decidimos no utilizar los sueros correspondientes a cada paciente en forma individual, sino agruparlos en conjuntos de 6 sueros con características epidemiológicas similares, según detallaremos más abajo. Con este diseño intentamos dar mayor peso a las reacciones que se dieran en la mayoría de los individuos, y minimizar las no compartidas.

Pasamos ahora a describir la selección de los distintos grupos de sueros y los resultados obtenidos con cada uno.

Ensayos con sueros de pacientes convalecientes de pertussis y adultos de población general

Con el objetivo de identificar aquellos candidatos involucrados en la respuesta a la infección en humanos, nos planteamos evaluar la presencia de anticuerpos contra los candidatos vacunales en sueros de pacientes infectados, utilizando sueros de individuos no infectados como control de especificidad.

Criterios de elección de sueros de humanos convalecientes de pertussis

Los sueros de pacientes los obtuvimos del conjunto de sueros que van llegando a nuestro laboratorio asociados a las muestras de aspirados nasofaríngeos para la realización del diagnóstico laboratorial de tos convulsa. Acompañando la muestra para diagnóstico de cada paciente, recibimos además una serie de datos epidemiológicos (planilla C2) que tomamos en cuenta al seleccionar los sueros. Entre los datos de interés podemos mencionar en primer lugar la edad y el estado de vacunación de cada paciente. Otras características propias del curso de la enfermedad, como la sintomatología o los días de tos previos a la toma de muestra, son también importantes al momento de definir qué sueros utilizar. El criterio general fue el de elegir aquellos sueros que correspondan a pacientes que al momento de la toma de muestra hayan desarrollado un alto título anti - *B. pertussis*, y que a su vez no se vean afectados por la presencia de anticuerpos debidos a la vacunación.

En lo que a la respuesta humoral se refiere, se ha establecido que pasadas unas dos semanas del comienzo de la infección se produce un aumento en el título de inmunoglobulinas anti - *B. pertussis* [145]. Este aumento puede medirse con el objetivo de diagnosticar la enfermedad. La metodología de diagnóstico serológico para pertussis más utilizada se basa en analizar muestras pareadas: la primera obtenida en la fase paroxística, y la segunda obtenida en la fase de convalecencia de la enfermedad (ver Recuadro 4). El diagnóstico se considera positivo cuando se comprueba una variación en el título de anticuerpos anti - *B. pertussis* entre ambas muestras. Teniendo en cuenta lo expuesto, nuestro criterio fue utilizar los sueros de aquellos pacientes que al momento de la toma de muestra hubieran presentado ya 14 o más días de tos, lo que nos situaría al menos a 4 semanas del inicio de la infección (Recuadro 4). Como mencionamos, en este tiempo ya es esperable un aumento en el título de anticuerpos.

Otra variable a tener en cuenta al momento de seleccionar los sueros de pacientes convalecientes es su estado de vacunación. La vacuna en uso en nuestro país está fabricada en base a células completas. Esta vacuna genera su propio patrón de respuesta, el que habrá que diferenciar del secundario a una infección. Se ha encontrado que el título de anticuerpos generado por la vacunación cae rápidamente al principio, y luego algo más lentamente, haciéndose indetectable transcurridos entre dos y cinco años después de la última dosis de vacuna recibida [249, 250]. Teniendo en cuenta este aspecto, nos propusimos elegir de entre los sueros disponibles, aquellos correspondientes a pacientes infectados que se encontraran ya lejos de la vacunación (al menos 8 años luego de la última dosis), para asegurarnos que el título de anticuerpos debido a la misma fuera lo menor posible. En una serie de experimentos que mostraremos más adelante indagamos específicamente el

reconocimiento de los candidatos vacunales por sueros provenientes de individuos recientemente vacunados.

Recuadro 4. Fases clínicas de la infección *B. pertussis*

Pertussis o tos convulsa es una enfermedad respiratoria aguda, caracterizada por presentar ataques paroxísticos de tos cuya frecuencia va aumentando a lo largo del cuadro. Su período de incubación varía entre 7 y 14 días, pasado el cual la enfermedad se desarrolla típicamente en tres fases sucesivas, que se denominan catarral, paroxística y de convalecencia [52, 53].

La fase catarral tiene una duración de una a dos semanas, comienza con una tos leve y seca, de predominio nocturno. Al final de este período la tos comienza a ser más frecuente y severa. Durante esta fase la bacteria puede aislarse a partir de las secreciones nasofaríngeas del paciente [251].

La fase paroxística o espasmódica normalmente tiene una duración típica de entre 1 y 6 semanas. Se caracteriza por estallidos o paroxismos de rápidos accesos de tos propios de la enfermedad. Luego de la tos puede producirse apnea, acompañada o no de cianosis. El estallido de tos termina usualmente con una inspiración ruidosa o estridor que ha dado el nombre inglés de “whooping cough” a la enfermedad. El vómito post-tusivo es común, y en ocasiones se presentan convulsiones. Durante las primeras dos semanas de esta fase los ataques se incrementan en frecuencia, luego permanecen al mismo nivel durante 2 ó 3 semanas y finalmente disminuyen. Durante la fase paroxística, que presenta la sintomatología más notoria, es cuando usualmente se sospecha de la enfermedad. Sin embargo, con el transcurso de la misma el diagnóstico microbiológico que hace cada vez más difícil [251].

La tercera fase, de convalecencia o recuperación, tiene una duración de 2 a 3 semanas, dependiendo de la gravedad de los síntomas que haya presentado la enfermedad.

Habitualmente son los niños menores de un año quienes presentan la mayor sintomatología y complicaciones, mientras que la enfermedad puede cursar casi sin síntomas en adultos.

Pasamos ahora a establecer los criterios concretos que utilizamos para incluir una muestra de suero en nuestro grupo de pacientes infectados. Si bien lo ideal sería contar con un buen número de sueros de pacientes adultos, con serodiagnóstico positivo y un alto título antipertussis, el número de sueros disponibles con estas características es en realidad relativamente limitado, lo que nos obligó a flexibilizar un poco estos criterios. Como ejemplo ilustrativo podemos decir que de entre más de 4.000 muestras (aspirados nasofaríngeos) analizadas entre Agosto de 2008 y Septiembre de 2010, solo 553 de ellas llegaron acompañadas con una primer muestra de suero (un 14%), y dispusimos de muestras pareadas solamente para 78 de éstas (menos del 2%). De estas 78 muestras pareadas, por otro lado, solo 12 corresponden a pacientes mayores de 14 años, y de éstas solo 4 cumplen

con la condición de los 14 días de tos previos a la toma de muestra. Por otro lado, faltando muchas veces una segunda muestra, no todos los sueros están titulados. Teniendo en cuenta esta situación, establecimos los siguientes tres criterios para la elección de los sueros de pacientes convalecientes, a los que añadimos las condiciones ya mencionadas respecto de la edad (individuos mayores de 14 años), y la fecha de inicio de síntomas (al menos dos semanas antes de la toma de muestra):

a) sueros cuyo título de anticuerpos anti - *B. pertussis* fuese de 1/320 o mayor, medido por la técnica de ELISA,

b) sintomatología compatible con tos convulsa, más reacción positiva en el inmunoblot donde enfrentamos cada suero en forma individual con la subunidad 1 de la toxina pertussis,

c) reacción de PCR positiva realizada sobre una muestra de aspirado nasofaríngeo asociada, más reacción positiva en western blot donde enfrentamos el grupo de 6 sueros con la subunidad 1 de la toxina pertussis.

Para la población de individuos adolescentes o adultos ya han transcurrido varios años de la última dosis de vacunación con *B. pertussis* y por eso podemos asumir que de encontrarse anticuerpos contra la toxina pertussis en estos individuos, éstos corresponden a una infección relativamente reciente. Este es el criterio que se utiliza comúnmente en los ensayos de seroprevalencia, en los que se mide normalmente el título de anticuerpos anti toxina pertussis [252-254]. En nuestro caso utilizamos una medida cualitativa, que consistió en realizar un inmunoblot no con la toxina completa, sino con la subunidad S1, que como mencionamos obtuvimos y purificamos usando el mismo procedimiento empleado para los candidatos vacunales (expresión heteróloga en *E. coli* y posterior purificación desnaturalizante).

Los datos correspondientes a los pacientes cuyos sueros fueron seleccionados pueden verse en la Tabla 19. El primer grupo, designado como S₁1 (por “grupo sueros de infectados 1”) fue seleccionado en base al primer criterio mencionado. En base al criterio b) seleccionamos los grupos S₁2 y S₁3, y en base al criterio c) seleccionamos los grupos S₁4 y S₁5. En este último paso probamos en realidad 5 grupos de 6 sueros cada uno, de los cuales los grupos S₁4 y S₁5 fueron los que dieron una reacción más significativa con rPTs1.

La edad promedio de los pacientes al momento de la toma de muestra resultó ser, para los 5 grupos elegidos, de 33,4 años.

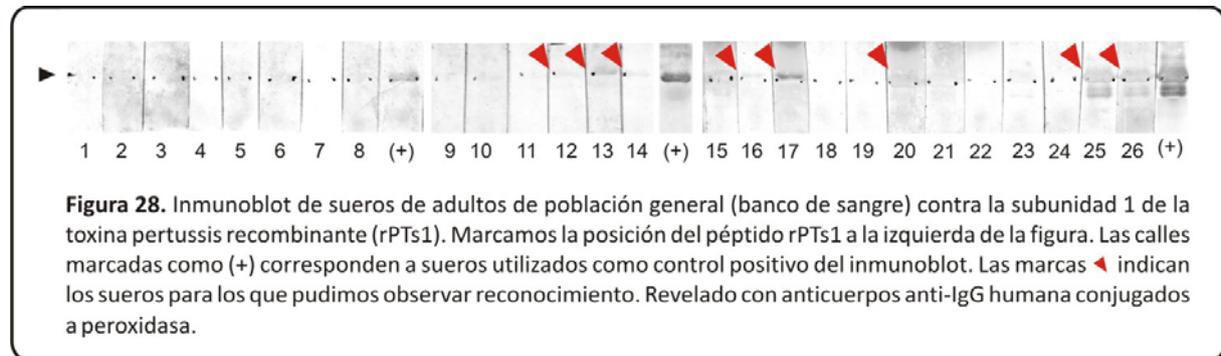
Grupo	Nº suero	Edad	Sintomatología	Días de tos	PCR Bp	Título anti Bp	Reactividad con rPTS1
Si1	1	21	s/datos	s/datos	neg	1/1280	++
	2	25	s/datos	s/datos	s/datos	1/640	+
	3	16	s/datos	s/datos	s/datos	1/320	++
	4	30	s/datos	s/datos	s/datos	1/640	++
	5	14	s/datos	s/datos	s/datos	1/1280	-
	6	26	s/datos	s/datos	s/datos	1/1280	++
Si2 ₁	7	87	tos parox	s/datos	pos	s/datos	++
	8	23	tos parox, vomitos	s/datos	pos	s/datos	++
	9	62	tos, estridor resp	20	s/datos	s/datos	++
	10	32	tos, tos parox, vomitos, apnea	21	neg	s/datos	++
	11	51	tos parox, vomitos, estridor resp	s/datos	neg	s/datos	++
	12	23	tos, tos parox	21	s/datos	s/datos	++
	13	26	tos, tos parox	14	s/datos	s/datos	++
Si3	14	23	tos, tos parox	14	s/datos	s/datos	+
	15	22	tos parox, vomitos	s/datos	pos	s/datos	+
	16	68	tos, estridor resp	s/datos	pos	s/datos	+
	17	23	sin sintomas	s/datos	pos	s/datos	+
	18	18	fiebre, apnea	s/datos	neg	s/datos	+
	19	41	fiebre, apnea, tos, tos parox	29	neg	s/datos	+
Si4	20	26	tos parox	s/datos	pos	s/datos	positiva como grupo
	21	38	sin sint	s/datos	pos	s/datos	
	22	27	s/datos	s/datos	pos	s/datos	
	23	16	s/datos	s/datos	pos	s/datos	
	24	30	tos, tos parox, vomitos	s/datos	pos	s/datos	
	25	21	tos parox, apnea, vomitos	s/datos	pos	s/datos	
Si5	26	18	s/datos	s/datos	pos	s/datos	positiva como grupo
	27	48	s/datos	s/datos	pos	s/datos	
	28	40	s/datos	s/datos	pos	s/datos	
	29	33	s/datos	s/datos	pos	s/datos	
	30	78	s/datos	s/datos	pos	s/datos	
	31	29	s/datos	s/datos	pos	s/datos	
Sc1	32						-
	33						-
	34	>18	s/datos	s/datos	s/datos	s/datos	-
	35						-
	36						-
Sc2	37						-
	38						-
	39						-
	40	>18	s/datos	s/datos	s/datos	s/datos	-
	41						-
	42						-
	43						-

Tabla 19. Características de los sueros de humanos convalecientes y de población general empleados en este trabajo. Grupos Si1 a Si5: sueros correspondientes a pacientes con diagnóstico de tos convulsa (sueros infectados). Sc1 y Sc2: sueros correspondientes a población general (sueros control). PCR Bp: resultado del diagnóstico molecular sobre aspirado nasofaríngeo. Título anti Bp: título del suero contra antígenos totales de *B. pertussis* medido por la técnica de ELISA. Reactividad con rPTS1: resultado de inmunoblots realizados en este trabajo.

Criterios de elección de sueros control

Los sueros de humanos no infectados fueron obtenidos del Banco de donadores de sangre de la ciudad de La Plata, por lo que estos sueros corresponden en principio a individuos sanos y mayores de 18 años. Dado que los adultos pueden desarrollar infecciones con muy poca sintomatología que suelen pasar desapercibidas, es necesario efectuar alguna prueba que permita descartar una infección reciente. Con este propósito probamos, en primer lugar, un esquema de inmunoblots de estos sueros contra proteínas totales de *B. pertussis*. Este ensayo sin embargo no resultó satisfactorio debido a la presencia de algunas

reacciones cruzadas. En lugar de usar proteínas totales, entonces, y basándonos en la evidencia de que los individuos infectados desarrollan anticuerpos contra la toxina pertussis, decidimos enfrentar los sueros a la subunidad 1 de la toxina pertussis recombinante (rPTs1). Mostramos en la Figura 28 el resultado de una serie de inmunoblots donde enfrentamos el péptido rPTs1 a distintos sueros en forma individual.



En la Figura 28, 8 de los 26 sueros probados (31%) reconocieron a la banda rPTs1 lo cual indicaría que algunos de los individuos habrían estado en contacto con el patógeno *B. pertussis*. Si bien nuestra aproximación se restringió a un estudio cualitativo, el porcentaje de individuos que podrían haber estado infectados recientemente coincide con otras indagaciones sobre seroprevalencia de pertussis en adultos sanos [56, 255]. El porcentaje encontrado para una población similar, también constituida por donantes de sangre mayores de 17 años en Dinamarca, fue menor pero también significativo [253].

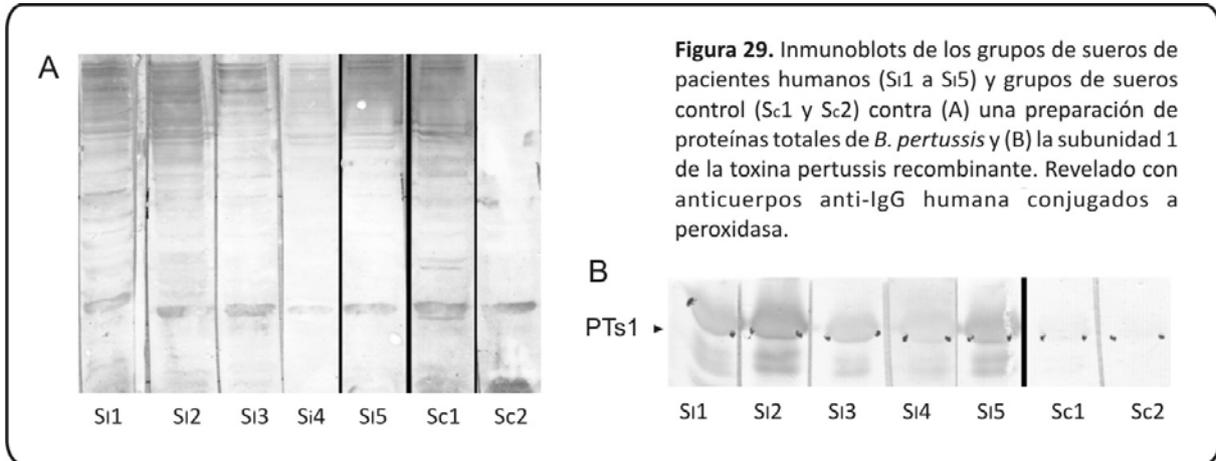
En base a este criterio, seleccionamos doce sueros que juntamos en dos grupos de 6 sueros cada uno. Denominamos a estos grupos Sc1 y Sc2 por “sueros control” (Tabla 19).

Una vez seleccionados, caracterizamos los sueros de pacientes convalecientes y de individuos control en forma agrupada, para indagar su reactividad tanto frente a la toxina pertussis recombinante como frente a una preparación de proteínas totales de *B. pertussis*.

Los resultados de esta caracterización se encuentran en la Figura 29 y en la Tabla 19. Como puede observarse en la Figura, los grupos de sueros S₁1 y S₁2 son los que presentan una mayor cantidad de bandas de reconocimiento correspondientes a diferentes péptidos de *B. pertussis*. El grupo de sueros S₁4 es el que presenta un perfil más sencillo y más débil, mientras que los perfiles de los grupos de sueros control (Sc1 y Sc2, adultos de población general) son bastante diferentes entre sí.

Los perfiles descriptos se correlacionan aproximadamente con la otra propiedad de los grupos de sueros evaluada, es decir el reconocimiento de la subunidad proteica rPTs1. Como puede verse en el panel B de la Figura 29, el reconocimiento de esta subunidad es notablemente mayor para los grupos de sueros de pacientes que para los grupos de sueros control, para los cuales no fue detectable. Además, el grupo de sueros S₁4, que presenta el

menor reconocimiento del perfil proteico total (Figura 29, Panel A) presenta también la reacción más débil con rPTs1 (Figura 29, Panel B).



Las Figuras 30A a 30E muestran los resultados de los inmunoblots realizados con los 5 grupos de sueros de pacientes convalecientes, enfrentados a los 47 candidatos vacunales probados.

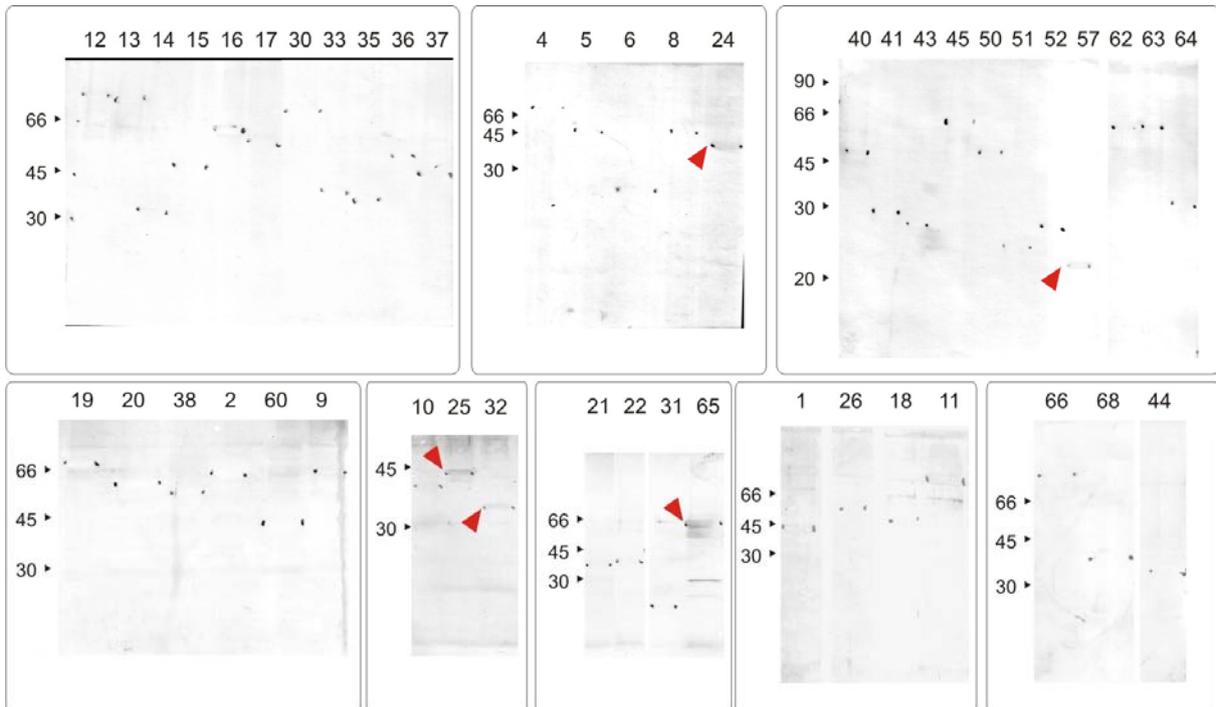


Figura 30 A. Inmunoblots enfrentando el grupo Si1 sueros de humanos convalecientes contra los 47 candidatos vacunales purificados. Los índices sobre cada calle refieren a la Tabla 14. Los ◀ marcan la posición de los candidatos vacunales reconocidos. A la izquierda de cada figura indicamos el peso molecular en kDa. Revelado con anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa.

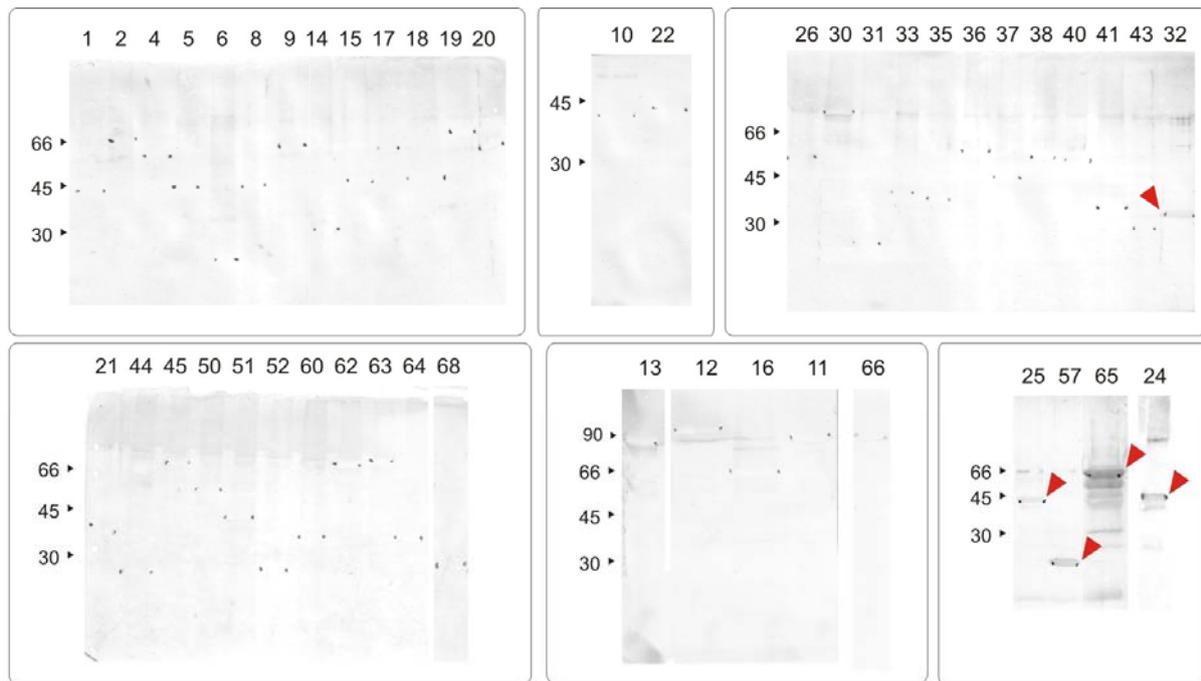


Figura 30 B. Inmunoblots enfrentando el grupo S12 sueros de humanos convalecientes contra los 47 candidatos vacunales purificados. Los índices sobre cada calle refieren a la Tabla 14. Los ◀ marcan la posición de los candidatos vacunales reconocidos. A la izquierda de cada figura indicamos el peso molecular en kDa. Revelado con anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa.

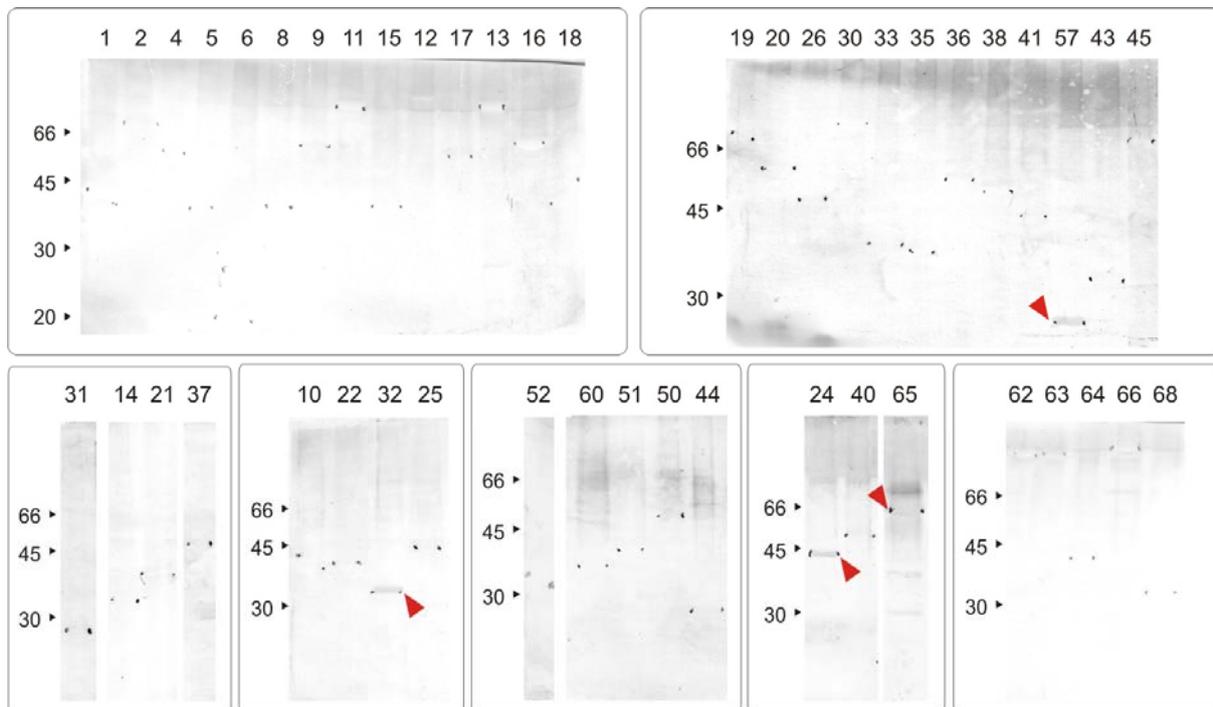


Figura 30 C. Inmunoblots enfrentando el grupo S13 sueros de humanos convalecientes contra los 47 candidatos vacunales purificados. Los índices sobre cada calle refieren a la Tabla 14. Los ◀ marcan la posición de los candidatos vacunales reconocidos. A la izquierda de cada figura indicamos el peso molecular en kDa. Revelado con anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa.

