

TESIS
DOCTORAL
2014

*PROTEÍNAS RECOMBINANTES
ÚTILES PARA LA PREVENCIÓN
DE LA INFECCIÓN POR
BORDETELLA PERTUSSIS*

Lic. María Noelia Olivera

Director: Ricardo M. Gómez

Co-Directora: Daniela F. Hozbor



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



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de
Ciencias Exactas

Proteínas recombinantes útiles para la prevención de la
infección por *Bordetella pertussis*.

Lic. María Noelia Olivera

Director:

Co-Directora:

Ricardo M. Gómez

Daniela Hozbor

AÑO 2014

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 (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata – CCT – La Plata – CONICET, bajo la dirección del Dr. Ricardo M. Gómez y la co-dirección de la Dra. Daniela Hozbor.

A mamá y papá:

A ella por ayudarme a recorrer el camino acá abajo.

A él por guiarme desde arriba.

Reconocimiento

Mi reconocimiento a la Universidad Nacional de Quilmes por haberme formado durante mi carrera de grado.

A la Universidad Nacional de La Plata, a la Facultad de Ciencias Exactas y al IBBM, por brindarme el ámbito para realizar mis estudios de posgrado.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por financiar la iniciación del presente trabajo y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por permitirme finalizarlo.

Agradecimientos

Hace más de un año que me fui del IBBM y no tengo más que hermosos recuerdos de ese lugar y su gente.

Quiero agradecer en primer lugar a mi director, el **Dr. Ricardo M. Gómez**, por haberme elegido para la beca de ANPCyT. Por hacerme sentir cómoda en todo momento para que mi estadía en VA sea más que grata. Por darme libertad para decidir qué camino tomar. Por bancarse mis cargadas cuando Independiente salió campeón de la Sudamericana y por no gastarme cuando se fue a la B! Por los chizitos y papas fritas de todos los días. Por presionarme para que ponga "un pie en el acelerador" para escribir la tesis cuando me fui de VA. Por apoyarme en situaciones críticas. Por su confianza. Gracias Jefe!

A la **Dra. Daniela F. Hozbor**, por ayudarme en todo momento aún antes de ser mi co-directora. Por introducirme al mundo de *Bordetella*. Por empujarme para adelante y ser didáctica siempre. Por su valiosa ayuda y aportes en la escritura de mi Tesis. Por ver siempre el vaso medio lleno. Por la paciencia. Gracias Dani!

Al **Dr. Víctor Romanowski** por permitirme trabajar en su laboratorio y porque parte de mi formación académica se la debo a él.

Al **Dr. Martín Rumbo** por su buena predisposición para aclarar mis dudas inmunológicas.

A **Katy, Gisela, Paula, Silvana, Abel y Bernabé**: porque todos de distinta forma formaron parte de mi estadía en el IBBM.

A la **Dra. María Emilia Gaillard**, por haberme entrenado en mi encuentro con los ratones. Por ayudarme a preparar de manera impecable los experimentos. Por ayudarme con las cepas, por la Bsp22! Por su buena onda y paciencia.

A la **Dra. Celina Castuma** por haber trabajado conmigo codo a codo en mi última etapa experimental con la CTB-Fim2. Por su buena predisposición y ayuda.

Al resto de los Bordetellos que de alguna forma u otra han tenido que padecer algún pedido mio! Gracias!

A **mi lugar en el IBBM, VA**. Porque además de ser compañeros a muchos los siento amigos. Por ayudarme siempre, por bancar mis guasadas, malos humores. Por escuchar mis desahogos laborales y personales. Por alegrarse con mis logros. Por ser un grupo laboral hermoso e inolvidable.

A los más viejos: **la Chancha** por su amistad y generosidad. Al **Colorado** por instruirme cuando entré y hacer mi trabajo más divertido. Al **Gordi** por ser él y hacerme reír siempre! A **Fer** por la buena onda. A **Javi** por mi apodo, Mandi! Y viva Perón! Jaja!

A los que transitaron conmigo el doc:

A **Santi** por darme una mano siempre que la necesité. Por los "Uhhh" y por los alfajores de maicena. Por ayudarme con la estrategia de clonado de la Bfr, aunque al final no la usé! Haase sos un botoooón!! 🎵 🎵 🎵

A **Flor** por el anti-IgA que me salvó las papas! Por responder todas mis dudas. Por ser buena compañera.