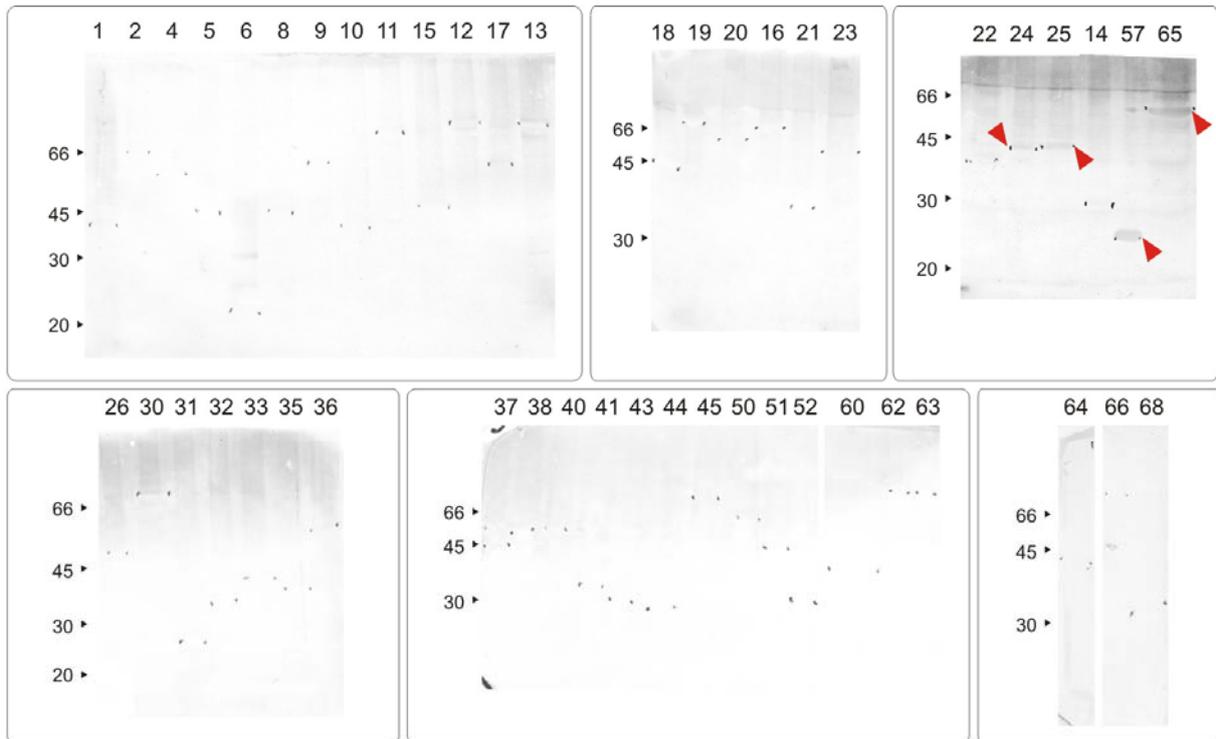


Figura 30 D. Inmunoblots enfrentando el grupo Si4 sueros de humanos convalecientes contra los 47 candidatos vacunales purificados. Los índices sobre cada calle refieren a la Tabla 14. Los ▲ marcan la posición de los candidatos vacunales reconocidos. A la izquierda de cada figura indicamos el peso molecular en kDa. Revelado con anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa.

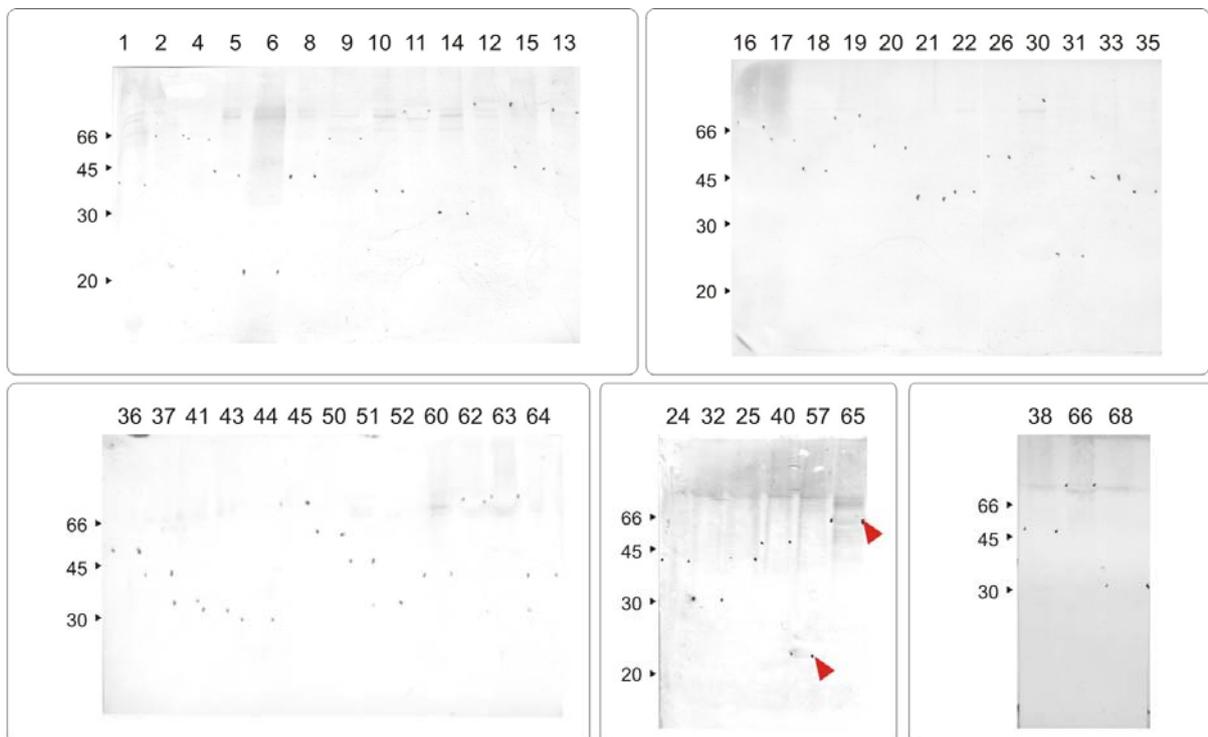
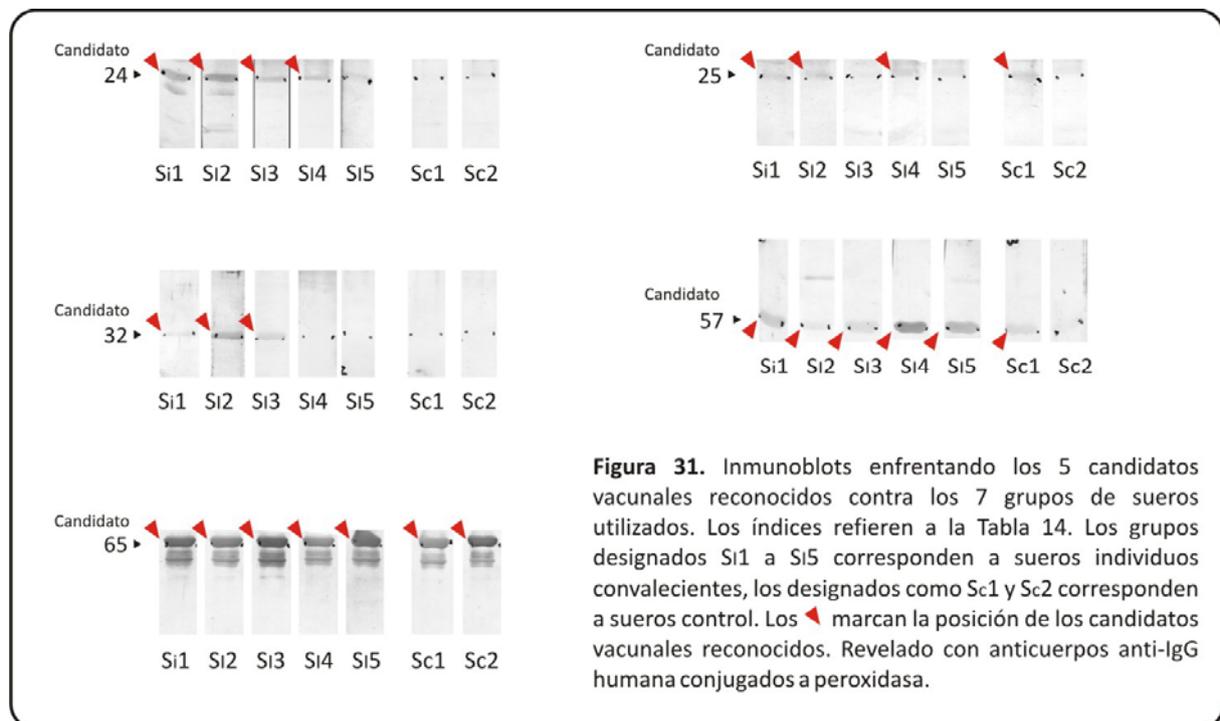


Figura 30 E. Inmunoblots enfrentando el grupo Si5 sueros de humanos convalecientes contra los 47 candidatos vacunales purificados. Los índices sobre cada calle refieren a la Tabla 14. Los ▲ marcan la posición de los candidatos vacunales reconocidos. A la izquierda de cada figura indicamos el peso molecular en kDa. Revelado con anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa.

En total cinco de los 47 candidatos vacunales ensayados fueron reconocidos por los sueros de pacientes convalecientes. Puede observarse en los distintos paneles de la figura cierto nivel de reactividad presentada por estos sueros contra las proteínas presentes como impurezas. Dichas impurezas provienen del perfil proteico de *E. coli* BL21 DE3, de donde obtuvimos los candidatos vacunales. A pesar de esta complicación experimental, para la mayoría de los candidatos ensayados no se observa reacción alguna, lo que nos permitió discernir claramente cuáles candidatos eran reconocidos por estos grupos de sueros y cuáles no.

Para verificar que el reconocimiento de los candidatos vacunales fuera consecuencia de la infección por *B. pertussis*, repetimos estos ensayos utilizando como control los sueros de los grupos Sc1 y Sc2. En la Figura 31 mostramos los resultados obtenidos para los 5 candidatos y los 7 grupos de sueros de individuos infectados y de individuos sanos. Estos mismos resultados están resumidos en la Tabla 20. Como puede verse en la figura, dos de los candidatos, el candidato 24 y el 32 (BP1277 y BP3270, respectivamente) fueron reconocidos específicamente por los sueros de pacientes y no por los sueros control. Este mismo patrón de reconocimiento fue observado para rPTs1 (Figura 29). El primero de estos candidatos fue reconocido por 4 de los cinco grupos de sueros de pacientes (todos excepto S_i5), y el segundo por tres de ellos (S_i1, S_i2 y S_i3). Estos resultados indicarían que el reconocimiento de estas proteínas es específico de los pacientes infectados, y que por lo tanto la respuesta humoral en humanos infectados por *B. pertussis* incluiría estas proteínas como blancos.



Indice	ORF	Si1	Si2	Si3	Si4	Si5	Sc1	Sc2
24	BP1277	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO
25	BP1285	SI	SI	NO	SI	NO	SI	NO
32	BP3270	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO
57	BP1428	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO
65	BP3495	SI						
rPTs1	BP3783	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO

Tabla 20. Candidatos vacunales reconocidos por los sueros humanos empleados.

Los otros tres candidatos de la Tabla 20 fueron reconocidos en alguna medida por los sueros de pacientes y por los sueros de la población control. Por lo tanto, en base a este único criterio no podemos afirmar que el reconocimiento esté asociado a la infección por *B. pertussis*. Sin embargo, el uso de sueros de pacientes con seroconversión, como veremos a continuación, nos permitirá llegar a esa conclusión para dos de los tres candidatos (BP1428 y BP3495). Volveremos sobre el candidato BP1285, también reconocido en forma inespecífica por los sueros de humanos convalecientes y grupos control, al referirnos a los ensayos realizados con sueros de ratones inmunizados.

Sueros con seroconversión como herramienta complementaria

A causa de las reacciones cruzadas, es posible que aún los sueros de adultos de la población control reconozcan alguno de los candidatos, si éste comparte epitopes con algún antígeno ampliamente distribuido. El uso de muestras de suero pareadas, extraídas a un mismo individuo en dos momentos distintos de la infección por *B. pertussis* (fase paroxística y convaleciente), puede servirnos como un criterio adicional para discriminar entre las reacciones cruzadas y el reconocimiento específico. La ventaja inherente al uso de estos sueros es que podemos suponer razonablemente que, para un determinado paciente, la variación de la especificidad de sus anticuerpos en el período de 3 semanas entre la toma de ambas muestras de suero se deberá únicamente a la infección por *B. pertussis*. Por lo tanto al analizar estas muestras, en las que se detectó seroconversión, esperamos encontrar un aumento en el reconocimiento del perfil de proteínas totales de *B. pertussis* considerable. De existir reacciones cruzadas, por otro lado, estas deberían mantenerse en un nivel similar en ambas muestras.

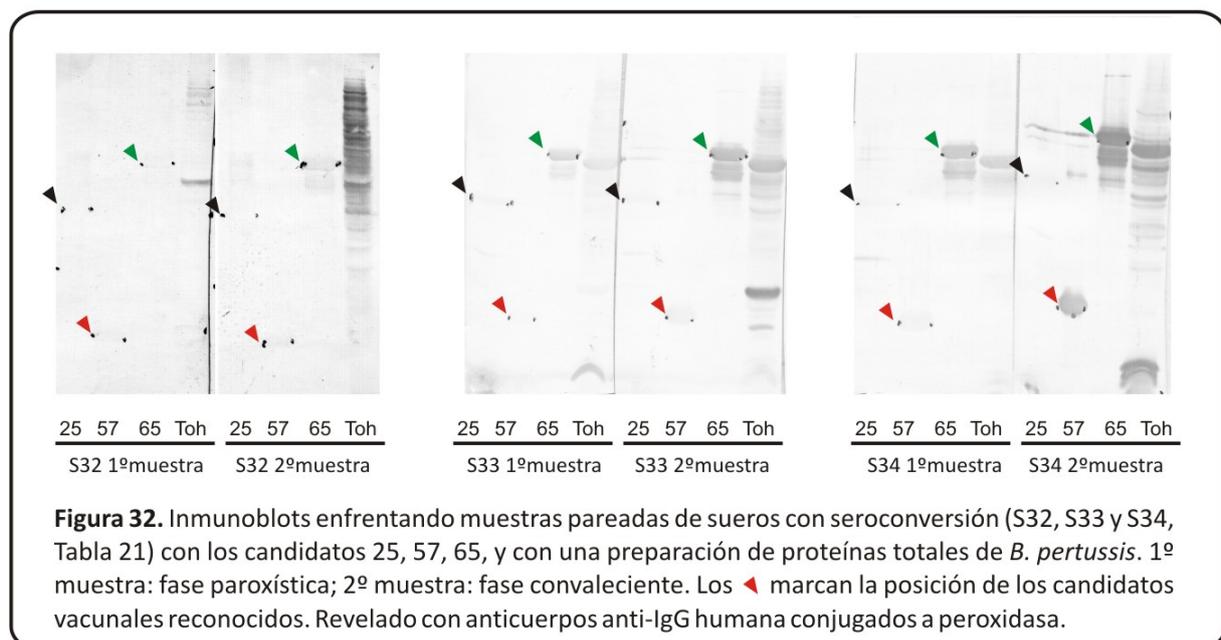
Luego de algunas pruebas preliminares para ajustar las condiciones de los ensayos, elegimos sueros cuyo título aumentara significativamente, siendo al menos 8 veces superior para la segunda muestra respecto de la primera. Además elegimos aquellos sueros en los que el título de la primera muestra fuera de 1:40 o menor. Las características de estos sueros fueron resumidas en la Tabla 21. Estos sueros como puede observarse en la Tabla 21, no cumplen con los criterios de inclusión utilizados más arriba, dado que en todos ellos podrían encontrarse anticuerpos derivados de la vacunación, con mayor probabilidad para el caso de los sueros S32 y S34.

Nº Suero	Edad	Titulo anti Bp (ELISA)	
		1º muestra	2º muestra
S32	1año 5m	20	640
S33	5 años	20	320
S34	1año 3m	40	640

Tabla 21. Características de los sueros pareados con seroconversión empleados en este trabajo.

A partir de estos sueros realizamos los ensayos de inmunoblot y mostramos los resultados obtenidos en la Figura 32. Como era esperable, el reconocimiento del perfil de proteínas totales de *B. pertussis* resultó mayor en el caso de las segundas muestras (Figura 32). En relación al reconocimiento de estos sueros por los candidatos, estos ensayos nos permitieron observar que tanto el candidato 57 (BP1428) como el 65 (BP3495) muestran una reacción significativamente más fuerte con la segunda muestra de suero que con la primera. El aumento en los anticuerpos específicos contra estos candidatos nos permitiría entonces concluir que el reconocimiento detectado se deba muy probablemente a la infección por *B. pertussis*. Debemos remarcar que el carácter de los resultados a los que arribamos en este apartado no tiene el peso estadístico que podemos asignar a los ensayos anteriores, porque reflejan en última instancia el curso de la infección en tres pacientes únicamente. Sin embargo, permiten fundamentar que estos candidatos son capaces de originar una respuesta inmune durante la infección *in vivo* en el humano.

En el caso del candidato 25 o BP1285, en cambio, no observamos diferencias importantes en la intensidad del reconocimiento, por lo que en este caso no podemos aseverar que el mismo no se deba a una reacción cruzada. Respecto del reconocimiento de este candidato, sin embargo, mostraremos algunas evidencias adicionales al referirnos a los resultados de los inmunoblots que realizamos con sueros de ratones inmunizados.



Los resultados obtenidos hasta este punto son importantes, porque revelan que los cuatro candidatos reconocidos específicamente generarían de por sí una respuesta inmune durante la infección natural de *B. pertussis* en humanos.

Ensayos con sueros de individuos vacunados

Con el objetivo de evaluar si alguno de los 48 candidatos vacunales elegidos en este trabajo, forma parte de la respuesta a la vacunación con vacuna de células completas, repetimos el esquema de inmunoblots pero utilizando en este caso sueros de individuos vacunados y sin evidencias de infección reciente.

Criterios de elección de sueros de individuos vacunados

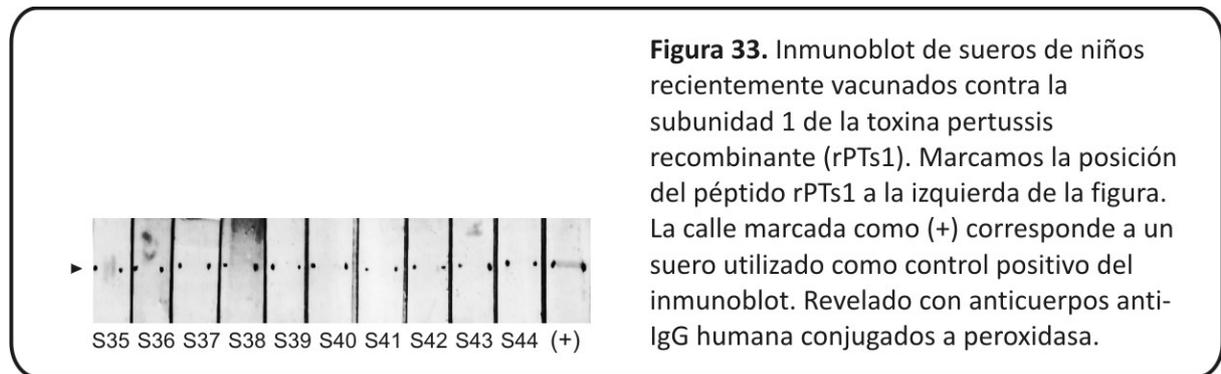
En este caso elegimos sueros de niños que habían recibido el primer o segundo refuerzo de vacuna DTP en un período de hasta dos años previo a la toma de la muestra. Tuvimos en cuenta, además que el título anti - *B. pertussis* medido por ELISA fuera de 1/640 o mayor, que presentaran poca o ninguna sintomatología, y que el resultado de diagnóstico por PCR fuera negativo. Agrupamos los diez sueros disponibles en dos grupos de 5 sueros cada uno a los que denominamos respectivamente Vac1 y Vac2. Las características de los diez sueros elegidos se encuentran en la Tabla 22.

Grupo	Nº suero	Edad	Vacunación (dosis)	Sintomatología	PCR Bp	Título anti Bp
Vac1	S35	2a 11m	4	no presentó	neg	1280
	S36	18m	4	no presentó	neg	1280
	S37	18m	4	no presentó	neg	1280
	S38	2a	4	no presentó	neg	1280
	S39	8a	5	no presentó	neg	640
Vac2	S40	18m	4	no presentó	neg	5120
	S41	1a	3	no presentó	neg	2560
	S42	1a9m	4	no presentó	neg	640
	S43	8a	5	no presentó	neg	640
	S44	2a	4	no presentó	neg	640

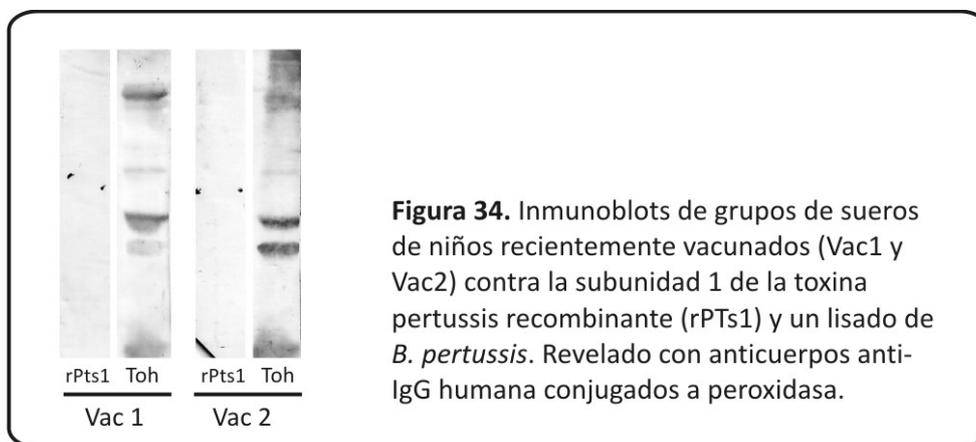
Tabla 22. Características de los sueros de niños recientemente vacunados empleados en este trabajo.

Si bien a partir del título de anticuerpos totales anti - *B. pertussis* puede ser difícil diferenciar entre un individuo vacunado con una vacuna de células completas y otro infectado, la situación es distinta cuando el suero se enfrenta a antígenos individuales. El título de anticuerpos contra los antígenos individuales de *B. pertussis* generado por la vacunación con células completas es relativamente bajo, pero aumenta significativamente luego de una infección por *B. pertussis* [256, 257]. Teniendo en cuenta en este criterio, enfrentamos los diez sueros de forma individual contra el péptido rPTs1, con la idea de

excluir aquellos sueros que al presentar una reacción significativa con rPTs1 corresponderían a individuos con una infección reciente. Mostramos los resultados de este ensayo en la Figura 33. Como puede observarse en la figura, ninguno de los sueros utilizados reconoció a esta proteína. Estos resultados indicaron que probablemente estos sueros se corresponden a individuos vacunados pero no infectados, por lo que continuamos nuestro trabajo con ellos ya que era lo que buscábamos.



En la Figura 34 se muestran los resultados obtenidos en los inmunoblots empleando como sueros los grupos Vac1 y Vac2. Como puede observarse, para ambos grupos de sueros los perfiles de reacción contra las proteínas totales de *B. pertussis* son similares, y ninguno de los dos reconoce en forma apreciable la toxina pertussis.



Procedimos luego a realizar los inmunoblots de los 47 candidatos vacunales con estos dos grupos de sueros, y los resultados se muestran en la Figura 35 A y 35 B. Como puede observarse en esta figura los sueros de individuos vacunados reconocieron 4 candidatos vacunales, los cuales a su vez habían sido reconocidos por los sueros de individuos convalecientes. Estos 4 candidatos son 24, 25, 57 y 60 (BP1277, BP1285, BP1428, y BP3495 respectivamente). El candidato 32 (BP3270) que había sido reconocido por 3 de los 5 grupos de sueros de pacientes convalecientes no fue reconocido por los grupos Vac1 y Vac2. Estos

resultados hasta aquí presentados serían compatibles con el perfil esperado para un candidato expresado solamente *in vivo*, que no formaría parte del conjunto de antígenos incluidos en la vacuna. Los experimentos realizados con sueros de ratones, que mostraremos a continuación, contribuyen a evaluar esta posibilidad.

En esta serie de inmunoblots no pudimos incluir un control negativo válido correspondiente a niños no vacunados, ya que los no vacunados mayoritariamente están representados por los niños menores de 2 meses y en ese grupo etario la respuesta inmune es en general muy baja. De hecho hemos realizado algunos ensayos de puesta a punto empleando estos sueros no observando ninguna reacción, por lo que decidimos no incluirlos en los ensayos.

Los resultados que obtuvimos, sin embargo, resultan válidos dado que el reconocimiento solo fue visualizado en un pequeño número de candidatos y que además resultaron coherentes con nuestros resultados anteriores.

Todos los resultados presentados indicarían que los candidatos reconocidos serían blanco de la respuesta inmune ante la vacunación, y serían además expresados por la bacteria en las condiciones de cultivo *in vitro* que se usan para la producción de la vacuna.

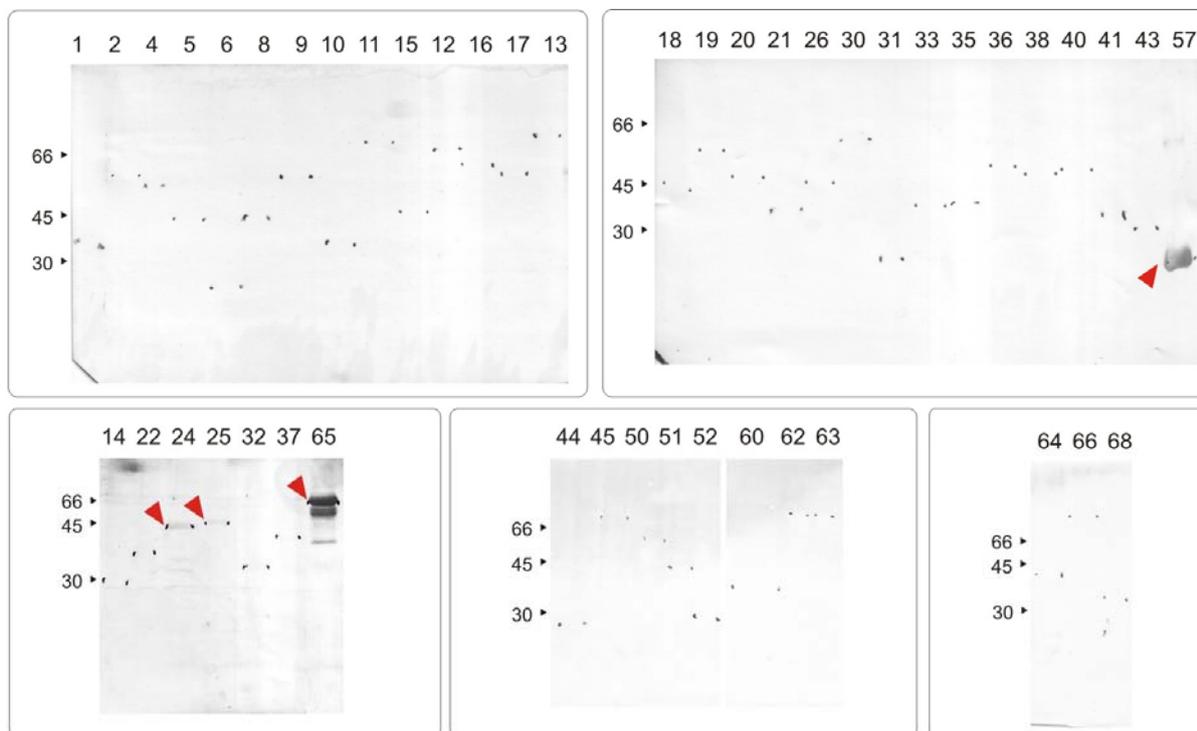


Figura 35 A. Inmunoblots enfrentando el grupo de sueros de niños vacunados Vac1 contra los 47 candidatos vacunales purificados. Los índices sobre cada calle refieren a la Tabla 14. Los ▲ marcan la posición de los candidatos vacunales reconocidos. A la izquierda de cada figura indicamos el peso molecular en kDa. Revelado con anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa.

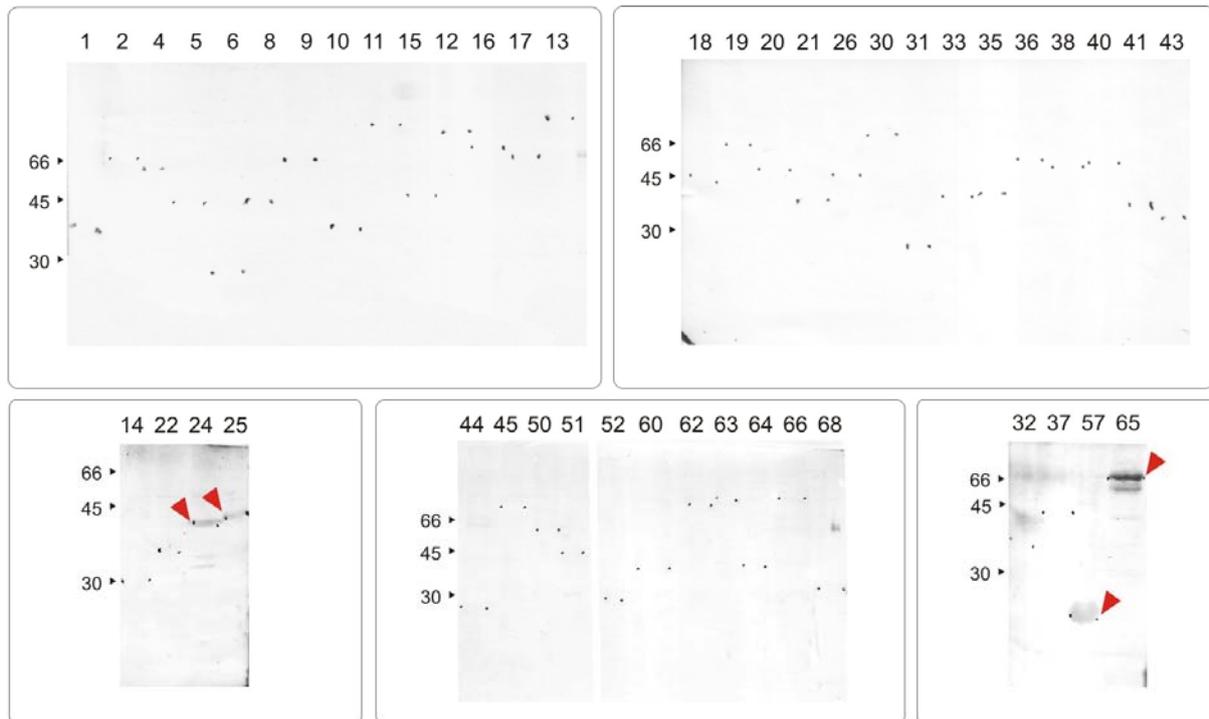
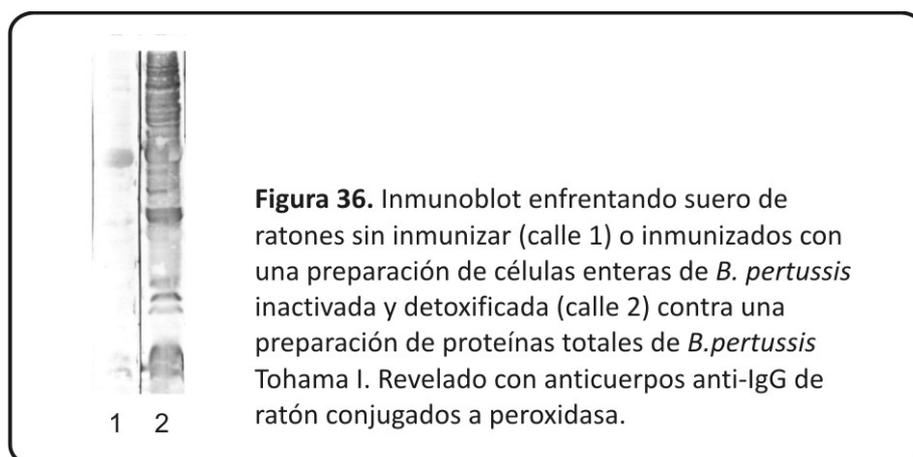


Figura 35 B. Immunoblots enfrentando el grupo de sueros de niños vacunados Vac2 contra los 47 candidatos vacunales purificados. Los índices sobre cada calle refieren a la Tabla 14. Los ▲ marcan la posición de los candidatos vacunales reconocidos. A la izquierda de cada figura indicamos el peso molecular en kDa. Revelado con anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa.

Ensayos con sueros de animales inmunizados

Immunoblots utilizando suero de ratones inmunizados con B. pertussis Tohama I

Como mencionamos en la sección “La vacunología reversa”, la inmunodetección de los candidatos vacunales con suero de animales inmunizados es el ensayo *in vitro* más comúnmente utilizado en otros trabajos que emplean esta estrategia. El uso de sueros murinos tiene la ventaja de que, al provenir de animales de bioterio libres de otros patógenos, permiten minimizar el nivel de reacciones cruzadas. El uso de sueros de ratones inmunizados con una preparación de células completas de *B. pertussis* nos permite tener una evaluación preliminar de la inmunogenicidad y la capacidad de provocar una respuesta humoral en ratones de los candidatos que resultaran reconocidos. Para obtener sueros anti-*B. pertussis* inmunizamos por vía intraperitoneal un grupo de ratones con una preparación de *B. pertussis* Tohama I muerta por calor y detoxificada con formol, siguiendo un esquema de dos dosis separadas por 14 días (ver detalles en el punto 16 de la sección Metodología). El suero obtenido 10 días posteriores a la última inmunización presentó un patrón de reconocimiento amplio al enfrentarlo a una preparación de proteínas totales de *B. pertussis* Tohama I, como puede observarse en la Figura 36.



En la Figura 37 se muestran los resultados obtenidos en la serie de ensayos en que enfrentamos los 47 candidatos vacunales con el suero de ratones inmunizados. Como puede observarse en la figura, el suero de los ratones inmunizados reaccionó con 9 de los 47 candidatos vacunales ensayados. En contraste con lo observado en el caso de los sueros humanos, vemos que el nivel de reacción es en general más intenso. Por otro lado, como era de esperarse, observamos un menor nivel de reacción con las proteínas contaminantes presentes en las preparaciones de los candidatos vacunales, dadas las condiciones de aislamiento y relativa esterilidad en que se mantienen los ratones en el bioterio. Resultaron notorias las diferencias en la intensidad del reconocimiento observado entre los distintos candidatos reconocidos. Mientras que los candidatos 37, 40 y 57 presentaron niveles de reconocimiento más intenso, el nivel de reacción con el candidato 32 fue mínimo y en algunas de las repeticiones que realizamos, casi imperceptible.

La especificidad del reconocimiento fue confirmada como en los casos anteriores, repitiendo los experimentos empleando un suero control, que en este caso fue el suero de ratones inoculados con solución salina. Mostramos los resultados de este experimento en la Figura 38. Como puede observarse en la figura, el suero de ratones no inmunizados no reconoció ninguno de los candidatos vacunales. En base a este reconocimiento específico podemos inferir que en principio los 9 candidatos serían inmunogénicos en ratones, en el contexto de una vacuna a células completas en la cual existe un gran número de proteínas presentes.

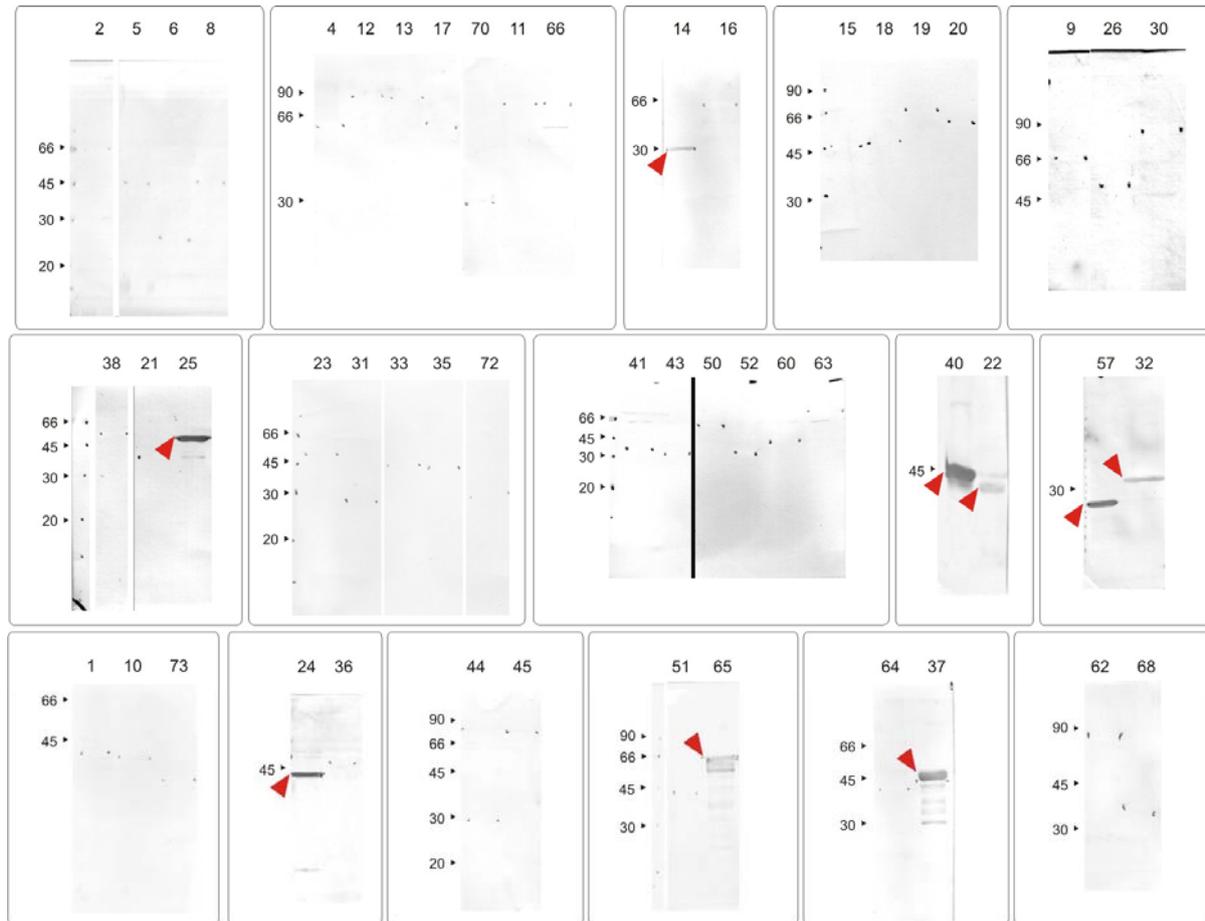
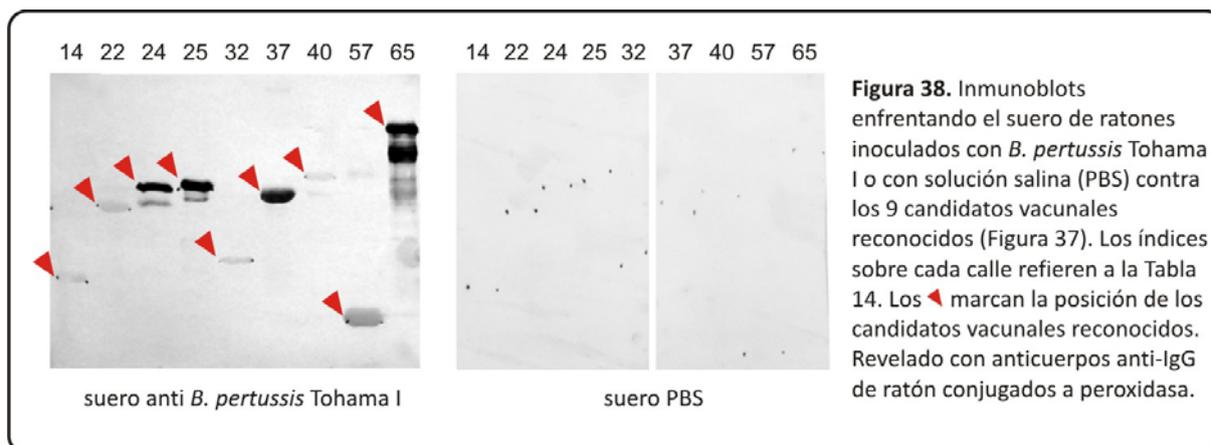


Figura 37. Inmunoblots enfrentando el suero de ratones inmunizados contra los 47 candidatos vacunales purificados. Los índices sobre cada calle refieren a la Tabla 14. Los  marcan la posición de los candidatos vacunales reconocidos. A la izquierda de cada figura indicamos el peso molecular en kDa. Revelado con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa.

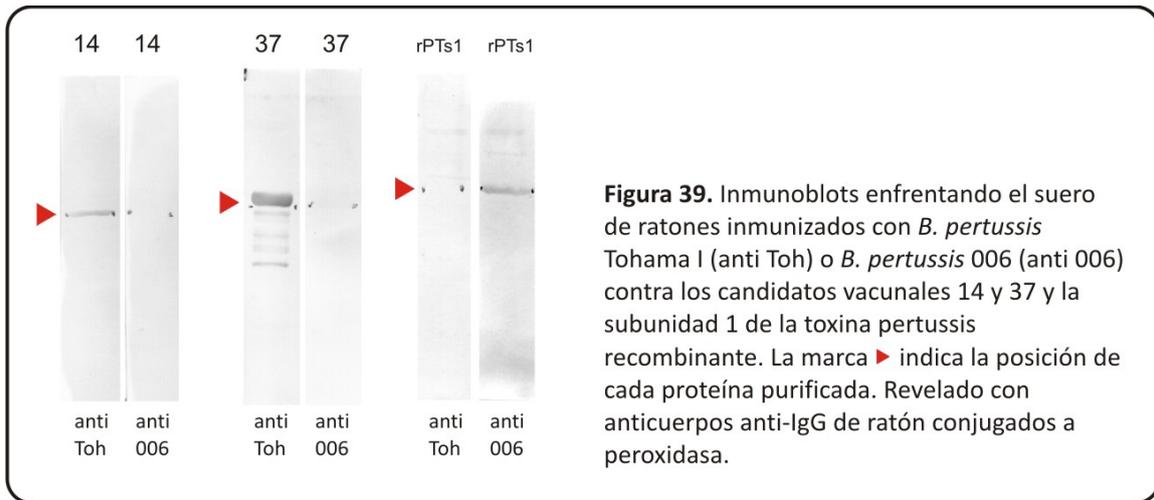
Entre los nueve candidatos reconocidos por los sueros de ratones inmunizados, encontramos asimismo los cuatro candidatos que habían sido reconocidos tanto por sueros humanos de pacientes convalecientes como por los grupos de sueros Vac1 y Vac2, correspondientes a individuos vacunados no infectados (candidatos 24, 25, 57 y 65). Esto indicaría que estos candidatos efectivamente se expresarían tanto *in vitro* como *in vivo* durante la infección natural, como sugerimos al interpretar los resultados encontrados con sueros de humanos vacunados y no infectados. Los sueros de ratones inmunizados reconocieron también al candidato 32 o BP3270, indicando que este candidato también sería expresado por *B. pertussis* Tohama I durante su crecimiento *in vitro*, aunque no fuera reconocido por los grupos de sueros Vac 1 y Vac2.



Inmunoblots utilizando suero de ratones inmunizados con un aislamiento reciente de B. pertussis

Hemos mencionado al comienzo de este trabajo, que una de las hipótesis sobre las causas de la resurgencia de pertussis refiere a la evasión de la inmunidad conferida por vacunas por parte de la población bacteriana circulante en la actualidad. Nuestro grupo de investigación ha hecho aportes que acuerdan con esta hipótesis. En particular se han realizado comparaciones genotípicas y fenotípicas entre cepas de *B. pertussis* aisladas en la etapa prevacunacional y cepas aisladas recientemente. En estos experimentos se encontró que, en ratones, la protección conferida por la vacunación con una cepa determinada es más efectiva ante el desafío con esta misma cepa que con otras [104]. Dado que la protección evaluada en este tipo de experimentos puede depender parcialmente de los anticuerpos presentes, nos pareció interesante comparar los perfiles de reconocimiento de nuestros candidatos con sueros de ratones inmunizados con la cepa de referencia Tohama I por un lado, y con una cepa aislada más recientemente por el otro.

Para esta serie de inmunoblots utilizamos como cepa de referencia la cepa secuenciada, Tohama I, y como aislamiento reciente la cepa denominada *B. pertussis* 006, aislada de un paciente pediátrico en el año 2000 en nuestro laboratorio [104]. Mediante la misma metodología que para la cepa Tohama I, obtuvimos el antisuero anti - *B. pertussis* 006 (anti Bp006). Este suero fue empleado luego para enfrentar a los 47 candidatos vacunales purificados. Los resultados obtenidos fueron coincidentes con los del suero anti - *B. pertussis* Tohama, excepto para 3 de las proteínas recombinantes ensayadas: los candidatos 14 y 37, y el péptido rPTs1. Los resultados encontrados para estas tres proteínas se muestran en la Figura 39. En los tres casos el reconocimiento diferencial es notorio, pero es particularmente llamativo por su intensidad en el caso del candidato 37. Aunque son aún preliminares, pensamos que estos ensayos aportan nuevas evidencias sobre las diferencias fenotípicas entre cepas de *B. pertussis*.



Características de los candidatos reconocidos

A continuación haremos un resumen de las características que pueden encontrarse en bases de datos de proteínas y en la bibliografía sobre los 9 candidatos vacunales identificados en la serie de experimentos mostrados en esta sección. La Tabla 23 resume – para los candidatos reconocidos únicamente- algunas de las características ya mencionadas antes al describir la selección *in silico* de los candidatos vacunales.

Los candidatos 14 (BP1364) y 22 (BP0558) están anotados en el genoma como proteínas periplásmicas cuya función sería la unión de amino ácidos. Uno de ellos, el candidato 14, presenta un dominio denominado PF00497 que permite clasificarlo dentro de la familia de proteínas unidoras de solutos extracelulares en la base de datos Pfam [258]. Este dominio cubre un 84% de su secuencia. Pertenece además a la familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette). Las proteínas de este tipo tienen una amplia distribución tanto en bacterias como en organismos eucariotas, y su estructura acopla un dominio de unión e hidrólisis de ATP con dominios integrados en la membrana celular, y están involucradas en el transporte de diversas sustancias. Se ha propuesto que los transportadores ABC podrían considerarse factores de virulencia bacteriana, dado que tienen funciones como la captación de distintos nutrientes y la eliminación del citoplasma bacteriano de sustancias tóxicas, lo que permitiría la adaptación a distintos nichos de crecimiento [259].

El candidato 22 presenta una homología de aproximadamente un 56% de identidad con el transportador AapJ (amino acid permease), presente en la bacteria *Rhizobium leguminosarum*. Se ha descrito que este transportador está involucrado en la entrada y salida de aminoácidos en *R. leguminosarum*, con un amplio rango de especificidad y una importante capacidad de transporte [260].

Indice	ORF	PM (kDa)	Producto	Dom. TM	Clasificación funcional de Riley	Localización psortB 2.0	Localización PA	Reconocido ratones inmunizados	Reconocido humanos vacunados	Reconocido humanos infectados
14	BP1364	31,3	putative ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein	0	Amino acids and amines	Periplasma	Periplasma	SI		
22	BP0558	39,1	amino acid-binding periplasmic protein	0	Amino acids and amines	Periplasma	Periplasma	SI		
24	BP1277	42,3	livJ leu/ile/val-binding protein precursor	0	Amino acids and amines	Periplasma	Periplasma	SI	SI	SI
25	BP1285	42,6	livJ leu/ile/val-binding protein precursor	0	Amino acids and amines	Periplasma	Periplasma	SI	SI	SI
32	BP3270	33,6	putative thiol:disulphide interchange protein (periplasmic)	1	Chaperones	Periplasma	Periplasma	SI		SI
37	BP0840	44	outer membrane porin protein precursor	1	Outer membrane constituents	Membrana externa	Membrana externa	SI		
40	BP1126	53,1	odhL 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, E3 component	1	TCA cycle	Citoplasma	Citoplasma	SI		
57	BP1428	23,9	putative outer membrane protein	0	Outer membrane constituents	Membrana externa	Membrana externa	SI	SI	SI
65	BP3495	60,4	cpn60, groEL, mopA, groL 60 kDa chaperonin	0	Chaperones	Citoplasma	Citoplasma	SI	SI	SI

Tabla 23. Características de los candidatos vacunales reconocidos por los distintos sueros utilizados en los ensayos de inmunoblot.

Los dos candidatos han sido identificados mediante análisis proteómicos de preparaciones de proteínas totales de la cepa Tohama I y de una cepa aislada en Turquía, denominada *B. pertussis* Saadet [261], confirmando su expresión *in vitro*. El candidato 22 o BP0558 ha sido identificado mediante la metodología de inmunoproteómica, un abordaje que resulta complementario del realizado en esta tesis en el cual se comprueba que el mismo es reconocido por el suero de niños vacunados con preparaciones de células completas de *B. pertussis* 58003, la cepa vacunal utilizada en China [262]. El rol como inmunógenos de esta familia de proteínas ha sido revisado en 2004 por Garmony y Titball [263], en donde se citan varios ejemplos de proteínas cuya antigenicidad ha sido comprobada en experimentos realizados con *Streptococcus agalactiae*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella ovis* [264-266].

Los candidatos 24 (BP1277) y 25 (BP1285) pertenecen a la familia de transportadores de aminoácidos de cadena ramificada, y son también de tipo ABC. Los representantes mejor

estudiados de este grupo son las proteína LivJ de *E. coli* y BraC de *Pseudomonas aeruginosa*. Son proteínas que en bacterias gram negativas se encuentran libres en el periplasma. La proteína LivJ tiene la propiedad de unir aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), a los que aloja en una hendidura entre dos dominios globulares. La forma libre de estos transportadores adopta una conformación “abierta”, que se cierra al unir los ligandos, mediante una zona flexible que actúa como bisagra [267]. La expresión *in vitro* de ambos candidatos ha sido confirmada a partir de su identificación por proteómica en el trabajo citado más arriba [261]. El candidato 25 o BP1285 ha sido identificado también en preparaciones de proteínas de superficie de *B. pertussis* Tohama I [107]. Por otro lado, Zhu y colaboradores reportan que este último candidato fue reconocido por sueros de niños vacunados con células completas de *B. pertussis* 58003, pero no por ratones inmunizados con esta misma cepa [262]. Dos trabajos recientes reportan homólogos de los candidatos 24 y 25 como factores importantes en la virulencia de *Streptococcus pneumoniae*. En uno de ellos, se encontró que mutantes de esta bacteria con una delección del operón *LivJHMGF* son menos infectivos que las cepas salvajes correspondientes [268]. En otro trabajo, mediante la metodología GAF (*Genomic Array Footprinting*) otro grupo de investigadores reportó al gen *livJ* como necesario para el adecuado crecimiento *in vivo* en conejos de *S. pneumoniae*, pero no para su normal crecimiento *in vitro*, en base a lo cual proponen que el producto de este gen estaría involucrado en la infección natural [269].

Los candidatos 32 y 65 pertenecen a la categoría de chaperonas, y representan las únicas dos proteínas de este tipo ensayadas entre nuestros 48 candidatos. El candidato 32 (BP3270) está anotado como una proteína periplásmica involucrada en la formación de puentes disulfuro necesarios para el correcto plegamiento de distintas proteínas. Los homólogos más cercanos a BP3270 son tioreductasas que participan en el plegamiento oxidativo de las proteínas en el periplasma. Uno de ellos, la proteína DsbC de *E. coli* es un dímero cuya función específica es la reducción (corte) de enlaces formados en posiciones incorrectas [270]. Otro homólogo de este candidato, la proteína NMA0730 de *N. meningitidis*, ha sido identificada como un posible factor de virulencia a partir del aumento de sus niveles de transcripción durante el crecimiento en contacto con células de línea humana [271]. BP3270 no ha sido identificada en ninguno de los abordajes proteómicos o inmunoproteómicos disponibles en la bibliografía, por lo que no disponemos de información sobre su traducción. A nivel transcripcional, se ha encontrado que la cantidad de mRNA del ORF BP3270 disminuye en cultivos de *B. pertussis* limitados en glutamato (fuente de carbono y energía) [153].

El candidato 65 (BP3495) pertenece a la familia de las proteínas de respuesta al shock térmico (HSP). Entre los homólogos de esta proteína encontramos la chaperonina GroEL de *E. coli*, la proteína más estudiada de esta familia. Se piensa que la actividad como chaperona

de GroEL depende de la formación de un tetradecámero en la que encierra una cavidad hidrofóbica, donde ciertas proteínas pueden plegarse correctamente, evitándose así su agregación. Homólogos de esta chaperonina han sido descritos como inmunogénicos en una variedad de patógenos, siendo este el motivo por el que incluimos esta proteína entre nuestros candidatos vacunales (para la que ambos programas predijeron una localización citoplasmática). En este sentido, en un estudio de 1993 se encontró que pacientes infectados por *N. meningitidis* desarrollaban anticuerpos contra la proteína MSP-63 de este patógeno, y que estos anticuerpos eran capaces de reconocer también las proteínas GroEL de *E. coli*, y el antígeno BCG-65K de *Mycobacterium bovis* [272]. Existen en la bibliografía reciente muchos ensayos publicados utilizando esta proteína como candidato vacunal, con resultados que varían en función del patógeno en cuestión. Entre ellos podemos citar por un lado un trabajo de 2008 en que, utilizando la misma tecnología que en nuestro caso, los autores reportan niveles muy altos de protección en un modelo murino de infección por *Salmonella enterica serovar Typhi* [273]. En cambio, trabajando con un modelo de infección de *S. pneumoniae* en ratones, y usando básicamente la misma técnica de obtención del candidato vacunal, otro grupo no encontró niveles significativos de protección [274]. Diversos abordajes proteómicos han identificado esta proteína en *B. pertussis*, confirmando su expresión *in vitro* [107, 261, 275, 276]. En concordancia con lo encontrado en nuestro trabajo, BP3495 ha sido identificada como una proteína inmunogénica en distintos trabajos en los que se realizaron abordajes inmunoproteómicos utilizando sueros de ratones inmunizados [261, 262, 277] o de niños recientemente vacunados [262], en ambos casos con preparaciones de células completas de *B. pertussis*. El producto del gen BP3495 ha sido identificada también como una de las proteínas mayoritarias, junto a BrkA, de una preparación que resultó protectora contra *B. pertussis* [278].

En cuanto a los constituyentes de membrana externa, sobre un total de 7 candidatos ensayados encontramos que dos de ellos fueron reconocidos por los sueros utilizados: los candidatos 37 y 57, o BP0840 y BP1428 respectivamente. El candidato 37 (BP0840) pertenece a la familia de proteínas de membrana externa denominadas OMP clásicas a partir de su estudio en enterobacterias (OmpF, OmpC y PhoE). El dominio PF00267, que permite asignarla a este grupo de proteínas, cubre el 89% de la secuencia de BP0840. El producto del gen BP0840, OmpP, es una de las dos porinas expresadas en mayor cantidad por *B. pertussis* (junto a la proteína OmpQ, codificada por el gen BP3405) [279]. Las OMP clásicas forman trímeros que actúan como poros selectivos en la membrana externa, permitiendo la entrada a la célula de pequeñas moléculas hidrofílicas como cationes y aniones. En contraste con los dominios integrales de membrana (de secuencia muy conservada), la zona expuesta en la superficie de la membrana externa de este grupo de porinas presenta una secuencia variable, y se sabe que puede interactuar directamente

con anticuerpos [280]. El producto del gen BP0840 ha sido identificado en estudios previos a la secuenciación de *B. pertussis* como una proteína presente en las fases virulenta y avirulenta de crecimiento [281], y se ha identificado por abordajes proteómicos tanto en preparaciones de proteínas totales [276], preparaciones de proteínas de superficie del patógeno [107], como también en vesículas de membrana externa (OMVs) [275]. Las OMVs de *B. pertussis* resultan protectivas tanto en ensayos de desafío intracraneal [282], como en el modelo de desafío intranasal [275]. En cuanto al reconocimiento por anticuerpos, BP0840 ha sido recientemente identificada como una de las proteínas reconocidas por sueros de niños vacunados en el trabajo citado más arriba [262]. Los resultados de este último trabajo resultan contradictorios -en lo que respecta a este candidato- con los encontrados en nuestro laboratorio, ya que en nuestro caso el candidato BP0840 fue reconocido por suero de ratones inmunizados y no por sueros de humanos convalecientes, y en el mencionado trabajo se reporta la situación inversa. Todas estas evidencias, de todas maneras, señalan a esta proteína podría ser un buen candidato vacunal.

La otra proteína de membrana externa reconocida por anticuerpos, el candidato 57 (o BP1428) incluye un dominio PF03938, que permite asignar el producto de este ORF a la familia de porinas OmpH. El representante más estudiado de esta familia de proteínas es la proteína Skp (por *seventenn kilodalton protein*) de *E. coli* [283]. El producto del ORF BP1428 tiene un peso molecular predicho de aproximadamente 21kDa, y la secuencia del dominio PF03938 cubre un 79% de su longitud total. La proteína Skp es una chaperonina que evita el agregado de proteínas de membrana externa en su paso por el periplasma, envolviendo las proteínas hidrofóbicas luego de que éstas sean secretadas a través de la membrana interna por el sistema dependiente de secuencia señal (o sistema sec-dependiente). Luego, mediante un mecanismo que involucra interacciones con el LPS, la proteína unida (aún en forma desnaturalizada) se libera en la membrana externa, donde adoptará su conformación nativa sin intervención de Skp [284]. Una proteína homóloga de Skp presente en un aislamiento clínico de *Burkholderia cepacea*, BCAL2082, ha sido seleccionada como candidato vacunal en base a estudios de transcriptómica donde se compara el crecimiento de esta cepa en condiciones que simulan el medio intrapulmonar en pacientes fibroquísticos con condiciones similares a la vida libre en el suelo [285]. Al igual que el candidato 32 (o BP3270), el producto del ORF BP1428 no ha sido identificado en ninguno de los abordajes proteómicos o inmunoproteómicos reportados en bibliografía, pero a partir de experimentos en que se han medido los cambios en sus niveles de transcripción se puede inferir que este ORF es transcripto [153].