A **Emi** porque fue la última incorporación en VA durante mi estadía pero se ganó enseguida un lugarcito en mi corazón... Por ser la que continúe con mi "legado".

A **Jesi** por su paciencia y dulzura.

A **Lucre** porque a pesar de ser una nena para mi, demostró ser una grande infinidad de veces. Me hacés reír mucho, sos grossa chiquita!

A **Gabi**... Ay, Gabriela... por confiar en mi desde el principio, por hacerme divertir tanto. Por la paciencia durante todo el tiempo que compartimos el trabajo de Rb6. Por nuestro hitazo "Batida de Lepto": "Pedile a Docena inmunoglobulina.." 🎵 🎵 🎵 Te quiero Prêtre!

A **Leo**, por las infinitas tentadas, por la honestidad bruta. Por los códigos. Por los Mandi4 y Leo5 que hay y seguirán habiendo por los siglos de los siglos. Por tu amistad.

A **Mati**, por todos los momentos lindos. Por tantos viajes en el GUY de La Plata al conu y viceversa. Por ser mi compañero de canto y aullidos, y junto con Maia mi compañero de viaje en el 2012. Por su amistad y por bancar mi "violencia" de muchos días, jaja!

A **Caro**, porque me puso a prueba aquel día cuando me mandó a comprar el cable para el mechero y desde entonces se convirtió en una de mis mejores amigas, jaja! Por haber sido una excelente compañera conmigo, explicándome todo un millón de veces. Por las comidas ricas y los mimos que me ha hecho. Por estar siempre. Te adoro má!

A **Leti**, por convertirse en un pilar para mí. Porque nuestra relación se convirtió en buenas amigas mucho más que en buenas compañeras. Por bancarme tantos fines en su casa y venirme a buscar cuando llegaba en el Roca. Por ser mi confidente. Por las anécdotas con Jacob. Oh, Jacob! Te quiero amiga!

A **Maia**, porque con solo mirarnos ya sabemos lo que estamos pensando. Por tantas tentadas y reírnos como nunca en la vida. Por los 5 años de ser mi compañera de carrera y los 3 años de ser mi compañera de doctorado. Por los 10 años de amistad! Por haber cumplido juntas un sueño en el 2012. Porque solo vos conocés TODOS mis secretos y porque sé que puedo confiar en vos siempre. Por estar. Por nuestros códigos. Guille1. Love you!

A **Florcita**, por ser adorable y convertirse en íntima en poco tiempo. Por las vacaciones en Mardel. Por hacerme reír tanto. Te quiero diosa!

A **Roberto y Eli** porque de alguna manera los conocí gracias al doctorado. Por los asados de los domingos y la mermelada de frutilla casera. Por hospedarme tantos fines casi como a una Ferrelli más! Gracias!

A mis **compañeros de Gema**: Charly, Nico, Cande, Guille, Vero y Maru. Por empujarme para que termine la tesis. Por la paciencia, por ayudarme siempre, por la buena onda, por las risas. Por escucharme y aconsejarme, tanto en lo laboral como en lo personal. Por formar parte de esta nueva etapa. Gracias, los quiero!

A mi familia, pero especialmente:

A mis **padrinos Pablo y Miryam** y a mi **Tío Eduardo**, por enorgullecerse con mis logros y estar en las buenas y en las malas. A **Silvia** que también es como mi madrina, por acompañarnos siempre!

A mi **abuelo Cholo** por ser uno de mis ángeles. Por babearse con sus nietas. Por las anécdotas. Te extraño!

A mi **abuela Popi** porque es un ser de luz. Por el amor infinito, por sentirse orgullosa de mi con cada paso que doy. Por Grecia. Te amo abu!

A mis **hermanas**. A Agustina por ser mi bebé, mi reina. Porque aunque sea una adolescente malhumorada no sé qué haría sin ella. A Florencia por ser mi alma gemela. Porque siento una felicidad enorme al saber que estamos juntas siempre, pase lo que pase. Las amo hermanas!

A **mamá**. Es imposible expresar en palabras lo orgullosa que estoy de ser tu hija. Porque en el momento más difícil estuviste firme al pie del cañón, encargándote de que nunca nos falte nada. Por la enseñanza que nos das día a día. Por la fuerza, por el valor, por la a veces dolorosa sinceridad. Por el amor infinito. Por tu incondicionalidad. Te amo má!