Hemos dejado para el final al candidato 40 o BP1126, dado que fue seleccionado por un error involuntario. El ORF BP1126 tiene una localización predicha en el citoplasma bacteriano, y su función estaría relacionada al ciclo del ácido tricarbóxico. A pesar de esto,

este candidato fue reconocido por el suero de ratones inmunizados con preparaciones de proteínas totales tanto de la cepa Tohama I como de la cepa 006 en los ensayos de inmunoblot que realizamos. Por otro lado, el producto del ORF BP1126 fue identificado en preparaciones de proteínas de superficie de *B. pertussis* [107], lo que podría explicar el reconocimiento por sueros mencionado. Ante estos hallazgos, decidimos incluir este candidato en los posteriores ensayos de protección en ratones, habida cuenta de que esto no nos obligaría a incrementar el número de animales.

Resumen de resultados y discusión

La existencia de un correlato *in vitro* con la eficacia de las vacunas sin dudas facilitaría el trabajo de screening de los candidatos vacunales. Esta no es, sin embargo, una condición totalmente necesaria. Hemos visto que en el caso de inmunógenos como PT, Prn y Fim, los anticuerpos que en determinados niveles no confieren protección pasiva, sí lo hacen al encontrarse en niveles más altos. Un comportamiento similar se observa en infecciones como el sarampión [206, 286]. Así es que aun sin ser indicadores directos de la protección, los ensayos con sueros pueden brindar información que permitiría aumentar las probabilidades de identificar un candidato vacunal adecuado.

La estrategia empleada aquí referida al reconocimiento antígeno anticuerpo de los candidatos vacunales seleccionados, nos permitió seleccionar un número adecuado de candidatos con los cuales continuar las siguientes etapas de trabajo. Así del total de los 47 candidatos ensayados, 5 mostraron reactividad con sueros de individuos infectados y 4 de ellos con sueros de individuos vacunados. El suero de ratones inmunizados con células enteras de *B. pertussis* identificó 9 candidatos, incluyendo a los 5 anteriores.

Estos resultados nos permitieron además establecer algunas conclusiones respecto de los sueros utilizados. En particular pudimos comprobar que los sueros seleccionados en base a criterios como el título anti - *B. pertussis*, o bien en base a la sintomatología del paciente y su reacción frente a rPTs1, fueron los que por sus características reconocieron un mayor número de candidatos vacunales (Tabla 19). En cambio los sueros del grupo S₁₅, que fueron elegidos únicamente en base a tener un resultado de PCR positivo asociado, reconocieron únicamente 2 de estos 5 candidatos. Otro aspecto que observamos fue que la intensidad del reconocimiento de las proteínas contaminantes fue mayor en el caso de los sueros de humanos adultos (en particular para los grupos de sueros S₃ y S₅) que en los sueros de niños (Vac1 y Vac2).

Por otra parte los ensayos con sueros murinos permitieron observar reconocimientos más específicos con un nivel más bajo de reacciones cruzadas con las proteínas presentes como impurezas en las preparaciones de candidatos purificados. El suero de ratones

inmunizados reconoció nueve candidatos vacunales, con lo cual su inclusión fue un complemento significativo de la estrategia planteada centralmente en torno de sueros de pacientes infectados.

La relativa homogeneidad de los reconocimientos antígeno anticuerpo observados con los distintos sueros, en el sentido de que los resultados de los distintos grupos de sueros utilizados “convergen”, nos lleva a validar la selección realizada.

En algunos casos incluso el empleo de sueros pareados con seroconversión nos permitió resolver algunos problemas de especificidad como los presentados para los candidatos 57 y 65, para los que las segundas muestras mostraron un aumento en el nivel de reacción contra los mencionados candidatos. Sin embargo esta estrategia no pudo resolver el reconocimiento inespecífico para el candidato 25 que también era reconocido por uno de los grupos de sueros control. De cualquier manera debemos mencionar que el patrón de reconocimiento por los distintos grupos de sueros humanos observado para el candidato 25 parece más azaroso que el encontrado para los demás candidatos reconocidos. Este candidato fue reconocido por 3 de los 5 grupos de sueros de pacientes convalecientes y por uno de los dos grupos de sueros control, ver Tabla 20. En los ensayos con sueros de ratones inmunizados, sin embargo, el reconocimiento de este candidato resultó específico, ya que no reaccionó con el suero de ratones no inmunizados. Esto podría indicar que este candidato sería realmente un blanco de la respuesta anti - *B. pertussis*, al menos en ratones.

Esta descripción ejemplifica la capacidad ampliada que se logra al emplear varios sueros incluso de distinto origen.

Un aspecto que observamos fue que los candidatos reconocidos específicamente por sueros de humanos convalecientes fueron, en su mayoría, también reconocidos por sueros de individuos vacunados, y por los sueros de ratones inmunizados. Estos resultados indicarían que los candidatos se estarían expresando tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. De hecho, 7 de los 9 candidatos reconocidos fueron identificados en muestras de proteínas totales preparadas a partir de cultivos *in vitro* de distintas cepas de *B. pertussis* [107, 261, 275, 276], confirmando esta idea.

La ausencia en la detección de candidatos que se expresaran únicamente en condiciones *in vivo* estaría en línea con el actual conocimiento sobre el sistema inmune. Según el concepto de impronta inmunológica [141], la respuesta inmune ante una infección, en individuos previamente vacunados, estará fuertemente sesgada hacia los determinantes antigénicos conocidos a través de la vacunación, en detrimento de los determinantes antigénicos no conocidos. Esto es lo que se ha encontrado también al analizar el perfil de respuesta serológica luego de una infección por *B. pertussis* en niños vacunados y no vacunados. En estas investigaciones se observó que ante una infección los niños vacunados montaron una respuesta humoral dirigida fundamentalmente contra los antígenos incluidos

en las inmunizaciones previas que habían recibido [257]. Desde este punto de vista, sería interesante contar con sueros de individuos infectados sin vacunación previa para enfrentar a nuestro conjunto de candidatos vacunales. En la era vacunal serían mayormente los niños más pequeños quienes cumplirían con este criterio, pero lamentablemente en ellos el título de anticuerpos es en general muy bajo. Volveremos sobre estos aspectos cuando exponamos las conclusiones generales de nuestro trabajo.

“Estado de situación” de la estrategia

La estrategia de selección *in vitro* planteada hasta aquí permitiría en principio aumentar la probabilidad de identificar candidatos vacunales cuando luego sean ensayados en el modelo de protección. Sin embargo es importante remarcar que esto no permite descartar con un 100 por ciento de certeza a los candidatos no reconocidos por los sueros. El no reconocimiento puede deberse a que las proteínas recombinantes serían un acercamiento a las proteínas naturales, en el sentido que retienen algunas de sus propiedades pero probablemente no todas ellas. Por otro lado, en el esquema de experimentos presentado hemos empleado condiciones desnaturalizantes de purificación y posterior electroforesis y transferencia de los candidatos vacunales. Por lo tanto, en la estrategia de selección elegida, el reconocimiento de los candidatos por los distintos sueros utilizados dependerá -muy probablemente- de la presencia en sus secuencias peptídicas de epítopos lineales. Por este motivo no podemos descartar que algunos de los candidatos no reconocidos por los sueros utilizados estén involucrados en la respuesta a la infección o la inmunización con *B. pertussis*.

En la próxima sección describiremos los ensayos realizados para probar el poder protector de los nueve candidatos identificados mediante los ensayos *in vitro*. Se incluirá, por lo antes dicho, también a los candidatos no reconocidos. Estos ensayos comparativos nos permitirán además valorar la estrategia de screening seguida.

Selección *in vivo* de los candidatos vacunales

Como hemos descrito en las secciones anteriores hemos logrado expresar y purificar 47 candidatos vacunales. Los ensayos *in vitro* a los que nos hemos referido nos permitieron identificar un total de 9 candidatos reconocidos por sueros de pacientes convalecientes, por sueros de individuos vacunados y/o por sueros de ratones inmunizados con células completas de *B. pertussis*. En esta sección abordaremos el uso de modelos animales de protección que permitan indagar sobre el poder protector de los candidatos vacunales con los que venimos trabajando, incluyendo aquellos reconocidos por sueros pero sin descartar, en la medida de nuestras posibilidades, el resto de los candidatos.

A continuación haremos una breve descripción del modelo de protección con desafío intranasal aceptado para *B. pertussis*, para luego describir y discutir los ensayos *in vivo* que realizamos.

Modelo de protección en ratones

A pesar de que la infección natural por *B. pertussis* ocurre únicamente en humanos, existen distintos modelos animales en que esta infección puede estudiarse, entre ellos la rata, el ratón, el cerdo y el conejo [287]. Cada uno de estos modelos logra reproducir algunos aspectos de la infección humana mejor que otros. En el caso de los ratones, por ejemplo, se observan la linfocitosis e hipoglucemia características de la enfermedad, aunque

en este modelo la tos no es parte de la sintomatología, como sí ocurre en el modelo de infección en ratas [287]. La existencia y uso de distintos modelos animales deviene de qué aspecto se pretende reproducir de la infección natural. Esto es lógico cuando a partir del modelo animal queremos inferir, por analogía, características de la enfermedad humana. Sin embargo, desde el punto de vista de la vacunología reversa, la utilidad de los modelos animales radica centralmente en establecer un correlato del poder protector, más que en emular la infección en humanos [118].

En el caso de pertussis, el primer modelo animal estandarizado con este fin fue introducido por Pearl Kendrick y Grace Elderling en 1946, y consiste en un desafío letal en ratones mediante la inoculación por vía intracraneal del patógeno [24]. La bacteria tiene la capacidad de reproducirse en este ambiente, y en pocos días la infección provoca la muerte de los ratones no inmunizados. En este modelo durante los días posteriores al desafío se registra la cinética de muerte de los distintos grupos de ratones correspondientes a los distintos tratamientos que se evalúan. Este esquema experimental que fue utilizado como método de referencia para estandarizar la potencia de las vacunas de células completas, continúa usándose hoy en día para la validación de los lotes de vacuna celular producida, y también es utilizado en trabajos de investigación [288, 289].

Este modelo con desafío intracraneal no fue tan útil para la validación de las vacunas acelulares desarrolladas en los años 1980 y 1990. A raíz de esta situación, distintos grupos de investigación [290, 291] volvieron sobre los modelos de desafío intranasal con dosis subletales explorados –como el test de Kendrick- en los años 1940 y 1950 [292]. En estos modelos de desafío intranasal, en lugar de analizar la cinética de muerte, se evalúa el número de bacterias (unidades formadoras de colonias, UFC) que se encuentran colonizando el tracto respiratorio del animal luego del desafío. Se ha demostrado que la protección en términos de reducción de UFC determinada en este modelo correlaciona de forma adecuada con la eficacia de las vacunas tanto celulares como acelulares [146, 291, 293]. Así, los ratones inmunizados resuelven la infección en un plazo de entre 3 y 10 días, mientras que los ratones no inmunizados lo hacen en un plazo de entre 30 y 40 días.

En base a la experiencia de nuestro grupo de investigación, utilizamos el modelo de desafío intranasal en ratones, que a la vez resulta conveniente para evaluar inmunógenos individuales, análogos a las proteínas incluidas en las formulaciones acelulares.

Evaluación de la capacidad protectora de los candidatos seleccionados

La evaluación de la capacidad protectora de los candidatos vacunales identificados nos enfrentó con la necesidad de definir condiciones experimentales y combinaciones de ellas de entre un rango muy amplio de posibilidades. Estas condiciones están referidas a la dosis de

inmunógenos a utilizar, la vía de inmunización, la inclusión de adyuvantes de distinto tipo, la forma de presentación de los inmunógenos (conformación nativa o desnaturalizada), el tiempo luego del desafío en que se miden los niveles de protección y la utilización de inmunógenos individuales o combinaciones de ellos, entre otras. Por otro lado, en nuestro caso contamos en principio con un grupo de 47 proteínas a ensayar, entre las cuales pensamos que tienen más probabilidad de resultar protectoras las 9 reconocidas por sueros. En este escenario se nos plantea la disyuntiva entre optimizar en primer lugar las condiciones del ensayo de protección con unas pocas proteínas para luego avanzar con el resto, o bien probar un conjunto más grande de proteínas en algunas condiciones particulares. Como veremos, en nuestro trabajo intentamos en un primer momento esta última alternativa y volvimos más tarde sobre las condiciones del ensayo.

En líneas generales, nuestra intención al momento de establecer las condiciones del ensayo fue utilizar un esquema en el cual pudiéramos verificar aún niveles relativamente débiles de protección. Por este motivo, elegimos una vía de inmunización sistémica con un adyuvante potente (adyuvante de Freund), y una cantidad de cada candidato vacunal similar a la empleada para el mismo fin por otros investigadores para otros inmunógenos (ver citas más adelante).

Al momento de elegir qué candidatos incluir en los ensayos de protección, tomamos en cuenta en primer lugar aquellos que fueron reconocidos por los sueros empleados. Sin embargo, no nos limitamos a ensayar únicamente estos candidatos. Esta decisión responde a que hemos trabajado en la estandarización de las condiciones de los ensayos con sueros con el objetivo de delinear, a partir de esa herramienta, un esquema de selección *in vitro* adecuado para el trabajo con cantidades grandes de candidatos vacunales. Pero pensamos que de cualquier manera sería interesante, en la medida de lo posible, ensayar la mayor cantidad de candidatos vacunales en el modelo de protección *in vivo*, habida cuenta de que los ensayos *in vitro* que realizamos no nos permiten descartar los candidatos no seleccionados. Por este motivo incluimos, además de los 9 candidatos seleccionados en base al reconocimiento con sueros, otros 10 candidatos vacunales según detallamos más abajo.

Para la preparación de los candidatos vacunales, obtuvimos y purificamos las proteínas recombinantes según los protocolos incluidos en la sección "Obtención de los candidatos vacunales". Con el objetivo de minimizar el número de ratones necesarios, preparamos las formulaciones vacunales a ensayar a partir de grupos de hasta 5 candidatos. Los grupos de los candidatos seleccionados e incluidos en las formulaciones se designaron A, B, C, D y E (Tabla 23). Como puede observarse en la tabla, los candidatos de los grupos A, B y C se corresponden a los seleccionados en base al reconocimiento *in vitro* por los sueros.

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
24 (BP1277)	14 (BP1364)	22 (BP0558)	2 (BP1989)	10 (BP3831)
40 (BP1126)	25 (BP1285)	32 (BP3270)	5 (BP2661)	11 (BP0736)
65 (BP3495)	57 (BP1428)	37 (BP0840)	15 (BP2090)	12 (BP0857)
			17 (BP3052)	18 (BP3196)
			21 (BP0057)	20 (BP3812)

Tabla 24. Grupos de candidatos vacunales de *B. pertussis* utilizados en los ensayos de protección en ratones.

A continuación describimos el esquema experimental utilizado en forma muy breve, los detalles pueden encontrarse en el punto 17 de la sección Metodología.

Nuestro esquema de trabajo incluyó 2 inmunizaciones por vía intraperitoneal a los días 0 y 14 del ensayo, un desafío intranasal con suspensión de *B. pertussis* al día 28 y el sacrificio y recuento de colonias al día 35 (Figura 40). Las formulaciones vacunales que se utilizaron para inmunizar a los grupos de 5 ratones, contuvieron adyuvante de Freund. Si bien este adyuvante no puede utilizarse en humanos, es considerado un potente inductor de la respuesta inmune, y es a la vez uno de los más ampliamente utilizados en ensayos animales. Como control incluimos por un lado un grupo de ratones inmunizados con una vacuna acelular comercial (control positivo de protección), y por el otro un grupo de ratones tratados con solución salina (control negativo sin inmunizar).

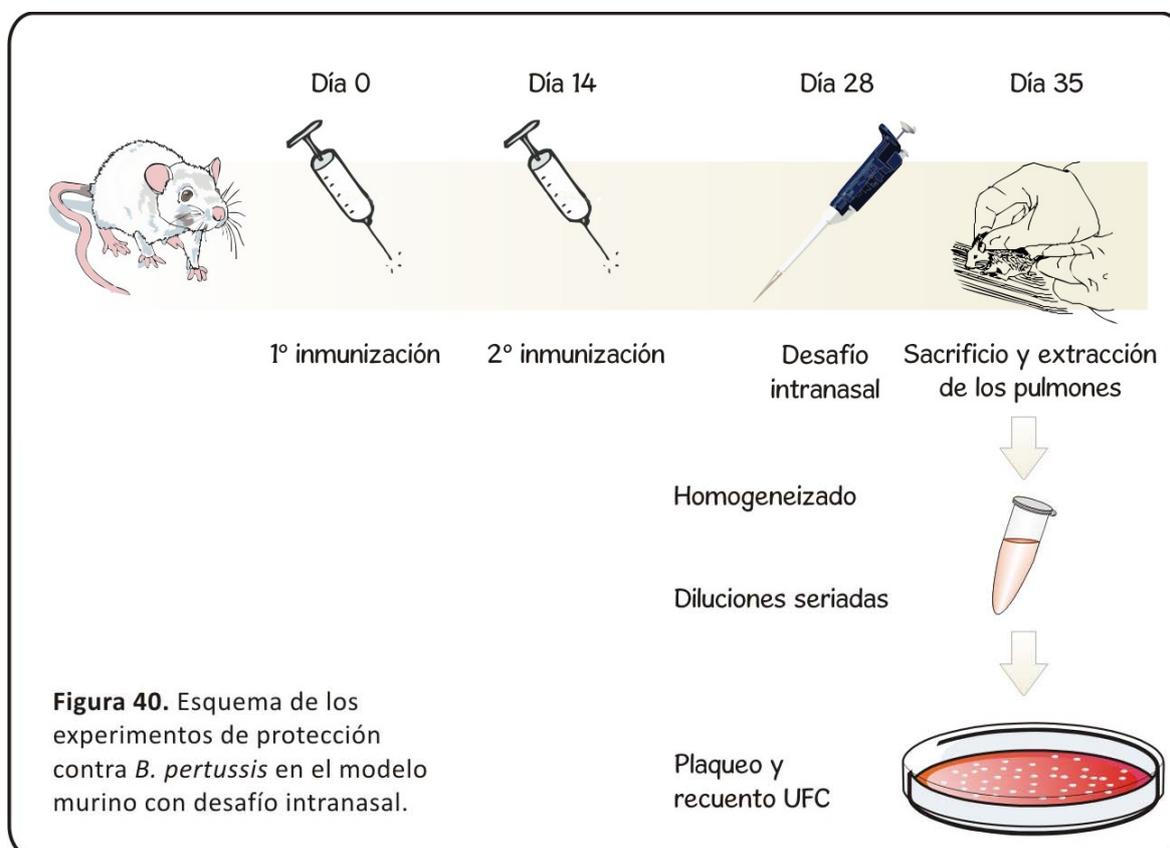


Figura 40. Esquema de los experimentos de protección contra *B. pertussis* en el modelo murino con desafío intranasal.

Al momento de establecer la dosis de nuestros candidatos vacunales a incluir en las formulaciones tomamos como referencia otros trabajos en que se siguen esquemas similares de inmunización sistémica con proteínas individuales. Entre estos trabajos podemos citar que se ha observado protección empleando las siguientes cantidades de proteínas purificadas a partir de cultivos de *B. pertussis*: 8 µg de la toxina pertussis [294], 10µg de fimbrias [295], o 12,5 µg de FHA [296]. Más recientemente, otros investigadores reportan que la proteína pertactina de origen recombinante obtenida en un sistema similar al que nosotros utilizamos también resulta protectora en cantidades de 4 o 20µg por ratón y por dosis [297]. La cantidad de cada candidato vacunal por ratón y por dosis que usamos fue de 20 µg, en línea con los citados experimentos.

En la Figura 41 se muestran los resultados de los experimentos realizados siguiendo el esquema descrito en la Figura 40. Como puede observarse, los resultados obtenidos con los controles fueron los esperados. Al día 7 post desafío, de los ratones no inmunizados se recuperaron entre 10^4 y 10^5 UFC de los pulmones, mientras que de los ratones inmunizados con la vacuna acelular no se contabilizó ninguna UFC (ver el punto 17 de la sección Metodología para una explicación del valor usado como límite de detección). En lo que se refiere a los candidatos vacunales ensayados, lamentablemente observamos que en este esquema experimental ninguno de los candidatos ensayados tenía capacidad protectora. Esto es, los valores de UFC de todos grupos de candidatos no difirieron significativamente de los correspondientes a los grupos control sin inmunizar (Figura 41).

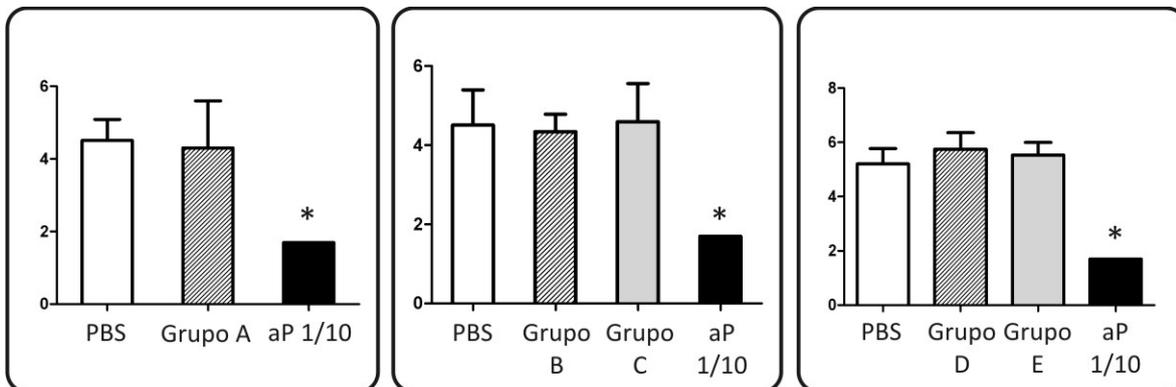


Figura 41. Evaluación de la capacidad protectora de distintos candidatos de *B. pertussis* empleando el modelo de desafío intranasal en ratones. PBS: ratones tratados con solución salina; Grupo A: ratones inmunizados con los candidatos 24, 40 y 65; Grupo B: ratones inmunizados con los candidatos 14, 25 y 57; Grupo C: ratones inmunizados con los candidatos 22, 32 y 37; Grupo D: ratones inmunizados con los candidatos 2, 5, 15, 17 y 21; Grupo E: ratones inmunizados con los candidatos 10, 11, 12, 18, y 20; aP 1/10: ratones inmunizados con 1/10 de la dosis humana de vacuna acelular. Los valores representan el promedio de UFC en pulmón y las barras de error corresponden a una desviación estándar. Los recuentos marcados con * mostraron una diferencia significativa con el resto de los grupos ($p < 0,05$). Cuando no contabilizamos UFC en el plaqueo directo tomamos como límite de detección el valor $\log_{10}(50)=1,699$.

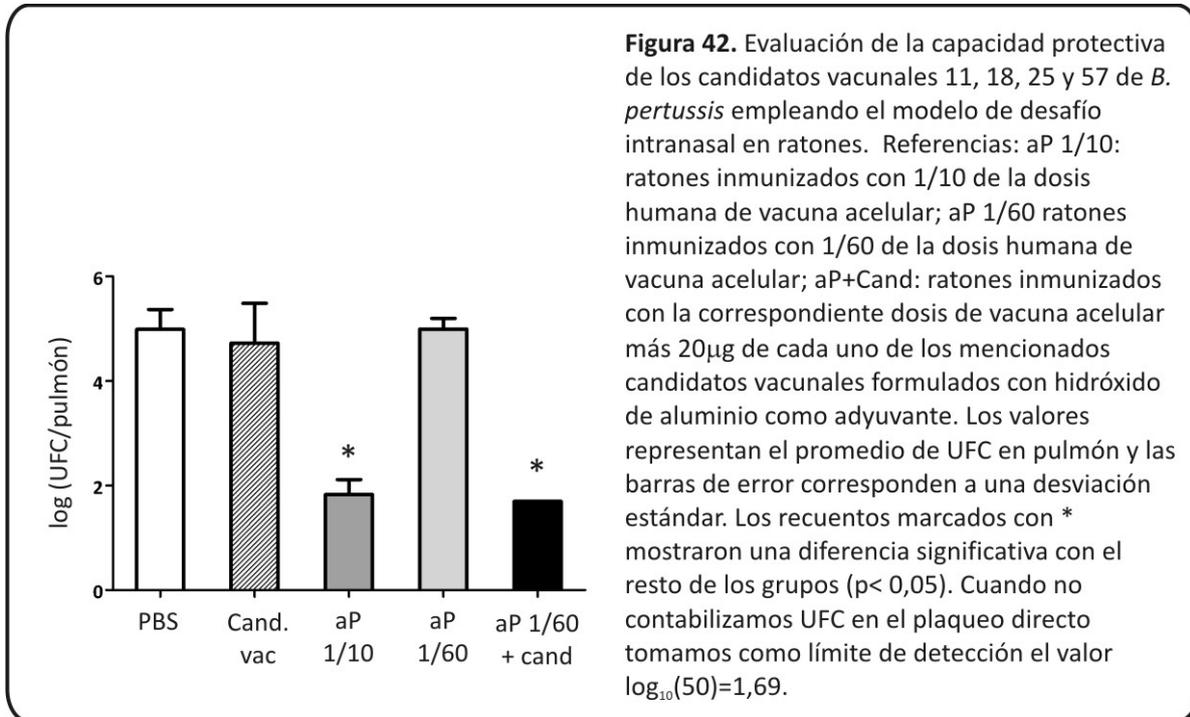
En esta serie de experimentos encontramos que los 9 candidatos que habían sido reconocidos por sueros y los 10 candidatos no reconocidos no fueron capaces de conferir niveles significativos de protección. Aunque discutiremos este punto más exhaustivamente en las conclusiones generales de la Tesis, es importante mencionar aquí que esto puede deberse a que los candidatos no resulten en absoluto protectores, o bien a que las condiciones empleadas no nos permitan medir el nivel de protección que estos candidatos indujeran. En cuanto a ésta última posibilidad, podemos pensar que los candidatos vacunales objeto de nuestra búsqueda probablemente sean -como término medio- inmunógenos más débiles que los antígenos ya conocidos de *B. pertussis* utilizados en los ensayos de protección que tomamos como referencia y citamos algunas páginas más arriba. Es por esto que, independientemente de reconsiderar algunos de los pasos seguidos en la selección de los candidatos vacunales realizada hasta aquí, decidimos modificar las condiciones de los ensayos de protección con la idea de aumentar su sensibilidad.

En este punto pensamos que nuestros candidatos, aún cuando no hubieran conferido protección por sí mismos, tal vez serían adecuados para complementar la protección inducida por formulaciones acelulares que indujeran protección incompleta (vacuna acelular en baja dosis). Con este objetivo trabajamos en el establecimiento de un escenario de protección incompleta, en el cual ensayar nuestros candidatos vacunales. Aunque debemos indicar que los resultados encontrados tienen un carácter provisional, los hemos incluido porque su consideración puede enriquecer la discusión de la estrategia en su conjunto.

En cuanto a los antecedentes bibliográficos, un esquema de este tipo puede encontrarse en un trabajo del año 2008 en el que se utiliza la proteína BrkA, uno de los factores de virulencia de *B. pertussis* [298]. En el citado trabajo se comprueba que esta proteína, aunque no confiere protección en ratones cuando es utilizada como único inmunógeno, tiene la propiedad de aumentar la protección de una vacuna acelular de dos componentes [298].

Dada la dificultad de conseguir una vacuna acelular con dos componentes, en nuestro caso probamos a la vacuna acelular de más componentes pero en dosis reducidas. En una cantidad de 1/10 de la dosis humana por ratón, esta vacuna resultó completamente protectora en los ensayos que mostramos en la Figura 41. En ensayos de puesta a punto determinamos que la dilución 1/60 de la dosis humana sería adecuada para nuestro objetivo, en tanto confería un nivel de protección menor que la dosis 1/10. Elegimos para estos ensayos una dosis de vacuna acelular de 1/60, a la que le adicionamos un grupo de 4 candidatos incluyendo dos candidatos fuertemente reconocidos por sueros (25 y 57) y dos no reconocidos por sueros (11 y 18). Los resultados de este experimento de protección pueden verse en la Figura 42. El grupo de ratones inmunizado con los candidatos vacunales complementados con la vacuna acelular 1/60 resultó protegido en mayor proporción que los

ratones inmunizados con 1/60 de la dosis de vacuna acelular únicamente. Como en el caso anterior, encontramos en los ratones del grupo inmunizado con una dilución 1/60 de la vacuna acelular un número de UFC de alrededor de 10^5 , mientras que en el grupo inmunizado con la vacuna 1/60 complementada con el grupo de candidatos vacunales no contabilizamos UFC.



Estos resultados resultan alentadores, ya que nos permiten delinear las condiciones experimentales en las que evaluar el poder protector de los candidatos vacunales. Como perspectiva de este trabajo nos hemos planteado determinar más específicamente las condiciones a utilizar, de forma de evaluar en grupos más pequeños la totalidad de los candidatos hasta ahora obtenidos, manteniendo la prioridad en aquellos candidatos que fueron reconocidos por sueros.

Discusión

Vamos a referirnos en este apartado a algunos de los resultados descritos en esta sección, dejando la discusión -más general- que hace al rendimiento de la estrategia en su conjunto para el Capítulo tercero.

En la serie de experimentos en ratones que realizamos comenzamos por un esquema clásico de inmunización sistémica con adyuvante de Freund, en el que no pudimos comprobar que ninguno de los 19 candidatos ensayados resultara protector. Luego de algunas modificaciones tendientes a establecer una protección debilitada o incompleta, logramos observar cierto nivel de protección mediante la inmunización con un grupo de

candidatos vacunales. Aunque como ya mencionamos estos resultados son de algún modo preliminares, nos pareció interesante incluirlos porque pensamos que dan una idea más acabada de la complejidad encontrada en nuestro trabajo.

Revisando la evidencia encontrada respecto de los candidatos que serían protectores, encontramos en primer lugar que los cuatro candidatos presentes en los grupos B (25 y 57) y E (11 y 18) de la Tabla 24 no confirieron protección en el esquema inicial de inmunización con adyuvante de Freund. Desde este punto de vista, el o los candidatos protectores no tendrían un poder inmunogénico tan importante como los antígenos ya conocidos de *B. pertussis*, que como mencionamos más arriba confieren niveles de protección significativos en ese esquema. Esto es por otro lado razonable, en tanto a lo largo de muchos años se ha trabajado en los antígenos de este patógeno y es muy probable que sus principales inmunógenos hayan sido identificados, al menos en lo que hace a las proteínas presentes en el cultivo *in vitro* de la bacteria.

En este sentido debemos remarcar la importancia de desarrollar sistemas experimentales que nos permitan identificar inmunógenos cuyo poder protector no sea tan evidente, tanto en el caso de pertussis como en el de otros desarrollos de vacunas.

Un segundo aspecto experimental al que nos interesa referirnos es la conformación en la que presentamos los candidatos vacunales. Las proteínas recombinantes son desde un comienzo, como hemos mencionado ya, una herramienta para investigar el poder protector de sus análogos naturales expresados por *B. pertussis*. Pero más allá de las limitaciones inherentes a la metodología que hemos abordado (como por ejemplo podrían ser la ausencia de modificaciones postraduccionales) hay aspectos conformacionales que sí podrían tenerse en cuenta.

Tanto en los ensayos de western blot como en los de protección (al preparar los candidatos usados en las inmunizaciones), usamos condiciones desnaturizantes en la purificación. Las diferencias estructurales entre la forma natural de los candidatos vacunales (presentada durante la infección en ratones) y la forma desnaturizada (con la que estos ratones fueron inmunizados) podría ser una de las causas que contribuyen a la ausencia de protección. De hecho, en el caso de la toxina pertussis y la adhesina pertactina se ha observado que algunos epitopes conformacionales son importantes en la protección [98, 208].

Como mencionamos en la sección “Obtención de los candidatos vacunales”, este problema de alguna manera excede la vacunología reversa, porque el trabajo con proteínas de las cuales en general se tiene poca información complica el establecimiento de criterios para mantener su conformación nativa o funcional. La relativa simplicidad de la obtención de los candidatos en condiciones desnaturizantes hace posible, además, trabajar en simultáneo con un mayor número de proteínas.

Desde el punto de vista experimental, las alternativas para purificar proteínas recombinantes en su conformación nativa tienen un rendimiento bastante más bajo que los protocolos que incluyen agentes desnaturizantes. Por otro lado, a esto hay que sumarle que muchas de las proteínas con las que hemos trabajado se mostraron insolubles en solución salina sin agentes desnaturizantes. La falta de solubilidad complica la adopción de un esquema de purificación mixto (realizando la unión a la columna en condiciones desnaturizantes, y los posteriores lavados y elución sin agentes desnaturizantes) porque los candidatos podrían precipitar en la columna de purificación durante el procedimiento.

De todas formas, aun teniendo en cuenta estas consideraciones, y a la luz de los resultados que hemos obtenido, este aspecto de nuestro trabajo merece también reevaluarse en función de mejorar las probabilidades de encontrar candidatos vacunales en etapas futuras.

En el próximo y último capítulo haremos en primer lugar una discusión general de la estrategia que hemos seguido, y a continuación dejaremos planteadas algunas cuestiones que hacen a las alternativas posibles en el desarrollo de nuevas vacunas.

3

Capítulo tercero

Conclusiones generales

Algunas conclusiones en base a nuestra experiencia de trabajo

Como hemos descripto al comienzo del trabajo, pertussis se trata de una patología cuya incidencia se redujo marcadamente con la aplicación masiva de las vacunas desde los años 1940 [26]. Sin embargo esta reducción no ocurrió en la misma medida en que lo hicieron otras enfermedades inmunoprevenibles como tétanos y difteria [51]. Al número relativamente alto de casos de pertussis se suma la aparición de brotes epidémicos y la reemergencia registrada en los últimos años en distintos países [50].

Para el control de esta enfermedad, tempranamente se desarrollaron formulaciones vacunales diseñadas a partir de células inactivadas de su agente causal, *B. pertussis*. A pesar de su relativa efectividad, estas formulaciones han sido cuestionadas en relación a su bioseguridad, lo cual motivó el desarrollo de vacunas acelulares que incluyeron de 3 a 5 antígenos purificados de *B. pertussis*. Aunque resultan efectivas, la inmunidad conferida por las formulaciones acelulares no es tan duradera como la de la infección natural o incluso la que inducen las vacunas de células enteras.

Por otro lado, a partir de la caracterización de la población bacteriana circulante y de la presencia en ésta de variantes alélicas de algunos antígenos respecto de las cepas vacunales, se propuso que la resurgencia de la enfermedad podría estar asociada con la evasión de la respuesta inmune generada por la vacunación [99].

Todo este marco sirve de sustento para formular la hipótesis de que la disponibilidad de nuevos inmunógenos mejoraría a estas vacunas y consecuentemente la situación epidemiológica de la enfermedad en el mediano plazo. Así, en este trabajo de tesis aplicamos la estrategia llamada vacunología reversa al caso de *B. pertussis* con el objetivo de identificar nuevos inmunógenos.

El primer paso de esta estrategia consiste en la selección de candidatos vacunales *in silico*. Para ello en nuestro caso, integramos la información asociada a la secuencia del genoma del patógeno con la predicción de la localización subcelular de la totalidad de los ORFs en el contenido. Esta predicción fue realizada mediante dos programas que, al estar basados en distintos tipos de información, resultaron complementarios en sus resultados. La cobertura combinada para estos programas fue del 74% de los 3.209 ORFs del genoma de *B. pertussis* Tohama I. Para esta selección integramos también una serie de datos relevados de la bibliografía en cuanto a la presencia de cada ORF en aislamientos clínicos y a la modulación de su expresión por el sistema de dos componentes BvgAS que regula el cambio entre las fases avirulenta y virulenta del patógeno. En base a estos criterios pudimos identificar sobre los 3.209 ORFs un conjunto de 615 candidatos vacunales, entre ellos 211 con una localización predicha en la superficie del patógeno. Esta primera etapa del trabajo dio como resultado una base de datos sobre la cual, combinando los mencionados criterios, seleccionamos los candidatos a ser clonados, purificados y caracterizados mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

En los ensayos de screening *in vitro* de los candidatos decidimos utilizar un conjunto de sueros pertenecientes a pacientes infectados con *B. pertussis*. El empleo de este tipo de sueros nos permitiría explorar uno de los atractivos de la vacunología reversa como es la posibilidad de identificar candidatos cuya expresión ocurra solamente en el huésped natural del patógeno (expresión *in vivo*). Sobre un panel de algunos cientos de sueros seleccionamos 5 grupos de 6 sueros cada uno, en función de distintos criterios: epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Los resultados de los ensayos *in vitro* (immunoblots) nos permitieron concluir que el panel de sueros utilizado sería representativo de la población de individuos convalecientes, ya que los candidatos reconocidos por los distintos grupos de sueros se repitieron. Los sueros humanos seleccionados en base a un mayor número de criterios resultaron reconocer varios candidatos vacunales (5 en total), mientras que los sueros seleccionados por un único criterio, como la PCR positiva, reconocieron un número menor de los candidatos vacunales (2 de ellos).

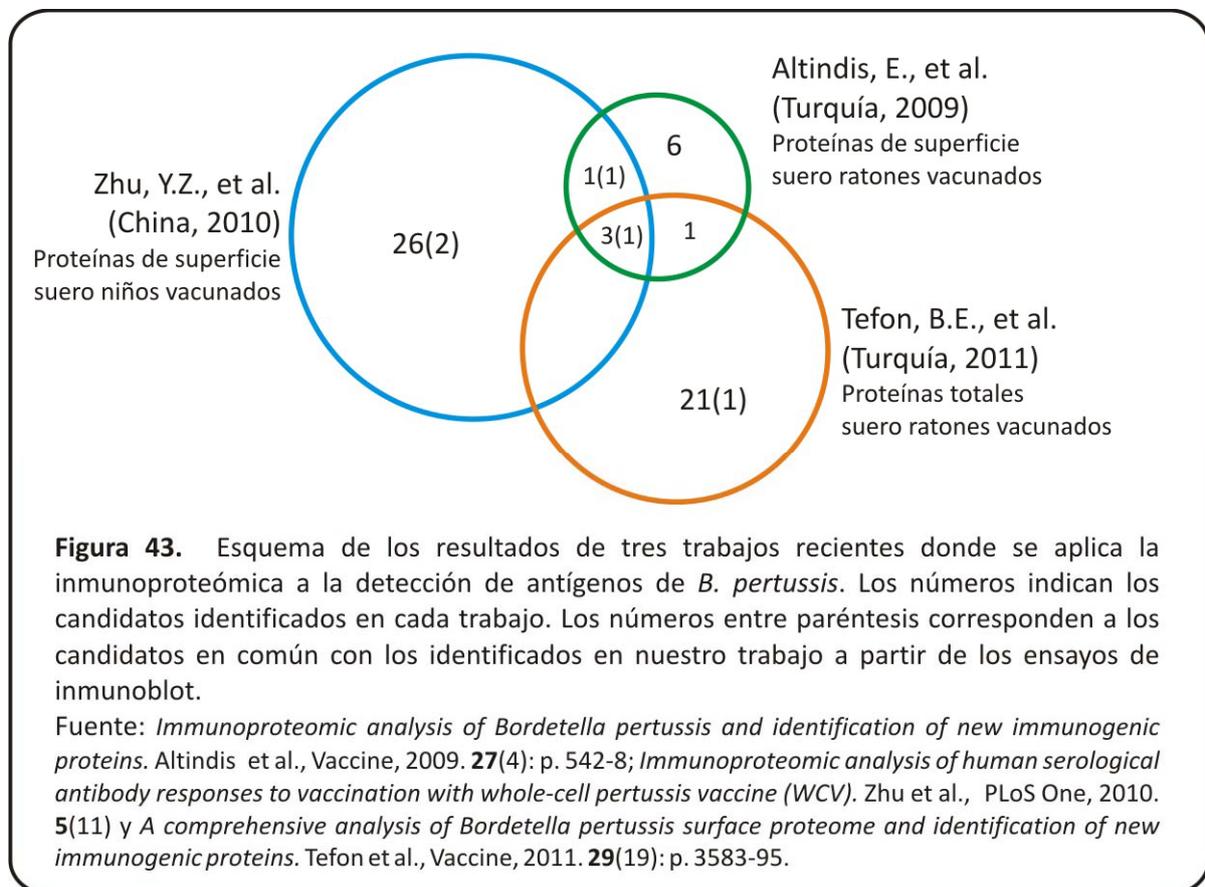
Hemos podido comprobar también que el empleo de sueros de humanos trae algunas complicaciones respecto del uso de sueros animales, debido al mayor nivel de reacciones cruzadas que presentan los primeros. En el caso de individuos adultos esto se ve particularmente exacerbado y puede complicar la interpretación de los resultados obtenidos. A lo largo de nuestro trabajo probamos varios esquemas experimentales hasta confluir en el uso de varios grupos de sueros que permitieron obtener resultados repetitivos y consistentes. Por otro lado, como mencionamos ya al referirnos a los resultados de los inmunoblots, sería muy interesante contar además con sueros pertenecientes a pacientes que no estuvieran previamente vacunados, de forma tal de analizar el perfil de respuesta humoral generado en ausencia de la impronta inmunológica de la vacunación. Esto no resulta sencillo porque, en general, los individuos que no están inmunizados al momento de la infección son aquellos cuya edad es inferior a la de la primera dosis, es decir menores de dos meses de edad. Es sabido que los niños en los que no se ha desarrollado por completo el sistema inmune responden a las infecciones en menor medida que los adultos. El problema reside entonces en que los sueros de este tipo tienen una baja sensibilidad que limita su utilidad como herramienta en la identificación de candidatos.

El uso de sueros de ratones inmunizados con preparaciones de células completas de *B. pertussis* parece indicar que todos los candidatos reconocidos por uno o más grupos de sueros de pacientes infectados serían a su vez expresados por esta bacteria en su crecimiento *in vitro*. Dado que estos sueros pueden obtenerse por un procedimiento sencillo y no presentan además un nivel significativo de reacción con las impurezas que puedan acompañar a los candidatos vacunales, son en principio una buena alternativa experimental. Sin embargo debemos remarcar que el uso de estos sueros no permitiría la detección de los candidatos exclusivos de la condición *in vivo*.

El uso de sueros como herramienta para la identificación de candidatos vacunales es un principio compartido con otro abordaje experimental, la inmunoproteómica. En este punto nos detendremos para hacer una breve comparación de la vacunología reversa con esta otra metodología, que en el caso de *B. pertussis* ha sido llevada adelante por dos grupos de investigación, uno en Turquía [261, 277] y el otro en China [262]. La inmunoproteómica consiste en la separación en geles bidimensionales de las proteínas presentes en una muestra y su posterior transferencia a membranas para ser utilizadas en ensayos de inmunoblot. Las proteínas reconocidas por los antisueros son luego identificadas por espectrometría de masa, ya sea a partir de la propia membrana o por comparación con un gel bidimensional en que se ha corrido la misma muestra. En los dos trabajos del grupo de Turquía, los investigadores enfrentan el suero de ratones inmunizados con células completas de *B. pertussis* a una preparación de proteínas de membrana [277] o bien a proteínas totales [261]. El grupo de investigación de China, por su parte, enfrentó una preparación de

proteínas de superficie y del espacio extracelular al suero de niños vacunados con una vacuna de células completas [262]. En base a los resultados de estos tres trabajos, elaboramos la Figura 43.

En su conjunto, los tres experimentos logran identificar un total de 58 candidatos vacunales, entre los cuales hay dos factores de virulencia conocidos (BrkA y Prn). Podemos ver en esta figura que los resultados no se solapan en gran medida: solamente 5 de las 58 proteínas son reconocidas en más de un esquema experimental, y dos de estas cinco corresponden a los mencionados factores de virulencia. Hay varias razones experimentales que pueden contribuir a esta falta de solapamiento de los resultados, entre ellas las cepas utilizadas, los protocolos de preparación de las muestras y el uso de sueros humanos o murinos.



Algunos de los 9 candidatos identificados en nuestro trabajo han sido identificados también por inmunoproteómica (cuyo número agregamos entre paréntesis en cada conjunto de la Figura 43), llegando entonces a resultados que concuerdan por ambas metodologías. Los candidatos identificados en común por estos experimentos y en nuestro trabajo fueron 22, 25, 37, 57, y 65. El hecho de que varios de los candidatos se repitan valida de alguna manera los resultados de nuestro trabajo. Pero resulta también interesante enfocarse en algunas de las discrepancias entre los hallazgos de ambas metodologías. En el más reciente

de los trabajos mencionados [261], los autores reportan la lista completa de proteínas identificadas en la muestra que luego utilizan en los inmunoblots. Es notable que en esta lista, que consta de 226 proteínas, encontramos 5 de nuestros candidatos reconocidos por el suero de ratones inmunizados, pero que en este trabajo no son identificados como tales, probablemente por un problema de sensibilidad de la inmunoproteómica. Este sesgo hacia la detección de los antígenos más abundantes en la inmunoproteómica no se verifica en la vacunología reversa, donde podemos ajustar la cantidad de cada candidato incluida en los ensayos. Así es que, aún cuando conceptualmente podríamos pensar que los resultados de ambas metodologías deberían ser concordantes excepto para los candidatos exclusivos de la condición *in vivo*, las limitaciones experimentales vuelven a estas estrategias complementarias. El análisis inverso muestra dos posibles falsos negativos de nuestra estrategia. Los candidatos 64 y 68, para los cuales nosotros no vimos reconocimiento, fueron identificados en el trabajo de Zhu et. al. [262] a partir de su reacción con el suero de niños vacunados. Sin embargo, estos candidatos no fueron identificados tampoco en los otros dos trabajos de inmunoproteómica [261, 277].

En líneas generales, podemos concluir entonces que el abordaje realizado en este trabajo dio resultados reproducibles, y razonablemente coincidentes con los reportados por otros grupos que se han dedicado a este mismo problema desde metodologías complementarias a la nuestra.

La vacunología reversa presenta así algunas características interesantes frente a otras alternativas que también persiguen la identificación de nuevos candidatos vacunales. La principal es que se trata de una metodología en la que se seleccionan candidatos vacunales de entre todos los ORFs de un microorganismo. Esto tiene importantes ventajas. Además de la ya mencionada posibilidad de incluir en la selección de candidatos aquellos cuya expresión se dé solamente *in vivo*, debemos señalar también la inclusión de antígenos que en condiciones normales se expresan en bajas cantidades, y son por lo tanto difíciles de identificar por otras metodologías.

Por otro lado, en contraposición con aquellas estrategias que se basan en algún criterio funcional para la selección, probablemente muchos de los candidatos elegidos por vacunología reversa no tendrán poder protector alguno. Es por esto que en la vacunología reversa se seleccionan inicialmente un gran número de candidatos, que son luego sujetos a criterios de selección *in vitro* e *in vivo* para evaluar sus propiedades inmunogénicas. Desde este punto de vista, y volviendo sobre la comparación de la vacunología reversa con otras estrategias, podemos decir que ésta es una estrategia factible que puede pensarse como un importante complemento de metodologías más clásicas en la búsqueda de inmunógenos proteicos.

Volveremos ahora a los distintos pasos que conformaron la estrategia seguida. Luego de caracterizar los candidatos en relación al reconocimiento con sueros de individuos infectados, vacunados y sanos, pudimos clasificar a nuestro conjunto de candidatos en dos grupos: aquellos que reaccionaron con los anticuerpos anti - *B. pertussis* (9 candidatos) y aquellos que no (38 candidatos). El siguiente paso consistió en avanzar en la caracterización *in vivo* de los candidatos caracterizados *in vitro*. La hipótesis en que realizamos los experimentos *in vivo* era entonces que tendríamos una mayor probabilidad de éxito en el grupo de los candidatos reconocidos por los sueros.

Los experimentos *in vivo* consistieron en ensayos de protección en ratones empleando el modelo de desafío intranasal. Las formulaciones vacunales incluyeron no solo a los 9 candidatos reconocidos por sueros sino también a 10 candidatos de los 38 candidatos no reconocidos. En todos los casos suplementamos estas formulaciones con adyuvante de Freund, en línea con resultados anteriores para otros inmunógenos [294-297]. En los ensayos *in vivo* empleando esta metodología estándar, observamos que tanto los candidatos que habían sido seleccionados en base a su reconocimiento *in vitro* por antisueros como los no reconocidos, no presentaron capacidad protectora frente a un desafío subletal de *B. pertussis*. Estos resultados, analizados en este punto y con la metodología empleada, indicarían que la sola presencia de anticuerpos contra un candidato no es necesariamente un buen correlato de los niveles de protección que éste pueda conferir. La ausencia de ensayos *in vitro* que muestren una correlación absoluta con la protección es un problema común en el estudio de muchas infecciones. Este inconveniente ha sido resuelto por otros investigadores probando directamente todos los candidatos obtenidos en modelos animales, empleando en estos ensayos varios centenares de ratones [126, 128, 137]. Aunque sin dudas efectiva, pensamos que esta estrategia requeriría del empleo de muchos más animales lo cual profundiza algunos cuestionamientos éticos, por lo que sería interesante plantearse alguna alternativa que permita -de manera confiable- reducir el número de candidatos a probar *in vivo*.

Por otro lado, los resultados obtenidos hasta este punto nos llevaron a profundizar el trabajo sobre un aspecto cuya resolución admite diversas posibilidades, como es la forma de presentación de los candidatos vacunales recombinantes. Hemos mencionado ya algunas de las variables experimentales que pueden afectar el resultado de los ensayos de protección como la dosis, la vía de inmunización, los adyuvantes, la conformación de los candidatos, etc. Dada la imposibilidad práctica de probar todas ellas, en nuestro caso optamos por un esquema de inmunidad incompleta lograda a partir del uso de dosis bajas de una vacuna acelular comercial. Los resultados promisorios encontrados en este escenario nos llevan a proponer para las siguientes etapas una profundización del mismo, confirmando las condiciones y extendiendo el análisis al resto de los inmunógenos.

Diferentes visiones en vacunología

Desde la introducción de las primeras vacunas contra la viruela hasta hoy, la vacunología ha seguido –según describimos en la primera sección del Capítulo primero- una tendencia al uso de formulaciones de componentes individuales y definidos. Los avances de la microbiología, y más tarde de la biología molecular, hicieron posible (y a la vez deseable) el uso de subunidades cada vez más pequeñas de los microorganismos como inmunógenos capaces de inducir respuestas protectoras. Al respecto, Guido Grandi argumenta, en una de sus publicaciones ya citadas [117] que la mayoría de las vacunas de composición compleja desarrolladas en el siglo XX no pasarían los estrictos controles de seguridad que se exigen hoy a las vacunas noveles. Los laboratorios comerciales que cuentan con la necesaria capacidad productiva y financiera fomentan además el uso de este tipo de formulaciones. Aún con esta consideración pensamos que el enfoque molecular es en general apoyado también desde el ámbito académico.

Los ejemplos de vacunas a subunidades abundan, y entre ellas hemos mencionado a las vacunas de polisacáridos conjugados, las vacunas a toxoides, la propia vacuna de pertussis acelular, o las vacunas basadas en proteínas recombinantes contra hepatitis B o contra el virus del papiloma humano (ver “Una historia de la vacunación”). El uso de extractos y componentes purificados permitió evitar, además del riesgo inherente a vacunar con organismos completos o incluso replicativos, el uso de formulaciones que incluyen algunos componentes tóxicos como el LPS de las bacterias. Las actuales líneas de innovación en vacunas continúan con esta tendencia: como ejemplos podemos citar el uso de vectores inoos que portan uno o más genes de un patógeno, el desarrollo de vacunas a ADN, y la estrategia aplicada en nuestro trabajo, la vacunología reversa. Los aportes a la vacunología de la genómica funcional y la proteómica van también en el sentido de identificar candidatos proteicos para vacunas a subunidades. El límite de esta tendencia, la vacunación con epitopes protectores, ya ha comenzado a probarse incluso combinando epitopes provenientes de patógenos diferentes. Podemos decir que, en general, la idea de que es posible separar la actividad patogénica de la necesaria para montar una respuesta inmune, ha dado muy buenos resultados generando vacunas seguras y efectivas. El trabajo presentado en esta Tesis se encuentra en esta línea de razonamiento.

Sin embargo, hay elementos que pueden llevarnos a replantearnos este enfoque que llamamos molecular. El avance en el conocimiento de las interacciones entre patógenos y huéspedes muestra un panorama complejo. Por un lado, tenemos el sistema inmune

humano con múltiples poblaciones celulares que mantienen una intrincada señalización entre sí, una multiplicidad de tejidos con sus especificidades, y variadas formas de respuesta ante la presencia de agentes extraños. Más aún, algunos patógenos cuentan con la posibilidad de evadir o incluso modular la respuesta inmune montada por el huésped. En la interacción que implica una infección natural todos estos factores entran en juego, y la respuesta dependerá de la integración de múltiples señales. Ante semejante complejidad, podría parecer extraño que una vacuna sea exitosa basándose exclusivamente en la generación de anticuerpos contra una única toxina de un microorganismo. Cabe preguntarse, por lo tanto, si esta estrategia será suficiente para lograr mejorar aún más las vacunas contra las enfermedades que lo requieren, o para desarrollar vacunas contra patógenos que se muestran elusivos.

Rappuoli discute este problema en un trabajo del año 2007 [299] y en una revisión más reciente para un libro publicado en 2010 en que se revisa el estado de situación de la mayoría de las vacunas en desarrollo [125]. En esta última hace una clasificación de las vacunas basada en dos criterios: por un lado, según el tipo de respuesta inmune requerida para lograr la protección, clasificándolas como humorales o celulares. Por otro lado, clasifica los patógenos causantes de estas enfermedades en función de su estabilidad o variabilidad antigénica (Figura 44). En la figura, tomada de este último trabajo, las vacunas contra enfermedades del cuadrante superior derecho serían las que tendrían menos probabilidades de fallar durante su proceso de desarrollo. Las que más dificultades presentan son las del cuadrante inferior izquierdo, como por ejemplo el SIDA. Rappuoli se muestra optimista respecto de que el uso de nuevos adyuvantes permitirá ahondar en la estrategia de las vacunas a subunidades [125, 222].

Una opción cualitativamente distinta sería utilizar vacunas tan parecidas como fuera posible a los microorganismos naturales, de manera que la vacunación induzca una respuesta inmune similar a la que sigue a la infección natural. La mejor alternativa dependerá de cada patología particular, pero merece preguntarse si la estimulación con un número limitado de los antígenos presentados naturalmente por un patógeno será suficiente en todos los casos.

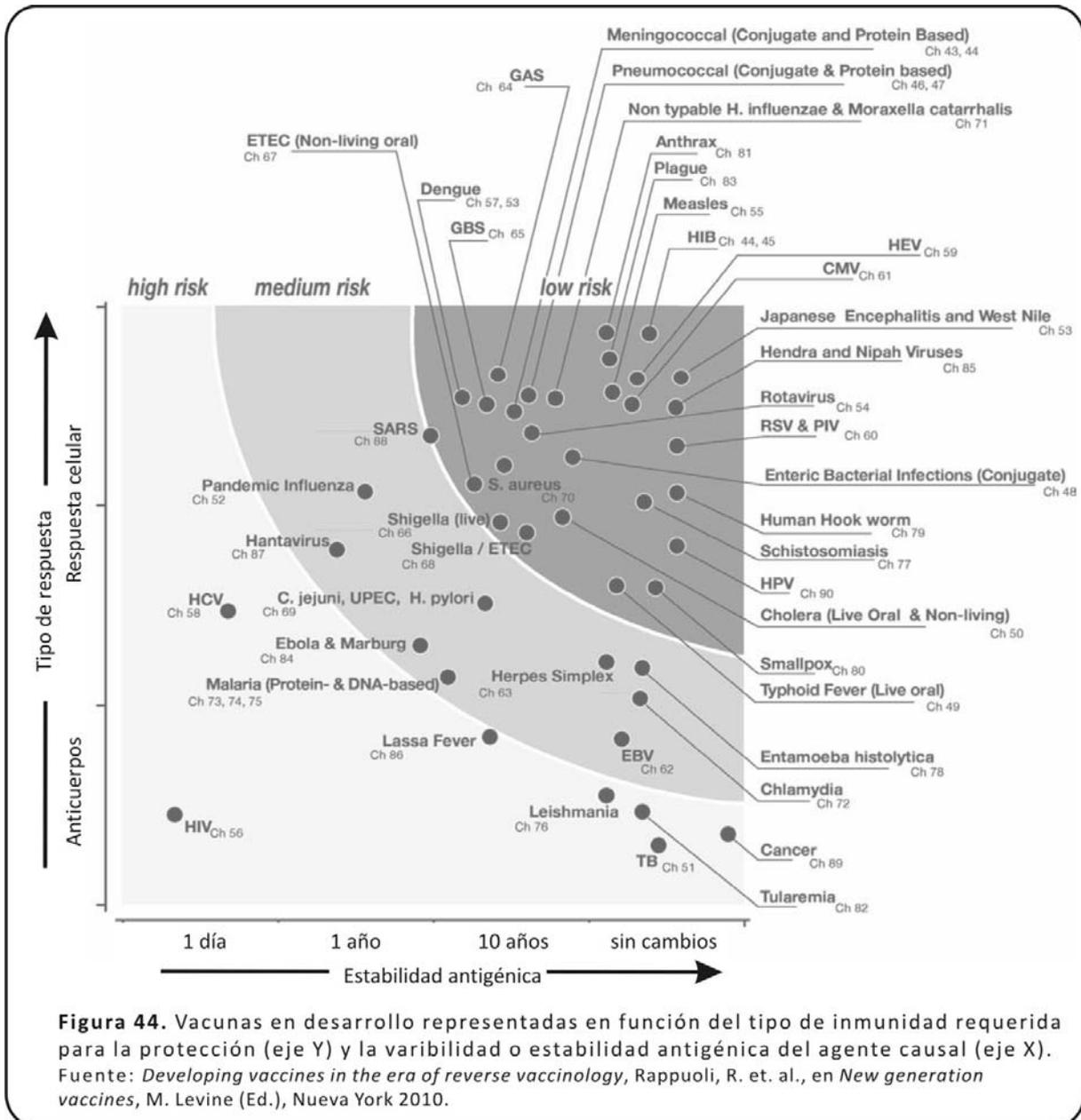


Figura 44. Vacunas en desarrollo representadas en función del tipo de inmunidad requerida para la protección (eje Y) y la variabilidad o estabilidad antigénica del agente causal (eje X). Fuente: *Developing vaccines in the era of reverse vaccinology*, Rappuoli, R. et. al., en *New generation vaccines*, M. Levine (Ed.), Nueva York 2010.