A **papá**. Porque agradezco a la vida haber tenido la suerte, el placer y el orgullo de ser tu hija. Porque en el breve tiempo que estuvimos juntos me dejaste una enseñanza infinita. Por tu sabiduría, por tus abrazos, por tu protección, desde acá y desde allá. Por hacer que se me infle el pecho cuando hablo de vos. Porque nos vamos a volver a encontrar. Te amo, siempre.

A todos los que me quedan afuera de los agradecimientos, pero que forman parte de mi vida. Gracias!

Y terminé la tesis nomás. GRACIAS MABEEEEEEELLL!!!!!!

Índice

Índice de figuras	6
Índice de tablas	8
Abreviaturas.....	10
INTRODUCCIÓN GENERAL	14
1.1 Pertussis o coqueluche, un poco de historia	15
1.2 Manifestaciones clínicas	16
1.3 Agente causal	17
1.4 <i>B. pertussis</i> : proceso de infección y patofisiología	18
Factores de virulencia	19
Regulación de la expresión de factores de virulencia a través de un sistema de dos componentes	27
1.5 Respuesta inmune frente a <i>B. pertussis</i>	28
1.5.1 Respuesta inmune innata.....	29
1.5.2 Respuesta inmune adaptativa.....	30
Inmunidad humoral.....	30
Inmunidad celular	31
1.6 Quimioprofilaxis	34
1.7 Vacunas	35
1.8 Estado actual de la epidemiología de pertussis	38
1.9 Resurgencia de la enfermedad.....	41
1.10. Acciones y perspectivas.	44
1.10.1 Efectivización del empleo de las actuales vacunas: administración de refuerzos..	44
1.10.2 Desarrollo de nuevas vacunas	46
1.11 Estructura y mecanismo de acción de la toxina colérica	52
1.12 Propiedades inmunológicas y adyuvantes de CTB.....	54
OBJETIVOS.....	61
Contexto	62
Objetivo general e hipótesis de trabajo	62
Objetivos específicos.....	64

CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA CONTRA PERTUSSIS DE PROTEÍNAS PROPIAS DE LOS AISLAMIENTOS DE *BORDETELLA PERTUSSIS* CIRCULANTES EN NUESTRA REGIÓN 67

2.1	Introducción.....	68
2.2	Resultados.....	72
2.2.1	Justificación de los candidatos seleccionados.....	72
	Bsp22.....	72
	Dihidrolipoamida Deshidrogenasa o LpdA.....	73
2.2.2	Clonación de proteínas de <i>Bordetella pertussis</i> fusionadas a la subunidad B de la toxina colérica.....	74
2.2.3	Expresión de CTB-Bsp22, CTB-LpdA, Bsp22 y LpdA.....	76
2.2.4	Inmunogenicidad de CTB-Bsp22 y CTB-LpdA.....	78
2.2.5	Purificación de las proteínas recombinantes.....	79
2.2.6	Recuperación de la conformación nativa de las proteínas recombinantes.....	81
2.2.7	Ensayos de inmunización y desafío por vía intranasal en el modelo murino para pertussis.....	83
	I. Capacidad protectora de CTB-Bsp22.....	85
	II. Análisis de la respuesta humoral inducida por CTB-Bsp22.....	85
	II.A Determinación de anticuerpos IgG e IgA séricos.....	86
	II.B Determinación de niveles IgA específicos de Bsp22 en lavados nasales.....	89
	III. Capacidad protectora de CTB-LpdA.....	89
	IV. Análisis de la respuesta humoral inducida por CTB-LpdA.....	90
	IV.A Determinación de anticuerpos específicos IgG séricos.....	90
	IV.B Determinación de niveles IgA específicos de LpdA en lavados nasales.....	92
2.3	Discusión.....	93

CAPÍTULO III: EVALUACIÓN DE CTB-FIM₂ COMO CANDIDATO VACUNAL.100

3.1	Introducción.....	101
3.2	Resultados.....	102
3.2.1	Clonado, expresión y purificación de CTB-Fim2.....	102
3.2.2	Recuperación de la conformación nativa.....	103
3.2.3	Ensayos de inmunización y desafío.....	106
	I. Capacidad protectora de CTB-Fim2.....	107
	II. Análisis de la respuesta humoral inducida por CTB-Fim2.....	110
	II.A Determinación de anticuerpos IgG específicos en suero.....	110