Estas posibilidades en el caso de pertussis deben ser evaluadas teniendo en cuenta que uno de los problemas a resolver es la corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas hoy en uso. Este es un aspecto que parece particularmente complicado de abordar únicamente a partir de la introducción de nuevos candidatos vacunales. El uso de agonistas de TLRs y otros nuevos adyuvantes, como los particulados, podría representar una alternativa. Un abordaje diferente lo constituyen los trabajos de C. Locht en el desarrollo de una vacuna atenuada con una cepa generada no a partir de los antiguos métodos de atenuación sino mediante metodologías de biología molecular [114, 232]. Para sostener su punto de vista, el grupo de Locht hace eje en la duración de la protección generada por esta cepa atenuada, y en el perfil de respuesta obtenido (más parecido al de una infección natural que al de la vacuna acelular, como es esperable). El planteo de una vacuna atenuada

cuando ya existen vacunas acelulares de probada eficacia puede parecer anacrónico en el contexto en que la visión hegemónica favorece los enfoques moleculares. Sin embargo, tal vez deba prestársele atención en vista de algunas de las complicaciones que hemos mencionado. El interrogante se mantiene abierto, aunque la estrategia de la vacuna atenuada deberá enfrentar seguramente algunas dificultades extra en cuanto la comunidad científica y los planificadores del sistema de salud mantienen sus cuestionamientos sobre los riesgos de aplicar una vacuna replicativa.

En suma, pertussis se muestra como una problemática compleja en la que se requiere la aplicación de estrategias combinadas. Así, la vacunología reversa o la inmunoproteómica podrían aportar a la identificación de nuevos inmunógenos que amplíen el espectro de antígenos utilizados en la vacunación. Por otro lado, el empleo de distintos adyuvantes y/o vías de inmunización podría ser la respuesta en pos de lograr un mayor control de la enfermedad si la duración de la inmunidad fuera la causa determinante de su reemergencia.



Metodología

Metodología

1. Medios y condiciones de cultivo

Escherichia coli

Utilizamos la cepa *E. coli* Top10 para la construcción, propagación y almacenamiento de los vectores empleados en este trabajo. La cepa utilizada en la expresión de las proteínas heterólogas fue *E. coli* BL21 DE3. Los stock bacterianos de *E. coli* utilizados se conservan a – 20 °C como una suspensión densa en medio LB, en presencia de glicerol 50 % v/v.

En los casos en que fueron necesarios, los antibióticos kanamicina o ampicilina se adicionaron al medio LB, sólido o líquido, a concentraciones 50 µg/ml y 100 µg/ml respectivamente.

Medio Luria-Bertani (LB)

Triptona 10 g/l
Extracto de levadura 5 g/l
Glucosa 1 g/l
NaCl 0,085M

Bordetella pertussis

Los stock bacterianos de las cepas de *B. pertussis* utilizadas se conservan como una suspensión en el medio sintético de Stainer-Scholte (SS) a – 20 °C, en presencia de glicerol 50 % v/v. Para obtener células de *B. pertussis*, a partir de estos stock iniciamos cultivos a 37 °C durante 72 hs. en placas de Petri conteniendo el medio Bordet Gengou suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 10% v/v (BGAS). Transcurridas 72 horas del primer cultivo efectuamos un subcultivo en el mismo medio durante 24 horas más.

Agar Bordet – Gengou Sangre (BGAS).

Agar Bordet-Gengou comercial (Difco®) 15 g/l cultivo
Peptona (Difco®) 10 % p/v
Glicerina 1 % v/v
Una vez esterilizado se suplementa con 10 % v/v de sangre de carnero.

Stainer-Scholte (SS)

Glutamato de sodio monohidrato 10,7 g/l

L- Prolina 0,24 g/l

NaCl 2,50 g/l

KH₂PO₄ 0,50 g/l

KCl 0,20 g/l

MgCl₂ · 6 H₂O 0,10 g/l

CaCl₂ · 6 H₂O 0,02 g/l

Tris-HCl 1,52 g/l

El medio se lleva pH 7,2 con una solución de HCl concentrado, y se esteriliza 15 minutos a 121°C. Luego se le adiciona el complemento esterilizado por filtración.

2. Obtención de los amplicones y chequeo de construcciones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los moldes de ADN para las reacciones realizadas sobre *B. pertussis* o sobre los distintos clones de *E. coli* TOP10 obtenidos se obtuvieron a partir de la suspensión de bacterias, provenientes de medio sólido, en 100 µl de agua bidestilada estéril. La cantidad fue la suficiente como para obtener una D. O. de aproximadamente 0,5. Estas suspensiones bacterianas se sometieron luego a ebullición durante 15 minutos y a una posterior centrifugación (5 minutos a 8.000g) para separar el pellet de bacterias no lisadas y los restos celulares del sobrenadante. Usamos este último como molde, a razón de 2µl por reacción.

La mezcla de reacción para la enzima Taq polimerasa fue la siguiente: buffer de reacción 1x (Invitrogen), MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,1 mM, primers 0,5 µM, dimetilsulfóxido (DMSO) 2µl, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen), ADN molde, agua bidestilada estéril c.s.p.

La mezcla de reacción para la enzima *Platinum Pfx* fue la siguiente: buffer de reacción 1x (Invitrogen), solución enhancer 1x (Invitrogen), MgSO₄ 5 mM, dNTPs 0,2 mM, primers 0,5 µM, ADN molde, 0,5 unidades de Pfx Platinum polimerasa (Invitrogen), agua bidestilada estéril c.s.p.

El kit comercial de la enzima *Pfx* incluye un buffer, una solución de sulfato de magnesio y un reactivo de composición no revelada por el fabricante, llamado "enhancer". A fin de obtener un amplicón único y compatible con el tamaño esperado, al preparar la mezcla de reacción de las PCRs se ajustaron las cantidades relativas de estos reactivos. Asimismo ajustamos la temperatura de hibridación y la duración de cada paso de la reacción. Las condiciones de ciclado para cada candidato vacunal se encuentran listadas en la Tabla 15. Realizamos las reacciones de PCR en un volumen final de 20 µl.

Tamaño esperado

Indice	nORF	Tamaño esperado (en pb)	B	Mg	Enh	Temp.	Indice	nORF	Tamaño esperado (en pb)	B	Mg	Enh	Temp.
1	BP1628	1134	2	1	2	50	40	BP1126	1547	2	0,6	2	48
2	BP1989	1734	2	1	2	50	41	BP1160	1015	4	0,4	4	53
3	BP2019	727	2	1	2	50	42	BP1507	958	2	2	2	49
4	BP2396	1703	2	1	2	50	43	BP1532	901	2	2	2	49
5	BP2661	1243	2	1	2	50	44	BP1580	729	2	0,6	2	45
6	BP3006	703	2	0,6	4	48	45	BP1631	2189	2	0,5	2	48
7	BP3342	595	2	1	2	55	46	BP2204	944	2	0,4	2	47
8	BP3716	1217	2	0,6	4	50	47	BP2337	2059	2	0,6	2	62
9	BP3802	1613	2	1	2	50	48	BP2526	1584	2	0,4	2	55
10	BP3831	1161	2	1	2	50	49	BP2889	461	2	2	2	49
11	BP0736	2451	2	2	4	48	50	BP3150	1302	2	2	2	49
12	BP0857	2410	2	2	4	55	51	BP3568	1178	4	0,4	2	55
13	BP1138	2512	2	1	4	50	52	BP0347	868	2	0,4	2	49
14	BP1364	897	2	1	2	55	53	BP0456	2368	No obtuvimos el producto			
15	BP2090	1209	2	1	2	50	54	BP0943	596	2	0,8	2	54
16	BP2235	1981	2	2	4	57	55	BP1201	2017	2	1	2	45
17	BP3052	1701	2	1	2	48	56	BP1251	740	2	0,4	2	48
18	BP3196	1244	2	0,6	2	50	57	BP1428	743	2	0,8	4	55
19	BP3595	1949	4	0,4	2	55	58	BP1834	656	2	0,4	2	49
20	BP3812	1648	2	1	4	55	59	BP1883	1101	2	0,8	4	55
21	BP0057	1104	2	1	2	49	60	BP2219	1133	2	1	2	47
22	BP0558	1088	2	0,7	4	47	61	BP2327	1742	No obtuvimos el producto			
23	BP0763	1529	2	0,6	2	48	62	BP2463	2295	2	0,8	2	55
24	BP1277	1262	2	1	4	52	63	BP3077	2256	2	0,5	4	45
25	BP1285	1254	4	0,4	4	48	64	BP3405	1199	2	0,4	2	47
26	BP1767	1351	2	1,2	4	48	65	BP3495	1660	2	0,6	2	45
27	BP1882	2796	4	0,5	2	48	66	BP3790	2497	2	0,6	2	47
28	BP2901	2365	No obtuvimos el producto				67	BP3793	878	2	0,4	2	47,5
29	BP3315	1805	2	1	4	45	68	BP3794	875	2	0,4	2	46,5
30	BP3663	2212	2	1	2	48	69	BP1119	802	No obtuvimos el producto			
31	BP2674	771	2	1	4	48	70	BP1568	729	2	0,4	2	49
32	BP3270	897	2	0,8	4	59	71	BP3494	3237	No obtuvimos el producto			
33	BP0346	1182	2	0,6	2	45	72	BP3783	824	2	0,4	2	49
34	BP0418	1051	4	0,4	2	62	73	BP3784	693	2	0,4	2	49
35	BP0542	1096	2	0,6	2	48	74	BP3785	509	2	0,4	2	49
36	BP0826	1537	2	0,5	4	45	75	BP3786	535	2	0,4	2	49
37	BP0840	1332	4	0,4	2	45	76	BP3787	721	2	0,4	2	49
38	BP0986	1417	2	0,6	2	45							

Tabla 25. Mezcla de reacción y temperatura de hibridación utilizadas en las PCR con enzima Pfx. B: Buffer (µl); Mg: MgSO4(µl); Enh: enhancer (µl); Temp: temperatura de hibridación en °C. Los tiempos utilizados fueron de 20'' para la hibridación y de 60''/1000 pb para la elongación, con una elongación final adicional de 2'. La temperatura de elongación de la enzima utilizada es de 68°C.

3. Análisis cualitativo de muestras de ADN en geles de agarosa

El análisis cualitativo de las muestras de ADN y la separación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8-1,5% p/v) empleando buffer TBE (Tris-HCl 89 mM, Na₂EDTA 2,5 mM, H₃BO₃ 89 mM, pH 8,2) como buffer de corrida. El voltaje de trabajo varió entre 5 y 12 volts/cm. Como solución de siembra utilizamos sacarosa 40% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v en una relación 5 µl solución de ADN en agua por cada 1 µl de solución de carga. Para la visualización del ADN sobre los geles de agarosa agregamos a los mismos 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital Kodak modelo DC 290 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

4. Clonado de los amplicones en los vectores pEntr/SD/D-Topo y pET200

El procedimiento de clonado consta de una primer reacción análoga a la ligación en la que se ponen en contacto el amplicón obtenido con la enzima Pfx polimerasa y uno de los vectores linealizados de origen comercial. En nuestro trabajo empleamos un volumen final de esta mezcla de reacción de 2 µl. La cantidad de producto de PCR incluida en cada reacción fue de aproximadamente 2 ng para productos de alrededor de 1.000 pares de bases, y de 5 ng para productos de alrededor de 2.000 pares de bases. En lo posible utilizamos amplicones obtenidos en el mismo día de efectuar la ligación.

La composición de esta mezcla de reacción fue:

Producto de PCR	1µl (conteniendo 1 ng de ADN para productos de 1.000pb o menos, y 2,5 ng de ADN para productos de 2.000 o más pb)
Solución salina (provista con el kit)	0,33 µl
Agua bidestilada estéril (provista con el kit)	0,33 µl
Vector	<u>0,33 µl</u>
Total	2 µl

Incubación: 30 minutos a temperatura ambiente

5. Transformación de plásmidos en bacterias competentes químicas

Sobre 15 µl de la suspensión de células competentes comerciales o 100µl de células competentes preparadas en el laboratorio (ver más abajo) agregamos entre 10pg y 100pg de plásmido purificado. Tras incubar 30 minutos en hielo esta mezcla, la sometimos a un shock térmico de 42°C durante 60 segundos.

Agregamos a las células un volumen de 0,25 ml de medio LB líquido e incubamos las mismas durante 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo plaqueamos las células en placas de

medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado. Seguimos el mismo procedimiento tanto para las células competentes comerciales, incluidas en los kits utilizados (cepas TOP10 y BL21 DE3 de *E. coli*) como para las células preparadas en nuestro laboratorio (ver punto 8).

6. Purificación de plásmidos

Una vez clonados los productos de PCR y chequeados los clones obtenidos, purificamos los plásmidos con el objetivo de utilizar estas preparaciones en la reacción de recombinación (entre el plásmido pEntr y el vector comercial de expresión pDest17) o bien, en el caso del vector pET200, para transformarlas en bacterias aptas para ensayar la expresión.

Para la purificación de los plásmidos utilizamos la técnica de lisis alcalina, descrita por Sambrook y colaboradores [300]. Realizamos la concentración de los plásmidos por precipitación con isopropanol en una relación de volúmenes 1:1, con posterior lavado con etanol 70% v/v. Para la cuantificación de ADN se empleó el método espectrofotométrico [300].

7. Recombinación con enzima LR

Según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen) utilizamos la reacción de recombinación homóloga para transferir los insertos clonados en el vector pEntr/SD/D-Topo al vector pDest17. Mientras que el vector pEntr confiere resistencia al antibiótico Km, el vector pDest17 lo hace para la Ampicilina. A su vez este último plásmido tiene originalmente, entre sus sitios de recombinación, la secuencia que codifica para una proteína suicida en *E. coli* (codificada por el gen *ccdB*). Al ocurrir la recombinación, esta secuencia es reemplazada por la proveniente del plásmido pEntr. Las bacterias que luego de la transformación reciben el plásmido pDest17 original no proliferan. Tampoco aquellas que reciben el plásmido pEntr, por cuanto no poseen resistencia a la ampicilina.

Mezcla de reacción:

Vector pEntr::ORF	2 μ l (75 ng ADN)
Vector pDest::ccdb	0,5 μ l (75 ng ADN)
Enzima	1 μ l
TE Buffer, pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 , 1 mM EDTA)	1,5 μ l
Incubación: 1 hora a temperatura ambiente	

8. Preparación de bacterias *E. coli* BL21 DE3 aptas para transformación química

Utilizamos una modificación sobre el método original publicado en [301], tomado del sitio de internet OpenWetWare [302]. El procedimiento de transformación de las bacterias así preparadas fue descrito en el punto 5.

Preparación de los cultivos “semilla”

Preparamos los cultivos semilla creciendo la cepa *E. coli* BL21 DE3 en medio SOB a 23°C durante 16hs. A este cultivo saturado se agregó glicerol estéril a una concentración final del 15% v/v, el cultivo se alicuotó de a 1ml y se conservó a -80°C.

Preparación de bacterias competentes

Para la obtención de la biomasa inoculamos 250ml de medio SOB con un ml de cultivo semilla (ver más arriba). Tras aproximadamente 6hs de crecimiento a temperatura ambiente (23°C), y cuando el cultivo alcanzó una D.O. de 0,3 centrifugamos los cultivos en frío (4°C), en mamaderas de 250ml, a 5.000 g.

Resuspendimos el pellet obtenido en 80 ml de buffer CCMB80 a 4°C. Tras una incubación en hielo de 20 minutos, volvimos a centrifugar las células y esta vez la resuspendimos en 10ml del mismo buffer. Volvimos a incubar las células en hielo por otros 20 minutos, luego de los cuales alicuotamos todo el volumen de a 100µl y conservamos los tubos a -80°C.

Medio SOB

Extracto de levadura 0,5% (p/v)
Tryptona 2% (p/v)
NaCl 10 mM
KCl 2,5 mM
MgSO₄ 20 mM

Buffer CCMB80

KOAc 10 mM pH 7,0
CaCl₂ 80 mM (11,8 g/L)
MnCl₂ 20 mM (4,0 g/L)
MgCl₂ 10 mM (2,0 g/L)
Glicerol 10%v/v (100 ml/L)

9. Expresión de las proteínas heterólogas

Una vez transformadas las preparaciones de plásmidos de expresión (pDest17 o pET200) en células *E. coli* DE3 BL21 competentes procedimos a ensayar la expresión de las proteínas recombinantes. Para esto tomamos entre 5 y 10 colonias transformantes, y las crecimos en 5ml de medio LB líquido, suplementado con el antibiótico adecuado (100µg/ml de Ampicilina para pDEST17, o 50µg/ml de Km para pET200). Transcurridas 3 horas y media (cuando los cultivos alcanzaron una D.O._{600nm} de entre 0,6 y 0,8), tomamos una alícuota de este cultivo, que repicamos en medio LB fresco (con antibiótico) de forma tal de obtener una dilución 1:100 del mismo. Este repique tiene como objetivo sincronizar la población bacteriana en la fase exponencial de crecimiento. Dos horas después de repicados los cultivos, añadimos IPTG al medio en una concentración final de 1mM. Previo a la inducción preparamos, a partir de una alícuota, proteínas totales del cultivo (ver punto 10), a las que designamos “sin inducir”. La metodología seguida en este punto fue en líneas generales la recomendada por los fabricantes del kit de expresión utilizado [303].

Pasadas tres horas del momento de la inducción, preparamos nuevamente a partir de estos cultivos preparaciones de proteínas totales (designadas “inducidas”). Corrimos ambas muestras, inducidas y sin inducir, en geles de poliacrilamida para verificar la aparición de una banda diferencial del peso molecular esperado. Las células del resto del cultivo (unos 150ml aproximadamente) fueron cosechadas por centrifugación (10 minutos a 5.000 g).

10. Obtención de muestras de proteínas totales

Resuspendimos las bacterias provenientes de los cultivos de medio sólido o líquido, de forma de obtener una suspensión de D.O.=10 (D.O._{650nm} para *B. pertussis* y D.O._{600nm} para *E. coli*). Tras el agregado de buffer de Laemmli, sometimos las muestras a ebullición durante 15 minutos. Previo a la siembra en geles de poliacrilamida las muestras se centrifugaron y sonicaron en baño para lograr una mejor resolución de las mismas.

Buffer de Laemmli

Dodecil sulfato de sodio (SDS) 8% p/v
Glicerol 20% v/v
EDTA 0,004 M
Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8
Azul de Bromofenol 0,01 %
 β -mercaptoetanol 5 % v/v

11. Electroforesis unidimensionales en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Realizamos las corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli [304]. El gel de apilamiento o stacking se preparó en una concentración de 4 % de poliacrilamida (acrilamida : bisacrilamida 30:0,8) en buffer Tris-HCl 1M a pH 6,8 y SDS 10 % p/v, mientras que el gel de separación se preparó en una concentración de 12,5 ó 15 % de poliacrilamida (acrilamida : bisacrilamida 30:0,8), con Tris-HCl 1M a pH 8,8 y SDS 10 % p/v.

Las corridas se realizaron en equipos Miniprotean II (BioRad) durante 60 a 90 minutos a 100 volts (voltaje constante) utilizando como buffer de corrida: Glicina 0,37 M, SDS 10 % p/v, Tris-HCl 0,05M pH 8,3.

12. Tinción de proteínas con Coomassie Blue R-250

Para la observación de los perfiles proteicos luego de la electroforesis incubamos los geles en una solución de tinción (0,2% Coomassie Blue R-250 disuelto en agua bidestilada/metanol/ácido acético 45/45/10) por al menos 1 hora. Posteriormente desteñimos los geles con la misma mezcla de solventes utilizada para preparar la solución del colorante.

13. Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masa (EM), MALDI-TOF.

La identidad de las bandas diferenciales entre las preparaciones inducidas y sin inducir fue confirmada por espectrometría de masa.

Digestión triptica in-gel.

Cortamos las bandas identificadas visualmente como diferenciales entre las preparaciones inducidas y sin inducir y las colocamos en distintos pocillos de placas multi-well. Para eliminar el colorante Coomassie Blue, lavamos los *spots* alternadamente con 100 μ l de agua bidestilada y acetonitrilo (2 veces de 10 minutos con agitación moderada). Luego efectuamos un paso de reducción y alquilación los restos sulfhídricos, seguida de lavados con acetonitrilo y una incubación con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 25 mM, en oscuridad, durante 15 minutos y a temperatura ambiente.

Luego de la incubación realizamos un nuevo lavado con bicarbonato de amonio 25 mM y seguidamente deshidratamos las bandas lavándolas 3 veces con acetonitrilo. Cuando los *spots* estuvieron completamente blancos, deshidratadas y libres de acetonitrilo; fueron rehidratadas con pequeños volúmenes, 15-20 μ l, de bicarbonato de amonio 25 mM conteniendo tripsina (20 μ g/ml, Promega). Incubamos las bandas durante 45 minutos a 4 °C, y una vez transcurrido este tiempo verificamos que los *spots* estuvieran perfectamente hidratados para luego efectuar la digestión a 37 °C, ON.

Obtención de la huella peptídica mediante espectrometría de masa (EM).

Para realizar el análisis por espectrometría de masa utilizamos una matriz α -ciano-4 hidroxí - ácido cinámico, en una concentración 0,2 g/l preparada en una solución 50 % acetonitrilo / 0,25 % TFA. Colocamos la muestra junto con la matriz en una relación 1:1 en el soporte MTP Anchor Chip™ 600/384 TF, y dejamos secar durante 10 minutos a temperatura ambiente, previo al análisis por EM.

El espectro de la muestra se obtuvo luego empleando un equipo Ultraflex II Tof-Tof (Bruker Daltonics). Los parámetros utilizados fueron los siguientes: potencia del láser 31-50 %, frecuencia del láser 100Hz, 100 shots por disparo, voltaje de aceleración 20 kV, detección de masa 800-3.500 Da, señal deflectada por debajo de 850 Da, ganancia del detector 1.650 V, ganancia electrónica 100mV. Analizamos los espectros así obtenidos utilizando el software Flex Analysis (Bruker Daltonics) con calibración interna utilizando los picos conocidos de autólisis de la tripsina.

Identificación de proteínas y herramientas bioinformáticas.

Realizamos la búsqueda e identificación de los péptidos mediante el software MASCOT (Matrix Science a <http://matrixscience.com>) utilizando la base de datos derivada del

secuenciamiento del genoma completo de *B. pertussis* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los parámetros de la búsqueda fueron los siguientes: (i) Especie, Bacteria (Eubacteria); (ii) Enzima, tripsina con posibilidad de un error en la digestión; (iii) modificaciones postraduccionales variables, oxidación de metioninas; (iv) modificaciones fijas, carbamidometilación; (v) tolerancia peptídica, ± 50 ppm; (vi) carga del péptido, +; y (vii) masa monoisotópica. Sólo consideramos las identificaciones cuyo score fue mayor al score umbral definido por MASCOT como estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

14. Purificación mediante cromatografía de afinidad

Una vez verificada la expresión de las proteínas de interés mediante la observación del perfil de proteínas totales (preparado a partir de la mencionada alícuota de 1ml, ver punto 10), resuspendimos las células cosechadas en un buffer de lisis (preparado según las recomendaciones del fabricante de la resina de purificación, también adquirida en Invitrogen, ver más abajo). Este buffer de lisis incluye un agente desnaturizante (Cloruro de guanidinio 6M, pH=7,8) para optimizar la exposición de la marca de histidina [303, 305]. Resuspendimos los cultivos de 150ml en 4ml de buffer de lisis, y luego provocamos la lisis celular por sonicación (equipo Sonifier 150, 6 pulsos de 60 segundos cada uno). Por último centrifugamos las preparaciones (8min a 8.000g) para separar el remanente de células no lisadas.

Con el lisado así obtenido realizamos purificaciones en lote o “batch”, utilizando como agente activo una resina de agarosa conjugada con NTA (ácido nitrilotriacético) y cargada con iones Ni^{+2} (Invitrogen). Sobre una columna con la cantidad de resina adecuada (consideramos la capacidad de unión de proteínas de la resina igual a 5mg/ml de resina), incubamos el lisado durante 30 minutos con agitación moderada (en un equipo de agitación por rotación), manteniendo así la resina en suspensión y favoreciendo la unión de la proteína marcada a la misma. Pasados los 30 minutos, eluimos el lisado de la columna, en la que queda retenida entonces la proteína de interés. En pasos sucesivos la resina se lava y por último se fuerza la elución de la proteína de interés, estableciendo condiciones en que disminuye la afinidad por el catión metálico. Los lavados y posterior elución de la misma pueden hacerse por dos metodologías, a saber:

a) Lavado y elución por gradiente de pH: el fundamento de este método es el cambio en la carga del residuo histidina, que al bajar el pH va adquiriendo carga positiva. Una vez que la mayoría de los residuos de His se han ionizado, la marca pierde la capacidad de quelar el Ni^{+2} y la proteína se desprende de la resina. En los casos en que utilizamos esta metodología, hicimos 2 lavados a pH 8, dos lavados a pH 6 y por último dos eluciones a pH 4,

siempre con un volumen de 4ml. Todas las soluciones mencionadas contienen urea 8M para mantener la proteína en forma soluble (ver la composición más abajo).

b) Lavado y elución por gradiente de imidazol: el imidazol, con una estructura química análoga al residuo R de la histidina, compite con ésta por los sitios de unión a la resina, desplazando la proteína de interés. En esta variante de la metodología, hicimos 4 lavados con imidazol 20mM; y posteriormente dos eluciones con imidazol 200mM, en todos los casos con 4ml de volumen total. Al igual que en el caso anterior, las soluciones mencionadas contienen urea 8M, de modo de mantener la proteína en forma soluble, y están ajustadas a pH 8 (ver la composición más abajo).

Inicialmente realizamos la resuspensión y posterior lisis de los cultivos en un buffer fosfato con urea 8M, en lugar del buffer de lisis mencionado (que contiene como agente desnaturizante cloruro de guanidinio 6M). Luego de encontrar inconvenientes en la purificación de algunos candidatos particulares, pasamos a usar cloruro de guanidinio como agente desnaturizante. Comparativamente observamos que la solución de cloruro de guanidinio permitió mejorar las condiciones de unión de las proteínas de interés a la resina, por lo que fue ésta la droga elegida desde ese momento en adelante.

Por último, para remover la urea y el imidazol (en los casos en que estuvo presente) dializamos las fracciones de interés (en un único paso) contra buffer fosfato (PBS: KH_2PO_4 0,428 g/l, Na_2HPO_4 1,39 g/l, NaCl 7,2 g/l pH 7,4), lo que nos permitió concentrarlas al resuspenderlas en un volumen menor al original.

Cuando fue necesario, las preparaciones fueron concentradas por liofilización.