II.B Determinación de anticuerpos IgG e IgA específicos en lavados broncoalveolares (BAL).....	112
II.C Determinación de anticuerpos IgA específicos en lavados nasales.....	116
II.D Análisis de isotipos de IgG en suero.....	117
III. Análisis de la expresión de citoquinas en pulmón.....	119
IV. Hallazgos histológicos.....	122
3.3 Discusión.....	123
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES.....	129
4.1 Conclusiones.....	130
CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS.....	139
5.1 Cepas bacterianas utilizadas.....	140
5.2 Medios de cultivo utilizados.....	140
5.3 Vectores utilizados.....	142
5.4 Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	143
5.5 Amplificación de los genes de Bordetella pertussis por PCR.....	143
5.6 Subclonado de los productos de PCR en el vector pGEM-T.....	143
5.7 Transformación de bacterias competentes.....	144
5.8 Colony PCR.....	144
5.9 Purificación de ADN plasmídico.....	144
5.10 Clonado de los genes en el vector de expresión pAE-ctxB.....	145
5.11 Secuenciación de ADN.....	146
5.12 Expresión de las proteínas recombinantes en E. coli BL21 (SI).....	146
5.13 Renaturalización de las proteínas recombinantes.....	147
5.14 Purificación de las proteínas recombinantes.....	147
5.15 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	148
5.16 SDS-PAGE de muestras sin tratamiento térmico y reductor.....	148
5.17 Tinción de proteínas con Coomassie Blue R-250.....	148
5.18 Cuantificación de las proteínas recombinantes.....	148
5.19 Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masa (EM), MALDI-TOF.....	149
5.20 Western Blot.....	150
5.21 GM1-ELISA.....	150
5.22 Remoción de LPS y ensayo de lisado de Limulus ameobocito (LAL test).....	151
5.23 Ensayos de inmunización y desafío con las proteínas recombinantes.....	151

5.24 Obtención de muestras de lavados nasales y broncopulmonares	152
5.25 ELISA.....	153
5.26 Extracción de ARN y análisis de transcripción reversa.....	153
5.27 Cuantificación de citoquinas por real time PCR (qPCR)	153
5.28 Análisis estadístico	154
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158

Índice de figuras

FIGURA 1. ESQUEMATIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA TOXINA PERTUSSIS.....	22
FIGURA 2. SISTEMA DE SECRECIÓN DE TIPO III EN <i>BORDETELLA</i>	27
FIGURA 3. INMUNIDAD DEL HOSPEDADOR FRENTE A <i>B. PERTUSSIS</i> EN EL MODELO MURINO.	32
FIGURA 4. MECANISMOS DE INMUNIDAD INDUCIDOS POR LAS VACUNAS CELULAR Y ACELULAR CONTRA <i>B. PERTUSSIS</i>	34
FIGURA 5. INCIDENCIA DE PERTUSSIS CADA 100.000 HABITANTES EN ESTADOS UNIDOS, 1980-2011	38
FIGURA 6. INCIDENCIA DE PERTUSSIS CADA 100.000 HABITANTES EN ESTADOS UNIDOS POR GRUPO DE EDAD, 1990-2012	39
FIGURA 7. TASA DE NOTIFICACIÓN Y COBERTURA DTP. AÑOS 2002-2010. ARGENTINA.....	40
FIGURA 8. FICHAS NOTIFICADAS PARA ESTUDIO DE COQUELUCE EN ARGENTINA. SEMANAS 1-52. 2008-2012.....	41
FIGURA 9. NÚMERO DE NOTIFICACIONES Y RESULTADOS POSITIVOS <i>B. PERTUSSIS</i> POR GRUPO DE EDAD EN ARGENTINA. AÑO 2011.....	41
FIGURA 10. SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS.....	50
FIGURA 11. ESTRUCTURA DE LA TOXINA COLÉRICA.	53
FIGURA 12. MECANISMO DE ACCIÓN PROPUESTO PARA CTB COMO ADYUVANTE DE MUCOSAS..	57
FIGURA 13. COMPLEJO MULTIENZIMÁTICO PIRUVATO DESHIDROGENASA (PDH)..	74
FIGURA 14. ESTRATEGIA DE CLONADO EN EL VECTOR PAECTXB.....	75
FIGURA 15. GENERACIÓN DE LOS VECTORES PAECTXB- <i>BSP22</i> Y <i>LPDA</i>	75
FIGURA 16. CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA SECUENCIACIÓN CON PRIMERS T7 Y T7 TERMINATOR DE LOS VECTORES PAECTXB- <i>BSP22</i> Y PAECTXB- <i>LPDA</i>	76
FIGURA 17. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CTB- <i>BSP22</i> Y CTB- <i>LPDA</i> EN SDS-PAGE 10% (P/V)	77
FIGURA 18. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES <i>BS22</i> Y <i>LPDA</i> EN SDS-PAGE 10% (P/V)..	78
FIGURA 19. INMUNOBLOTS DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CTB- <i>BSP22</i> , CTB- <i>LPDA</i> , <i>BSP22</i> Y <i>LPDA</i> EMPLEANDO ANTISUEROS ESPECÍFICOS POLICLONALES ANTI-CTB ANTI- <i>BSP22</i> O ANTI- <i>LPDA</i>	79
FIGURA 20. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	80
FIGURA 21. PROTEÍNAS QUIMÉRICAS RE-NATURALIZADAS Y PURIFICADAS.	81
FIGURA 22. ENSAYOS DE ELISA PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS PROTEÍNAS REPLEGADAS CTB- <i>BSP22</i> , CTB- <i>LPDA</i> Y CTB COMERCIAL DE UNIRSE A GM1	82