Soluciones de lisis y purificación

Buffer de lisis

Cloruro de guanidinio 6 M
Fosfato de sodio 20 mM , pH 7,8
NaCl 500 mM

Buffer de unión, lavado y elución por pH

Urea 8M
NaCl 500 mM
Fosfato de sodio 20 mM , pH 7,8 (unión); pH 6,0 (lavados); pH 4,0 (elución)

Buffer de unión, lavado y elución por pH

Urea 8M
NaCl 500 mM
Fosfato de sodio 20 mM , pH 7,8
Imidazol 10mM (unión); Imidazol 20mM (lavados); Imidazol 200mM (elución)

15. Inmunodetecciones de proteínas (Inmunoblot).

Las muestras de proteínas previamente sometidas a corridas electroforéticas fueron transferidas a membranas de difloruro de polivinildieno (PVDF) (Immobilon, Millipore) utilizando el equipo de transferencia en tanque (Buffer de transferencia: Tris 3g/L, glicina 14,4g/L, Metanol 20% v/v, SDS 0,01% p/v, agua bidestilada c.s.p.) Mini Trans-Blot transfer Cell (BioRad), a voltaje constante (100V) durante 60 a 90 minutos.

Realizamos el bloqueo de la superficie libre de las membranas transferidas por incubación de las mismas durante 1 hora a temperatura ambiente con una preparación de leche descremada (San Regim) 5 % p/v en buffer TBS (Tris-HCl 12 mM, NaCl 4 mM).

Incubamos las membranas con el primer anticuerpo a 4 °C ON, con agitación suave. La concentración de los sueros que utilizamos fue de 1/200. En el caso de los sueros agrupados, las cantidades que utilizamos de cada uno fue tal que la suma de todos los sueros de un grupo correspondiera a una dilución 1/200. Luego de esta primer incubación realizamos 6 lavados con buffer TBS, y agregamos el segundo anticuerpo (específico para IgG de ratón o de humano, según el caso) disuelto en TBS-leche 5% p/v en una dilución 1/1.000. Incubamos las membranas con el segundo anticuerpo durante 2,5 horas a temperatura ambiente, con agitación suave.

Transcurrido este tiempo, volvimos a realizar tres lavados con TBS y un último lavado con el buffer adecuado para la enzima conjugada al segundo anticuerpo (Buffer PA: 50 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 9,5, para la fosfatasa alcalina; o bien buffer Tris-HCl 0,1M a pH 8,8).

Finalmente en el momento del revelado agregamos una solución con el sustrato adecuado (ver a continuación) y mantuvimos las membranas en la oscuridad durante el revelado. Una vez que se desarrolló color se detuvo la reacción con agua bidestilada.

Sustrato para anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina:

4,4 µl de NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) + 3,3 µl de BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indolilfosfato p-toluidina) en 1ml de buffer PA.

Sustrato para anticuerpos conjugados a peroxidasa:

40 µl agua oxigenada 100vol + 10mg reactivo DAB (3,3'-Diaminobenzidina) en 5ml de buffer Tris 0,1M pH 8,8.

16. Obtención de sueros específicos contra *B. pertussis*

Para la obtención de antisueros inmunizamos grupos de 3 ratones con una cantidad de células de *B. pertussis* inactivadas y detoxificadas equivalente a 1/10 de la dosis utilizada en humanos: 1×10^9 UFC en 50 µl (DH: 4 UI=500 µl conteniendo 1×10^{10} UFC).

Realizamos una suspensión bacteriana en solución fisiológica inyectable estéril y a fin de eliminar restos de BGAS, previo a medir la DO_{650nm} , realizamos un lavado de la suspensión con solución fisiológica. Una vez preparada la suspensión, para determinar efectivamente el número de UFC/dosis de vacunas realizamos diluciones seriadas y recuento en placa en BGAS.

Posteriormente la suspensión bacteriana se detoxificó con formol al 0,35 % final (20 horas a 37 °C) y las bacterias fueron muertas por calor (30 minutos a 56 °C). Plaqueamos la vacuna así obtenida en BGAS, para verificar que no quedaran bacterias viables en la preparación. Agregamos como adyuvante $Al(OH)_3$ (Biol SAIC) en una concentración final 1mg/ml. Las vacunas se conservaron a 4°C por no más de una semana.

17. Ensayos de protección utilizando el modelo desafío intranasal en ratones

Inmunización

En los experimentos de protección utilizamos grupos de 5 ratones para cada tratamiento, y practicamos 2 inmunizaciones por vía intraperitoneal separadas por 14 días. Las dosis utilizadas en cada inmunización fue de 20µg de cada uno de los candidatos vacunales.

Desafío

Dos semanas luego de la segunda inmunización procedimos al desafío subletal de los distintos grupos de ratones. Para preparar el inóculo utilizamos un cultivo de *B. pertussis* Tohama I en medio sólido. Las bacterias fueron cultivadas durante 72hs en placas de medio BGA suplementado con sangre de carnero 10%, y luego repicadas en placas frescas por 24hs más. A partir de estos cultivos, preparamos una suspensión de bacterias que colocamos sobre las narinas de los ratones anestesiados, a razón de $5 \cdot 10^7$ bacterias por animal, en un volumen de 40µl. El método que usamos para anestésiar a los ratones fue la inhalación de éter sulfúrico.

Sacrificio y extracción de los pulmones

Los ratones desafiados fueron sacrificados mediante dislocación cervical a los 7 días post desafío (día 35 del experimento). Extrajimos los pulmones en esterilidad y los homogeneizamos en un volumen de 1ml de PBS (homogeneizador Pro Scientific INC 200).

Recuento de UFC

Para el recuento realizamos diluciones seriadas 1/10 de los homogenatos de pulmón en PBS, que plaqueamos a razón de 100µl por placa de medio BGAS. Realizamos el recuento de las UFC después de 3-4 días de incubación a 37 °C (Figura 45).

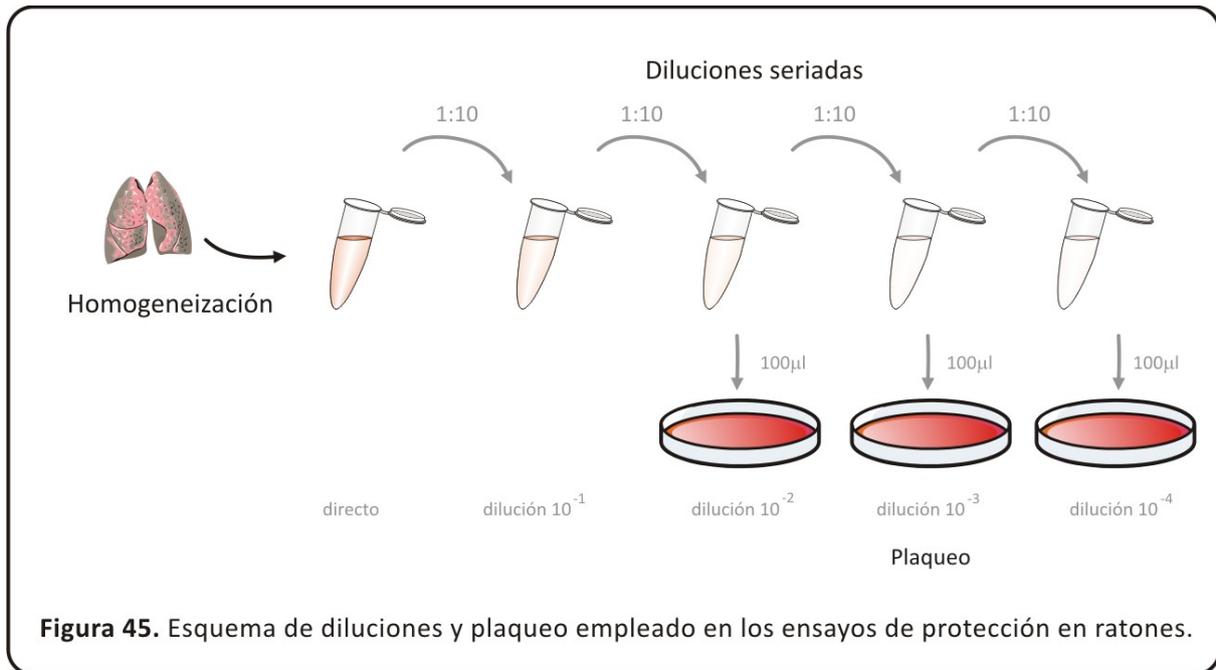


Figura 45. Esquema de diluciones y plaqueo empleado en los ensayos de protección en ratones.

El límite de detección de esta metodología viene dado por la capacidad de discriminar entre un pulmón con bacterias viables de uno que no contenga ninguna. Dado el procedimiento que seguimos, la placa que denominamos directa tendrá unas 10 veces menos UFC que el pulmón, la primer dilución 100 veces menos, y así sucesivamente. El límite inferior de detección vendrá dado por la placa directa, pero a causa de tomar una alícuota de la décima parte, no podemos estar seguros que el número de UFC en el pulmón sea nulo, aún cuando en la placa directa no aparezcan colonias.

Este problema admite un planteo en términos de la distribución de Poisson para muestreo aleatorio. Si admitimos esta distribución, la probabilidad de encontrar al menos una colonia en nuestra alícuota de un décimo del volumen total será de prácticamente 1 cuando el número de colonias esperado sea de 5 o más, lo que corresponde a un mínimo de 50 UFC en el pulmón. Este es el límite inferior de detección que establecimos en nuestros experimentos (el valor correspondiente es $\log_{10} 50=1,69$).

El límite de detección superior no es problemático, porque pueden hacerse tantas diluciones como sean necesarias para lograr un número esperado de entre 30 y 300 colonias por placa.



Referencias bibliográficas

Bibliografía

1. Artenstein, A., *Vaccines: A Biography*. 1st. ed, ed. A.W. Artenstein. 2010, New York ; London: Springer. xxi, 401 p.
2. Alinovi, M., *Historia de las epidemias*. 1ra ed. Estación Ciencia. 2009, Buenos Aires: Capital Intelectual.
3. Waller, J., *The discovery of the germ : twenty years that transformed the way we think about disease*. 2002, New York: Columbia University Press. 197 p.
4. Leung, A.K., "Variolation" and vaccination in late imperial China, ca 1570-1911, en *Vaccinia, vaccination and vaccinology.*, S.A. Plotkin y B. Fantini, Editors. 1996, Elsevier: Paris.
5. Fenner, F. y D. Henderson, *Smallpox and its eradication*. World Health Organization, 1988.
6. Jenner, E., *An inquiry into the causes and effects of the Variolae vaccine: a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox.*, en *The Classics of medicine library*. . 1798, Gryphon Editions: Birmingham, Alabama.
7. Góngora-Biachi, R.A., *El bicentenario del inicio de la vacunación*. Revista Biomédica, 1996. **7**(4): p. 241-4.
8. Rizzi, M., *Bicentenario de la expedición de la vacuna antivariólica y su introducción en el Río de la Plata*. Revista Médica del Uruguay, 2007. **23**(1): p. 7-18.
9. Opal, S., *A brief history of microbiology and immunology.*, en *Vaccines: A Biography.*, A.W. Artenstein, Editor. 2010, Springer: New York ; London. p. xxi, 401 p.
10. Snow, J., *On the mode of communication of cholera*. 2nd ed. 1855, London: John Churchill.
11. Ansúa, M.d., *Conferencia de Louis Pasteur de 1864 "Acerca de las generaciones espontáneas"*. Ciencia Hoy, 2000. **10**(59).
12. Latour, B. y S. Woolgar, *Laboratory life : the construction of scientific facts*. 1986, Princeton, N.J.: Princeton University Press. 294 p.
13. Bourhy, H., A. Perrot, y J.M. Cavaillon, *Rabies*, en *Vaccines: A Biography.*, A.W. Artenstein, Editor. 2010, Springer: New York ; London. p. xxi, 401 p.
14. Carpenter, C. y R. Hornick, *Killed vaccines: Cholera, Typhoid, and Plague*, en *Vaccines: A Biography.*, A.W. Artenstein, Editor. 2010, Springer: New York ; London. p. xxi, 401 p.
15. Grabenstein, J., *Toxoid Vaccines*, en *Vaccines: A Biography.*, A.W. Artenstein, Editor. 2010, Springer: New York ; London. p. xxi, 401 p.
16. Turnbull, P., *Anthrax*, en *Vaccines: A Biography.*, A.W. Artenstein, Editor. 2010, Springer: New York ; London. p. xxi, 401 p.
17. Woodruff, A.M. y E.W. Goodpasture, *The Susceptibility of the Chorio-Allantoic Membrane of Chick Embryos to Infection with the Fowl-Pox Virus*. Am J Pathol, 1931. **7**(3): p. 209-222 5.
18. Artenstein, A. y N. Artenstein, *The discovery of viruses and the evolution of vaccinology*, en *Vaccines: A Biography.*, A.W. Artenstein, Editor. 2010, Springer: New York ; London. p. xxi, 401 p.
19. Blumberg, B., *Hepatitis B*, en *Vaccines: A Biography.*, A.W. Artenstein, Editor. 2010, Springer: New York ; London. p. xxi, 401 p.
20. *Project Bioshield*. 2004; disponible en: <http://georgewbush-whitehouse.archives.gov/infocus/bioshield/>.

21. Bordet, J. y O. Gengou, *Le microbe de la coqueluche*. Les annales de l'Institut Pasteur., 1906. **20**: p. 731-41.
22. Shapiro-Shapin, C.G., *Pearl Kendrick, Grace Eldering, and the pertussis vaccine*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(8): p. 1273-8.
23. Leslie, P.H. y A.D. Gardner, *The Phases of Haemophilus pertussis*. J Hyg (Lond), 1931. **31**(3): p. 423-34.
24. Kendrick, P.L., et al., *Mouse Protection Tests in the Study of Pertussis Vaccine: A Comparative Series Using the Intracerebral Route for Challenge*. Am J Public Health Nations Health, 1947. **37**(7): p. 803-10.
25. Howson, C.P.H., Cynthia J.; Fineberg, Harvey V., *Adverse Effects of Pertussis and Rubella Vaccines : A Report of the Committee to Review the Adverse Consequences of Pertussis and Rubella Vaccines*. National Academies Press, 1991.
26. Edwards, K.M. y M.D. Decker, *Pertussis vaccines*, en *Vaccines*, S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, y P.A. Offit, Editors. 2008, Saunders/Elsevier: [Philadelphia, Pa.]. p. xvii, 1725 p.
27. Baker, J.P., *The pertussis vaccine controversy in Great Britain, 1974-1986*. Vaccine, 2003. **21**(25-26): p. 4003-10.
28. Sato, Y., M. Kimura, y H. Fukumi, *Development of a pertussis component vaccine in Japan*. Lancet, 1984. **1**(8369): p. 122-6.
29. Coutte, L., et al., *Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen*. J Exp Med, 2003. **197**(6): p. 735-42.
30. McGuirk, P. y K.H. Mills, *Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 415-22.
31. Mooi, F.R., et al., *Construction and analysis of Bordetella pertussis mutants defective in the production of fimbriae*. Microb Pathog, 1992. **12**(2): p. 127-35.
32. Mattoo, S., et al., *Mechanisms of Bordetella pathogenesis*. Front Biosci, 2001. **6**: p. E168-86.
33. King, A.J., et al., *Role of the polymorphic region 1 of the Bordetella pertussis protein pertactin in immunity*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 11): p. 2885-95.
34. Storsaeter, J., et al., *Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to Bordetella pertussis*. Vaccine, 1998. **16**(20): p. 1907-16.
35. Cherry, J.D., et al., *A search for serologic correlates of immunity to Bordetella pertussis cough illnesses*. Vaccine, 1998. **16**(20): p. 1901-6.
36. Finn, T.M. y L.A. Stevens, *Tracheal colonization factor: a Bordetella pertussis secreted virulence determinant*. Mol Microbiol, 1995. **16**(4): p. 625-34.
37. Elder, K.D. y E.T. Harvill, *Strain-dependent role of BrkA during Bordetella pertussis infection of the murine respiratory tract*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5919-24.
38. Pishko, E.J., et al., *Bordetella pertussis acquires resistance to complement-mediated killing in vivo*. Infect Immun, 2003. **71**(9): p. 4936-42.
39. Marr, N., et al., *Bordetella pertussis autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20585.
40. Munoz, J.J., et al., *Biological activities of crystalline pertussigen from Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1981. **33**(3): p. 820-6.
41. Cundell, D.R., et al., *Effect of tracheal cytotoxin from Bordetella pertussis on human neutrophil function in vitro*. Infect Immun, 1994. **62**(2): p. 639-43.

42. Harvill, E.T., et al., *Multiple roles for Bordetella lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 6720-8.
43. Carbonetti, N.H., *Immunomodulation in the pathogenesis of Bordetella pertussis infection and disease*. Curr Opin Pharmacol, 2007. **7**(3): p. 272-8.
44. Andreasen, C., D.A. Powell, y N.H. Carbonetti, *Pertussis toxin stimulates IL-17 production in response to Bordetella pertussis infection in mice*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7079.
45. Dunne, A., et al., *Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against Bordetella pertussis*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1711-9.
46. Anderson, R.M. y R.M. May, *Infectious diseases of humans : dynamics and control*. 1991, Oxford ; New York: Oxford University Press. viii, 757 p.
47. Locht, C., ed. *Bordetella Molecular Microbiology*. 1st ed. Phylogeny, Evolution and Epidemiology of Bordetellae., ed. H.Q. Mooi FR, Guiso N. 2007, Horizon Bioscience: Norfolk.
48. OMS. *Global burden of disease*. 2007; disponible en: http://www.who.int/entity/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html.
49. Barford, A. y D. Dorling, *The shape of the global causes of death*. Int J Health Geogr, 2007. **6**: p. 48.
50. OMS. *Incidence series*. Immuno preventable diseases incidence series 2010 15/12/2010; disponible en: http://www.who.int/entity/immunization_monitoring/data/incidence_series.xls.
51. Roush, S.W. y T.V. Murphy, *Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States*. JAMA, 2007. **298**(18): p. 2155-63.
52. Mattoo, S. y J.D. Cherry, *Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 326-82.
53. Guilfoile, P., *Whooping cough*. 2010, New York: Chelsea House. 108 p.
54. Cherry, J.D., *The present and future control of pertussis*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(6): p. 663-7.
55. Das, P., *Whooping cough makes global comeback*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(6): p. 322.
56. Cherry, J.D., et al., *Comparison of values of antibody to Bordetella pertussis antigens in young German and American men*. Clin Infect Dis, 1995. **20**(5): p. 1271-4.
57. Rendi-Wagner, P., et al., *The seroepidemiology of Bordetella pertussis in Israel--Estimate of incidence of infection*. Vaccine, 2010. **28**(19): p. 3285-90.
58. Okada, K., et al., *Seroepidemiologic study on pertussis, diphtheria, and tetanus in the Fukuoka area of southern Japan: seroprevalence among persons 0-80 years old and vaccination program*. Jpn J Infect Dis, 2004. **57**(2): p. 67-71.
59. Wang, C.Q. y Q.R. Zhu, *Seroprevalence of Bordetella pertussis Antibody in Children and Adolescents in China*. Pediatr Infect Dis J, 2011.
60. MSAL, *Coqueluche*, en *Boletín Semanal de Vigilancia*. 2010, Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación Argentina.
61. Riva Posse, C.M., I., *Evolución de la coqueluche en Argentina a finales del siglo XX*. MEDICINA (Buenos Aires), 2005. **65**: p. 7-16.
62. Hampl, S.D. y L.C. Olson, *Pertussis in the young infant*. Semin Respir Infect, 1995. **10**(1): p. 58-62.

63. MSAL. *Calendario Nacional de Vacunación*. 2009 [cited 2011; disponible en: <http://www.msal.gov.ar/htm/site/pdf/calendario-vac.pdf>].
64. Hozbor, D., et al., *Pertussis Epidemiology in Argentina Trends Over 2004-2007*. J Infect, 2009.
65. CDC, *Pertussis outbreak in an Amish community--Kent County, Delaware, September 2004-February 2005*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2006. **55**(30): p. 817-21.
66. CDC, *Pertussis outbreak in California*. Hum Vaccin, 2010. **6**(9).
67. Sin, M.A., et al., *Pertussis outbreak in primary and secondary schools in Ludwigslust, Germany demonstrating the role of waning immunity*. Pediatr Infect Dis J, 2009. **28**(3): p. 242-4.
68. Spokes, P.J., H.E. Quinn, y J.M. McAnulty, *Review of the 2008-2009 pertussis epidemic in NSW: notifications and hospitalisations*. N S W Public Health Bull, 2010. **21**(7-8): p. 167-73.
69. Torm, S., et al., *Pertussis outbreak in a basic school in Estonia: description, contributing factors and vaccine effectiveness*. Scand J Infect Dis, 2005. **37**(9): p. 664-8.
70. Berger, F., et al., *Investigation on a pertussis outbreak in a military school: risk factors and approach to vaccine efficacy*. Vaccine, 2010. **28**(32): p. 5147-52.
71. de Melker, H.E., et al., *Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine*. Emerg Infect Dis, 1997. **3**(2): p. 175-8.
72. Barret, A.S., et al., *Pertussis outbreak in northwest Ireland, January - June 2010*. Euro Surveill, 2010. **15**(35).
73. Kamano, H., et al., *Analysis of Bordetella pertussis agglutinin titers during an outbreak of pertussis at a university in Japan*. Jpn J Infect Dis, 2010. **63**(2): p. 108-12.
74. MSAL. *Epidemia de coqueluche. Provincia de Neuquén*. 2005; disponible en: http://www.msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES/boletines/Coqueluche_Neuqu%C3%A9n.pdf.
75. Wendelboe, A.M., et al., *Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination*. Pediatr Infect Dis J, 2005. **24**(5 Suppl): p. S58-61.
76. Lin, Y.C., et al., *Epidemiological shift in the prevalence of pertussis in Taiwan: implications for pertussis vaccination*. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 4): p. 533-7.
77. de Melker, H.E., et al., *Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data*. Emerg Infect Dis, 2000. **6**(4): p. 348-57.
78. Grgic-Vitek, M., I. Klavs, y A. Kraigher, *Re-emergence of pertussis in Slovenia: time to change immunization policy*. Vaccine, 2008. **26**(15): p. 1874-8.
79. Fabianova, K., C. Benes, y B. Kriz, *A steady rise in incidence of pertussis since nineties in the Czech Republic*. Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2010. **59**(1): p. 25-33.
80. Tanaka, M., et al., *Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999*. JAMA, 2003. **290**(22): p. 2968-75.
81. Brooks, D.A. y R. Clover, *Pertussis infection in the United States: role for vaccination of adolescents and adults*. J Am Board Fam Med, 2006. **19**(6): p. 603-11.
82. Hewlett, E.L. y K.M. Edwards, *Clinical practice. Pertussis--not just for kids*. N Engl J Med, 2005. **352**(12): p. 1215-22.
83. CDC. *Health, United States, 2010*. Infectious disease 2010; disponible en: [http://www.cdc.gov/nchs/data/10/10.pdf#044](http://www.cdc.gov/nchs/data/hus/10/10.pdf#044).
84. Celentano, L.P., et al., *Resurgence of pertussis in Europe*. Pediatr Infect Dis J, 2005. **24**(9): p. 761-5.

85. Quinn, H.E. y P.B. McIntyre, *Pertussis epidemiology in Australia over the decade 1995-2005--trends by region and age group*. *Commun Dis Intell*, 2007. **31**(2): p. 205-15.
86. Crespo, I., et al., *Epidemiology of pertussis in a country with high vaccination coverage*. *Vaccine*.
87. Mattos-Guaraldi, A.L., et al., *Diphtheria remains a threat to health in the developing world--an overview*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003. **98**(8): p. 987-93.
88. Greco, D., et al., *A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis*. *Progetto Pertosse Working Group*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(6): p. 341-8.
89. Gustafsson, L., et al., *A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(6): p. 349-55.
90. Olin, P., et al., *Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine*. *Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines*. *Lancet*, 1997. **350**(9091): p. 1569-77.
91. Trollfors, B., et al., *A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(16): p. 1045-50.
92. Mills, K.H., *Immunity to Bordetella pertussis*. *Microbes Infect*, 2001. **3**(8): p. 655-77.
93. Wharton, M., *Prevention of pertussis among adolescents by vaccination: taking action on what we know and acknowledging what we do not know*. *Clin Infect Dis*, 2004. **39**(1): p. 29-30.
94. Salmaso, S., *Pertussis vaccine schedules across Europe*. *Euro Surveill*, 2004(9): p. 70-71.
95. Guiso, N., et al., *The Global Pertussis Initiative: report from a round table meeting to discuss the epidemiology and detection of pertussis, Paris, France, 11-12 January 2010*. *Vaccine*, 2010. **29**(6): p. 1115-21.
96. Zepp, F., et al., *Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe*. *Lancet Infect Dis*, 2011. **11**(7): p. 557-70.
97. Willems, R.J., Mooi, F., *From whole cell to acellular vaccines*. *Rev Med Microbiol.*, 1996. **7**: p. 13-21.
98. Mooi, F.R., et al., *Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution*. *Infect Immun*, 1998. **66**(2): p. 670-5.
99. He, Q. y J. Mertsola, *Factors contributing to pertussis resurgence*. *Future Microbiol*, 2008. **3**: p. 329-39.
100. Parkhill, J., et al., *Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*, 2003. **35**(1): p. 32-40.
101. Preston, A., J. Parkhill, y D.J. Maskell, *The bordetellae: lessons from genomics*. *Nat Rev Microbiol*, 2004. **2**(5): p. 379-90.
102. Mooi, F.R., *Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen*. *Infect Genet Evol*, 2009. **10**(1): p. 36-49.
103. Bottero, D., *Bases moleculares para la prevención de una enfermedad causada por Bordetella pertussis, un patógeno re emergente.*, en *Facultad de Ciencias Exactas*. 2010, UNLP: La Plata. p. 173pp.
104. Gaillard, M.E., *Genómica Funcional de Bordetella pertussis, implicancias sobre una enfermedad considerada reemergente.*, en *Facultad de Ciencias Exactas*. 2009, UNLP: La Plata. p. 139pp.

105. Njamkepo, E., et al., *Genomic analysis and comparison of Bordetella pertussis isolates circulating in low and high vaccine coverage areas*. Microbes Infect, 2008. **10**(14-15): p. 1582-6.
106. Mastrantonio, P., et al., *Antigenic variants in Bordetella pertussis strains isolated from vaccinated and unvaccinated children*. Microbiology, 1999. **145 (Pt 8)**: p. 2069-75.
107. Bottero, D., et al., *Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical Bordetella pertussis strains*. Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(11): p. 1490-8.
108. Gzyl, A., et al., *Sequence variation in pertussis S1 subunit toxin and pertussis genes in Bordetella pertussis strains used for the whole-cell pertussis vaccine produced in Poland since 1960: efficiency of the DTwP vaccine-induced immunity against currently circulating B. pertussis isolates*. Vaccine, 2004. **22**(17-18): p. 2122-8.
109. Watanabe, M., et al., *Efficacy of pertussis components in an acellular vaccine, as assessed in a murine model of respiratory infection and a murine intracerebral challenge model*. Vaccine, 2002. **20**(9-10): p. 1429-34.
110. Komatsu, E., et al., *Synergic effect of genotype changes in pertussis toxin and pertactin on adaptation to an acellular pertussis vaccine in the murine intranasal challenge model*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(5): p. 807-12.
111. Lipsitch, M. y J.J. O'Hagan, *Patterns of antigenic diversity and the mechanisms that maintain them*. J R Soc Interface, 2007. **4**(16): p. 787-802.
112. Bouchez, V., et al., *First report and detailed characterization of B. pertussis isolates not expressing pertussis toxin or pertactin*. Vaccine, 2009.
113. Mooi, F.R., et al., *Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(8): p. 1206-13.
114. Feunou, P.F., et al., *Long-term immunity against pertussis induced by a single nasal administration of live attenuated B. pertussis BPZE1*. Vaccine, 2010. **28**(43): p. 7047-53.
115. Murphy, T.V., et al., *Prevention of pertussis, tetanus, and diphtheria among pregnant and postpartum women and their infants recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*. MMWR Recomm Rep, 2008. **57**(RR-4): p. 1-51.
116. Adu-Bobie, J., et al., *Two years into reverse vaccinology*. Vaccine, 2003. **21**(7-8): p. 605-10.
117. Grandi, G. y ebrary Inc., *Genomics, proteomics, and vaccines*, en ebrary Electronic Books. 2004, Wiley: Chichester ; Hoboken, NJ. p. xxi, 313 p.
118. Rappuoli, R., *Reverse vaccinology*. Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(5): p. 445-50.
119. Rappuoli, R., *Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development*. Vaccine, 2001. **19**(17-19): p. 2688-91.
120. Mora, M., et al., *Reverse vaccinology*. Drug Discov Today, 2003. **8**(10): p. 459-64.
121. Hamstra, H.J., et al., *The purification and protective capacity of Bordetella pertussis outer membrane proteins*. Vaccine, 1995. **13**(8): p. 747-52.
122. Pizza, M., et al., *Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing*. Science, 2000. **287**(5459): p. 1816-20.
123. Christensen, H., et al., *Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2010. **10**(12): p. 853-61.
124. Borrow, R., P. Balmer, y E. Miller, *Meningococcal surrogates of protection--serum bactericidal antibody activity*. Vaccine, 2005. **23**(17-18): p. 2222-7.

125. Rappuoli, R., G. Dougan, y I. Delany, *Developing vaccines in the era of reverse vaccinology.*, en *New generation vaccines*, M.M. Levine, Editor. 2010, Taylor & Francis: New York, London. p. xiii, 1117 p.
126. Wizemann, T.M., et al., *Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against Streptococcus pneumoniae infection.* Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1593-8.
127. Ariel, N., et al., *Search for potential vaccine candidate open reading frames in the Bacillus anthracis virulence plasmid pXO1: in silico and in vitro screening.* Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6817-27.
128. Maione, D., et al., *Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen.* Science, 2005. **309**(5731): p. 148-50.
129. Yang, H.L., et al., *In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against Leptospira interrogans.* BMC Genomics, 2006. **7**: p. 293.
130. Liu, L., et al., *Identification and experimental verification of protective antigens against Streptococcus suis serotype 2 based on genome sequence analysis.* Curr Microbiol, 2009. **58**(1): p. 11-7.
131. Song, Y., et al., *A reverse vaccinology approach to swine dysentery vaccine development.* Vet Microbiol, 2009. **137**(1-2): p. 111-9.
132. Gamberini, M., et al., *Whole-genome analysis of Leptospira interrogans to identify potential vaccine candidates against leptospirosis.* FEMS Microbiol Lett, 2005. **244**(2): p. 305-13.
133. Ross, B.C., et al., *Identification of vaccine candidate antigens from a genomic analysis of Porphyromonas gingivalis.* Vaccine, 2001. **19**(30): p. 4135-42.
134. Montigiani, S., et al., *Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae.* Infect Immun, 2002. **70**(1): p. 368-79.
135. Tettelin, H., et al., *Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V Streptococcus agalactiae.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12391-6.
136. Zhu, Y.Z., et al., *Gene expression profiling-based in silico approach to identify potential vaccine candidates and drug targets against B. pertussis and B. parapertussis.* OMICS, 2008. **12**(3): p. 161-9.
137. Moriel, D.G., et al., *Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic Escherichia coli.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(20): p. 9072-7.
138. Ge, X., et al., *Pooled protein immunization for identification of cell surface antigens in Streptococcus sanguinis.* PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11666.
139. Hong, M., et al., *Identification of novel immunogenic proteins in pathogenic Haemophilus parasuis based on genome sequence analysis.* Vet Microbiol, 2010. **148**(1): p. 89-92.
140. Manque, P.A., et al., *Identification and immunological characterization of three potential vaccinogens against Cryptosporidium.* Clin Vaccine Immunol, 2011.
141. Janeway, C., *Immunobiology : the immune system in health and disease.* 6th ed. 2005, New York: Garland Science. xxiii, 823 p.
142. Szein, M., R. Ahmed, y S. Crotty, *Recent advances in Immunology that impact vaccine development*, en *New generation vaccines*, M.M. Levine, Editor. 2010, Taylor & Francis: New York, London. p. xiii, 1117 p.

143. Tettelin, H., et al., *Genome analysis of multiple pathogenic isolates of Streptococcus agalactiae: implications for the microbial "pan-genome"*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13950-5.
144. Gaillard, M.E., et al., *Laboratory adaptation of Bordetella pertussis is associated with the loss of Type Three Secretion System functionality*. Infect Immun, 2011.
145. Hallander, H.O., *Microbiological and serological diagnosis of pertussis*. Clin Infect Dis, 1999. **28 Suppl 2**: p. S99-106.
146. Mills, K.H., et al., *A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1998. **66**(2): p. 594-602.
147. Hertz-Fowler, C., et al., *GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D339-43.
148. Apweiler, R., et al., *UniProt: the Universal Protein knowledgebase*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D115-9.
149. Riley, M., *Functions of the gene products of Escherichia coli*. Microbiol Rev, 1993. **57**(4): p. 862-952.
150. Brinig, M.M., et al., *Significant gene order and expression differences in Bordetella pertussis despite limited gene content variation*. J Bacteriol, 2006. **188**(7): p. 2375-82.
151. Cummings, C.A., et al., *Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by Bordetella BvgAS*. J Bacteriol, 2006. **188**(5): p. 1775-85.
152. Hot, D., et al., *Differential modulation of Bordetella pertussis virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis*. Mol Genet Genomics, 2003. **269**(4): p. 475-86.
153. Nakamura, M.M., et al., *Growth phase- and nutrient limitation-associated transcript abundance regulation in Bordetella pertussis*. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5537-48.
154. Melton, A.R. y A.A. Weiss, *Environmental regulation of expression of virulence determinants in Bordetella pertussis*. J Bacteriol, 1989. **171**(11): p. 6206-12.
155. Weiss, A.A., et al., *Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in Bordetella pertussis vir-regulated genes*. Infect Immun, 1989. **57**(9): p. 2674-82.
156. Cotter, P.A. y J.F. Miller, *BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of Bordetella bronchiseptica in a rabbit model*. Infect Immun, 1994. **62**(8): p. 3381-90.
157. Martinez de Tejada, G., et al., *Neither the Bvg- phase nor the vrg6 locus of Bordetella pertussis is required for respiratory infection in mice*. Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2762-8.
158. Cotter, P.A. y J.F. Miller, *Bordetella*, en *Principles of bacterial pathogenesis*, G. EA, Editor. 2001, Academic Press: San Diego. p. 620-674.
159. Bouchez, V., et al., *Genomic content of Bordetella pertussis clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination*. PLoS ONE, 2008. **3**(6): p. e2437.
160. Caro, V., et al., *Temporal analysis of French Bordetella pertussis isolates by comparative whole-genome hybridization*. Microbes Infect, 2006. **8**(8): p. 2228-35.
161. Heikkinen, E., et al., *Comparative genomics of Bordetella pertussis reveals progressive gene loss in Finnish strains*. PLoS ONE, 2007. **2**(9): p. e904.
162. King, A.J., et al., *Comparative genomic profiling of Dutch clinical Bordetella pertussis isolates using DNA microarrays: identification of genes absent from epidemic strains*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 311.

163. King, A.J., et al., *Changes in the genomic content of circulating Bordetella pertussis strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift?* BMC Genomics, 2010. **11**: p. 64.
164. Bhasin, M., A. Garg, y G.P. Raghava, *PSLpred: prediction of subcellular localization of bacterial proteins*. Bioinformatics, 2005. **21**(10): p. 2522-4.
165. Sarada, D., et al., *pSLIP: SVM based protein subcellular localization prediction using multiple physicochemical properties*. BMC Bioinformatics, 2005. **6**: p. 152.
166. Hoglund, A., et al., *MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition*. Bioinformatics, 2006. **22**(10): p. 1158-65.
167. Petsalaki, E.I., et al., *PredSL: a tool for the N-terminal sequence-based prediction of protein subcellular localization*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2006. **4**(1): p. 48-55.
168. Su, C.Y., et al., *Protein subcellular localization prediction based on compartment-specific biological features*. Comput Syst Bioinformatics Conf, 2006: p. 325-30.
169. Shatkay, H., et al., *SherLoc: high-accuracy prediction of protein subcellular localization by integrating text and protein sequence data*. Bioinformatics, 2007. **23**(11): p. 1410-7.
170. Shen, Y.Q. y G. Burger, *'Unite and conquer': enhanced prediction of protein subcellular localization by integrating multiple specialized tools*. BMC Bioinformatics, 2007. **8**: p. 420.
171. Shi, J.Y., et al., *Prediction of protein subcellular localization by support vector machines using multi-scale energy and pseudo amino acid composition*. Amino Acids, 2007. **33**(1): p. 69-74.
172. Su, E.C., et al., *Protein subcellular localization prediction based on compartment-specific features and structure conservation*. BMC Bioinformatics, 2007. **8**: p. 330.
173. Wang, Z., et al., *Fast Fourier transform-based support vector machine for subcellular localization prediction using different substitution models*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2007. **39**(9): p. 715-21.
174. Chang, J.M., et al., *PSLDoc: Protein subcellular localization prediction based on gapped-dipeptides and probabilistic latent semantic analysis*. Proteins, 2008. **72**(2): p. 693-710.
175. Yu, C.S., et al., *Prediction of protein subcellular localization*. Proteins, 2006. **64**(3): p. 643-51.
176. Billion, A., et al., *Augur--a computational pipeline for whole genome microbial surface protein prediction and classification*. Bioinformatics, 2006. **22**(22): p. 2819-20.
177. Gardy, J.L., et al., *PSORT-B: Improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3613-7.
178. Gardy, J.L., et al., *PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis*. Bioinformatics, 2005. **21**(5): p. 617-23.
179. Szafron, D., et al., *Proteome Analyst: custom predictions with explanations in a web-based tool for high-throughput proteome annotations*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W365-71.
180. Gardy, J.L. y F.S. Brinkman, *Methods for predicting bacterial protein subcellular localization*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(10): p. 741-51.

181. Yu, N.Y., et al., *PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes*. Bioinformatics, 2010. **26**(13): p. 1608-15.
182. Yu, N.Y., et al., *PSORTdb--an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea*. Nucleic Acids Res, 2010. **39**(Database issue): p. D241-4.
183. Rey, S., et al., *PSORTdb: a protein subcellular localization database for bacteria*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Database issue): p. D164-8.
184. Medini, D., et al., *The microbial pan-genome*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(6): p. 589-94.
185. Cummings, C.A., et al., *Bordetella species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation*. J Bacteriol, 2004. **186**(5): p. 1484-92.
186. Smith, J.M., et al., *How clonal are bacteria?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4384-8.
187. Buboltz, A.M., et al., *Evidence for horizontal gene transfer of two antigenically distinct O antigens in Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun, 2009. **77**(8): p. 3249-57.
188. Caro, V., V. Bouchez, y N. Guiso, *Is the Sequenced Bordetella pertussis strain Tohama I representative of the species?* J Clin Microbiol, 2008. **46**(6): p. 2125-8.
189. Brickman, T.J., M.T. Anderson, y S.K. Armstrong, *Bordetella iron transport and virulence*. Biometals, 2007. **20**(3-4): p. 303-22.
190. Zhang, S., et al., *Complete genome sequence of B. pertussis CS, Chinese pertussis vaccine strain*. J Bacteriol.
191. Davies, M.N. y D.R. Flower, *Computational epitope mapping*, en *Infectious disease informatics*, V. Sintchenko, Editor. 2010, Springer: New York. p. xii, 434 p.
192. Donnes, P. y A. Elofsson, *Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC*. BMC Bioinformatics, 2002. **3**: p. 25.
193. Nielsen, M., et al., *Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach*. Bioinformatics, 2004. **20**(9): p. 1388-97.
194. Reche, P.A., J.P. Glutting, y E.L. Reinherz, *Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs*. Hum Immunol, 2002. **63**(9): p. 701-9.
195. Rammensee, H., et al., *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
196. Guan, P., et al., *MHCPred 2.0: an updated quantitative T-cell epitope prediction server*. Appl Bioinformatics, 2006. **5**(1): p. 55-61.
197. Jung, G., et al., *From combinatorial libraries to MHC ligand motifs, T-cell superagonists and antagonists*. Biologicals, 2001. **29**(3-4): p. 179-81.
198. Balbás, P. y A. Lorence, eds. *Recombinant gene expression protocols. 2nd Edition.*, ed. M.i.m. biology. 2004, Humana Press: Totowa, N.J. xx, 493 p.
199. Invitrogen, *pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits*. 2006.
200. Rozen, S. y H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
201. Invitrogen, *Gateway® pENTR™ Vectors Manual*. 2004.
202. Invitrogen, *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits*. 2006.
203. Studier, F.W. y B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.

204. E. Hochuli, W.B., H. Döbeli, R. Gentz & D. Stüber, *Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent*. Nature Biotechnology, 1988. **6**: p. 1321-1325.
205. Crowe, J., et al., *6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification*. Methods Mol Biol, 1994. **31**: p. 371-87.
206. Plotkin, S.A., *Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(3): p. 401-9.
207. Kaufmann, S.H.E., ed. *Novel vaccination strategies*. 2004, Wiley.
208. Sato, H. y Y. Sato, *Relationship between structure and biological and protective activities of pertussis toxin*. Dev Biol Stand, 1991. **73**: p. 121-32.
209. Fernandez, R.C. y A.A. Weiss, *Cloning and sequencing of a Bordetella pertussis serum resistance locus*. Infect Immun, 1994. **62**(11): p. 4727-38.
210. Hewlett, E.L., G.M. Donato, y M.C. Gray, *Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis: more than just making cyclic AMP!* Mol Microbiol, 2006. **59**(2): p. 447-59.
211. Wardlaw, A.C. y R. Parton, *Pathogenesis and immunity in pertussis*. 1988, Chichester ; New York: Wiley. xxiv, 482 p.
212. Lamberti, Y.A., et al., *Intracellular trafficking of Bordetella pertussis in human macrophages*. Infect Immun. **78**(3): p. 907-13.
213. Canthaboo, C., et al., *Investigation of cellular and humoral immune responses to whole cell and acellular pertussis vaccines*. Vaccine, 2000. **19**(6): p. 637-43.
214. Bettelli, K.T., Oukka M. & Kuchroo V.K., *Induction and effector functions of TH17 cells*. Nature Reviews, 2008. **453**: p. 1051-1057.
215. Higgins, S.C., et al., *TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis: role of IL-17-producing T cells*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7980-9.
216. Higgins, S.C., et al., *Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to Bordetella pertussis by inhibiting inflammatory pathology*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3119-27.
217. Ryan, M., et al., *Bordetella pertussis respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells*. J Infect Dis, 1997. **175**(5): p. 1246-50.
218. Ausiello, C.M., et al., *Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines*. Infect Immun, 1997. **65**(6): p. 2168-74.
219. Ryan, M., et al., *Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children*. Immunology, 1998. **93**(1): p. 1-10.
220. Vermeulen, F., et al., *Cellular immune responses of preterm infants after vaccination with whole-cell or acellular pertussis vaccines*. Clin Vaccine Immunol, 2009. **17**(2): p. 258-62.
221. Rieber, N., et al., *Acellular pertussis booster in adolescents induces Th1 and memory CD8 T cell immune response*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17271.
222. Brereton, C.F., et al., *Escherichia coli heat-labile enterotoxin promotes protective Th17 responses against infection by driving innate IL-1 and IL-23 production*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5896-906.
223. Gracia, A., et al., *Antibody responses in adult and neonatal BALB/c mice to immunization with novel Bordetella pertussis vaccine formulations*. Vaccine, 2011. **29**(8): p. 1595-604.

224. Anwar, H., *Surface-exposed antibody-accessible outer membrane proteins of Bordetella pertussis*. Can J Microbiol, 1991. **37**(8): p. 590-3.
225. Hellwig, S.M., et al., *Crucial role of antibodies to pertactin in Bordetella pertussis immunity*. J Infect Dis, 2003. **188**(5): p. 738-42.
226. Calver, G.A., *Acellular pertussis vaccines: neutralization by immune sera of the lethality of pertussis toxin and viable Bordetella pertussis for chick embryos*. Biologicals, 1999. **27**(2): p. 143-7.
227. Barnes, M.G. y A.A. Weiss, *BrkA protein of Bordetella pertussis inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition*. Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 3067-72.
228. Mooi, F.R. y S.C. de Greeff, *The case for maternal vaccination against pertussis*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(9): p. 614-24.
229. Leef, M., et al., *Protective immunity to Bordetella pertussis requires both B cells and CD4(+) T cells for key functions other than specific antibody production*. J Exp Med, 2000. **191**(11): p. 1841-52.
230. Shahin, R., et al., *Adjuvanticity and protective immunity elicited by Bordetella pertussis antigens encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres*. Infect Immun, 1995. **63**(4): p. 1195-200.
231. Kirimanjeswara, G.S., P.B. Mann, y E.T. Harvill, *Role of antibodies in immunity to Bordetella infections*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 1719-24.
232. Feunou, P.F., J. Bertout, y C. Loch, *T- and B-cell-mediated protection induced by novel, live attenuated pertussis vaccine in mice. Cross protection against parapertussis*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10178.
233. Huang, C.C., et al., *Experimental Whooping cough*. N Engl J Med, 1962. **266**: p. 105-11.
234. Sato, Y., et al., *Role of antibody to leukocytosis-promoting factor hemagglutinin and to filamentous hemagglutinin in immunity to pertussis*. Infect Immun, 1981. **31**(3): p. 1223-31.
235. Sato, H., et al., *Monoclonal antibody against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infections*. Infect Immun, 1984. **46**(2): p. 422-8.
236. Sato, H. y Y. Sato, *Protective antigens of Bordetella pertussis mouse-protection test against intracerebral and aerosol challenge of B. pertussis*. Dev Biol Stand, 1985. **61**: p. 461-7.
237. Oda, M., et al., *Antibodies to Bordetella pertussis in human colostrum and their protective activity against aerosol infection of mice*. Infect Immun, 1985. **47**(2): p. 441-5.
238. Kimura, A., et al., *Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model*. Infect Immun, 1990. **58**(1): p. 7-16.
239. Olander, R.M., et al., *Serum antibody response to B. pertussis Tn5 mutants, purified PT and FHA in two different mouse strains and passive protection in the murine intranasal infection model*. Microb Pathog, 1990. **8**(1): p. 37-45.
240. Shahin, R.D., et al., *Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kD outer membrane protein of Bordetella pertussis*. J Exp Med, 1990. **171**(1): p. 63-73.
241. Hellwig, S.M., et al., *Targeting to Fc gamma receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of Bordetella pertussis*. J Infect Dis, 2001. **183**(6): p. 871-9.
242. Granstrom, M., et al., *Specific immunoglobulin for treatment of whooping cough*. Lancet, 1991. **338**(8777): p. 1230-3.

243. Simondon, F., et al., *A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal*. *Vaccine*, 1997. **15**(15): p. 1606-12.
244. Taranger, J., et al., *Correlation between pertussis toxin IgG antibodies in postvaccination sera and subsequent protection against pertussis*. *J Infect Dis*, 2000. **181**(3): p. 1010-3.
245. Healy, C.M. y C.J. Baker, *Prospects for prevention of childhood infections by maternal immunization*. *Curr Opin Infect Dis*, 2006. **19**(3): p. 271-6.
246. Oda, M., et al., *Transplacental and transcolostral immunity to pertussis in a mouse model using acellular pertussis vaccine*. *J Infect Dis*, 1983. **148**(1): p. 138-45.
247. Cohen, P. y S.J. Scadron, *The effects of active immunization of the mother upon the offspring*. *J Pediatr*, 1946. **29**(5): p. 609-19.
248. Guiso, N., et al., *What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011. **30**(3): p. 307-12.
249. Giuliano, M., et al., *Antibody responses and persistence in the two years after immunization with two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis*. *J Pediatr*, 1998. **132**(6): p. 983-8.
250. Esposito, S., et al., *Long-term pertussis-specific immunity after primary vaccination with a combined diphtheria, tetanus, tricomponent acellular pertussis, and hepatitis B vaccine in comparison with that after natural infection*. *Infect Immun*, 2001. **69**(7): p. 4516-20.
251. Tozzi, A.E., et al., *Diagnosis and management of pertussis*. *CMAJ*, 2005. **172**(4): p. 509-15.
252. de Greeff, S.C., et al., *Seroprevalence of pertussis in The Netherlands: evidence for increased circulation of *Bordetella pertussis**. *PLoS ONE*, 2010. **5**(12): p. e14183.
253. Dalby, T., Z.B. Harboe, y K.A. Krogfelt, *Seroprevalence of pertussis among Danish patients with cough of unknown etiology*. *Clin Vaccine Immunol*, 2010. **17**(12): p. 2016-23.
254. Wang, C.Q. y Q.R. Zhu, *Seroprevalence of *Bordetella pertussis* Antibody in Children and Adolescents in China*. *Pediatr Infect Dis J*, 2011. **30**(7): p. 593-6.
255. Lasserre, A., et al., *Pertussis incidence among adolescents and adults surveyed in general practices in the Paris area, France, May 2008 to March 2009*. *Euro Surveill*, 2011. **16**(5).
256. Relyveld, E., et al., *Determination of circulating antibodies directed to pertussis toxin and of agglutinogens in children vaccinated with either the whole cell or component pertussis vaccine in France, Japan and Senegal*. *Vaccine*, 1991. **9**(11): p. 843-50.
257. Cherry, J.D., et al., *Antibody response patterns to *Bordetella pertussis* antigens in vaccinated (primed) and unvaccinated (unprimed) young children with pertussis*. *Clin Vaccine Immunol*, 2010. **17**(5): p. 741-7.
258. Finn, R.D., et al., *The Pfam protein families database*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(Database issue): p. D211-22.
259. Davidson, A.L. y J. Chen, *ATP-binding cassette transporters in bacteria*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 241-68.
260. Walshaw, D.L. y P.S. Poole, *The general L-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that also influences efflux of solutes*. *Mol Microbiol*, 1996. **21**(6): p. 1239-52.

261. Tefon, B.E., et al., *A comprehensive analysis of Bordetella pertussis surface proteome and identification of new immunogenic proteins*. Vaccine, 2011. **29**(19): p. 3583-95.
262. Zhu, Y.Z., et al., *Immunoproteomic analysis of human serological antibody responses to vaccination with whole-cell pertussis vaccine (WCV)*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13915.
263. Garmory, H.S. y R.W. Titball, *ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 6757-63.
264. Hughes, M.J., et al., *Novel protein vaccine candidates against Group B streptococcal infection identified using alkaline phosphatase fusions*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **222**(2): p. 263-71.
265. Tanghe, A., et al., *Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors*. J Immunol, 1999. **162**(2): p. 1113-9.
266. Teixeira-Gomes, A.P., et al., *Identification and characterization of Brucella ovis immunogenic proteins using two-dimensional electrophoresis and immunoblotting*. Electrophoresis, 1997. **18**(8): p. 1491-7.
267. Trakhanov, S., et al., *Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the Escherichia coli ABC leucine/isoleucine/valine transport system: trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity*. Biochemistry, 2005. **44**(17): p. 6597-608.
268. Basavanna, S., et al., *Screening of Streptococcus pneumoniae ABC transporter mutants demonstrates that LivJHMGF, a branched-chain amino acid ABC transporter, is necessary for disease pathogenesis*. Infect Immun, 2009. **77**(8): p. 3412-23.
269. Molzen, T.E., et al., *Genome-wide identification of Streptococcus pneumoniae genes essential for bacterial replication during experimental meningitis*. Infect Immun, 2010. **79**(1): p. 288-97.
270. Ito, K. y K. Inaba, *The disulfide bond formation (Dsb) system*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(4): p. 450-8.
271. Tala, A., et al., *Reverse transcriptase-PCR differential display analysis of meningococcal transcripts during infection of human cells: up-regulation of priA and its role in intracellular replication*. BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 131.
272. Pannekoek, Y., et al., *Immunogenicity of the meningococcal stress protein MSP63 during natural infection*. Clin Exp Immunol, 1993. **93**(3): p. 377-81.
273. Paliwal, P.K., et al., *Cloning, expression and characterization of heat shock protein 60 (groEL) of Salmonella enterica serovar Typhi and its role in protective immunity against lethal Salmonella infection in mice*. Clin Immunol, 2008. **126**(1): p. 89-96.
274. Khan, M.N., et al., *Immunogenicity and protective efficacy of GroEL (hsp60) of Streptococcus pneumoniae against lethal infection in mice*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009. **56**(1): p. 56-62.
275. Roberts, R., et al., *Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis*. Vaccine, 2008. **26**(36): p. 4639-46.
276. Vidakovics, M.L., et al., *Profiling the Bordetella pertussis proteome during iron starvation*. J Proteome Res, 2007. **6**(7): p. 2518-28.
277. Altindis, E., et al., *Immunoproteomic analysis of Bordetella pertussis and identification of new immunogenic proteins*. Vaccine, 2009. **27**(4): p. 542-8.

278. Cainelli Gebara, V.C., et al., *Adjuvant and immunogenic activities of the 73kDa N-terminal alpha-domain of BrkA autotransporter and Cpn60/60kDa chaperonin of Bordetella pertussis*. Vaccine, 2007. **25**(4): p. 621-9.
279. Finn, T.M., Z. Li, y E. Kocsis, *Identification of a Bordetella pertussis bvg-regulated porin-like protein*. J Bacteriol, 1995. **177**(3): p. 805-9.
280. Nikaido, H., *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(4): p. 593-656.
281. Li, Z.M., et al., *Cloning and sequencing of the structural gene for the porin protein of Bordetella pertussis*. Mol Microbiol, 1991. **5**(7): p. 1649-56.
282. Poolman, J.T., et al., *Outer membrane vesicles of Bordetella pertussis are protective antigens in the mouse intracerebral challenge model*. , en *Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis*. , M.C. R, Editor. 1990, Department of Health and Human Services; 1990. : Bethesda. p. pp. 148–155.
283. Walton, T.A. y M.C. Sousa, *Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation*. Mol Cell, 2004. **15**(3): p. 367-74.
284. Walton, T.A., et al., *The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1772-7.
285. Yoder-Himes, D.R., K.T. Konstantinidis, y J.M. Tiedje, *Identification of potential therapeutic targets for Burkholderia cenocepacia by comparative transcriptomics*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8724.
286. Chen, R.T., et al., *Measles antibody: reevaluation of protective titers*. J Infect Dis, 1990. **162**(5): p. 1036-42.
287. Elahi, S., J. Holmstrom, y V. Gerdts, *The benefits of using diverse animal models for studying pertussis*. Trends Microbiol, 2007. **15**(10): p. 462-8.
288. OMS. *Final report on DTP manual*. 2006; disponible en: <http://www.who.int/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/dtp/DTP%20Manual%20Final%20Report%20on%20DTP%20Manual.pdf>.
289. Gzyl, A., et al., *Potency of pertussis component in the DTP vaccine--an overview of three decade study in Poland*. Biologicals, 2004. **32**(3): p. 129-37.
290. Guiso, N., et al., *Intranasal murine model of Bordetella pertussis infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines*. Vaccine, 1999. **17**(19): p. 2366-76.
291. Mills, K.H., et al., *A respiratory challenge model for infection with Bordetella pertussis: application in the assessment of pertussis vaccine potency and in defining the mechanism of protective immunity*. Dev Biol Stand, 1998. **95**: p. 31-41.
292. Dolby, J.M., D.C. Thow, y A.F. Standfast, *The intranasal infection of mice with Bordetella pertussis*. J Hyg (Lond), 1961. **59**: p. 191-204.
293. Xing, D.K., et al., *An aerosol challenge model of Bordetella pertussis infection as a potential bioassay for acellular pertussis vaccines*. Vaccine, 1999. **17**(6): p. 565-76.
294. Oda, M., et al., *Protective activities of the filamentous hemagglutinin and the lymphocytosis-promoting factor of Bordetella pertussis in mice*. J Infect Dis, 1984. **150**(6): p. 823-33.
295. Jones, D.H., et al., *Protection of mice from Bordetella pertussis respiratory infection using microencapsulated pertussis fimbriae*. Vaccine, 1995. **13**(7): p. 675-81.

296. Cahill, E.S., et al., *Immune responses and protection against Bordetella pertussis infection after intranasal immunization of mice with filamentous haemagglutinin in solution or incorporated in biodegradable microparticles*. *Vaccine*, 1995. **13**(5): p. 455-62.
297. Xu, Y., et al., *Production and characterization of recombinant pertactin, fimbriae 2 and fimbriae 3 from Bordetella pertussis*. *BMC Microbiol*, 2009. **9**: p. 274.
298. Marr, N., et al., *Protective activity of the Bordetella pertussis BrkA autotransporter in the murine lung colonization model*. *Vaccine*, 2008.
299. Rappuoli, R., *Bridging the knowledge gaps in vaccine design*. *Nat Biotechnol*, 2007. **25**(12): p. 1361-6.
300. Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
301. Hanahan, D., J. Jessee, y F.R. Bloom, *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria*. *Methods Enzymol*, 1991. **204**: p. 63-113.
302. OpenWetWare. *Top 10 chemically competent cells*. wiki 2009 [cited 2009 8/2/2009]; disponible en: http://openwetware.org/wiki/Top10_chemically_competent_cells.
303. Invitrogen, *Ni-NTA Purification System for purification of polyhistidine-containing recombinant proteins*. 2006. p. 32.
304. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
305. Qiagen, *The QIAexpressionist™*, en *A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*. 2003. p. 128.