FIGURA 23. ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN Y DESAFÍO CON LAS PROTEÍNAS CTB-BSP22 Y CTB-LPDA.....	83
FIGURA 24. EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA PERTUSSIS CONFERIDA POR LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE CTB-BSP22.....	86
FIGURA 25. RESPUESTA HUMORAL EN SUERO DE RATONES INMUNIZADOS POR VÍA INTRANASAL CON CTB- BSP22.	88
FIGURA 26. RESPUESTA HUMORAL EN LAVADOS NAALES DE RATONES INMUNIZADOS POR VÍA INTRANASAL CON CTB-BSP22.	90
FIGURA 27. EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA PERTUSSIS CONFERIDA POR LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE CTB-LPDA.	91
FIGURA 28. RESPUESTA HUMORAL EN SUERO DE RATONES INMUNIZADOS POR VÍA INTRANASAL CON CTB- LPDA.	91
FIGURA 29. RESPUESTA HUMORAL EN LAVADOS NAALES DE RATONES INMUNIZADOS POR VÍA INTRANASAL CON CTB-LPDA.....	92
FIGURA 30. ESQUEMA DEL VECTOR PAECTXB-FIM2.....	103
FIGURA 31. EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS POR INMUNOBLOT DE LA PROTEÍNA CTB-FIM2.	105
FIGURA 32. ANÁLISIS DE LA RECUPERACIÓN DE LA CONFORMACIÓN NATIVA DE CTB-FIM2 MEDIANTE CORRIDAS ELECTROFORETICAS EN GELES SDS-PAGE Y GM1 ELISA.	105
FIGURA 33. EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA PERTUSSIS CONFERIDA POR LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE CTB-FIM2.....	109
FIGURA 34. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE IGG ANTI-FIM2 MEDIANTE ENSAYOS DE ELISA EN SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON CTB-FIM2.....	111
FIGURA 35. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE IGG ANTI-FIM2 MEDIANTE ENSAYOS DE ELISA EN LAVADOS BRONCOALVEOLARES DE RATONES INMUNIZADOS CON CTB-FIM2.	114
FIGURA 36. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE IGA ANTI-FIM2 MEDIANTE ENSAYOS DE ELISA EN LAVADOS BRONCOALVEOLARES DE RATONES INMUNIZADOS CON CTB-FIM2.	115
FIGURA 37. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE IGA ANTI-FIM2 MEDIANTE ENSAYOS DE ELISA EN LAVADOS NAALES DE RATONES INMUNIZADOS CON CTB-FIM2.....	116
FIGURA 38. DETERMINACIÓN DE ISOTIPOS DE ANTICUERPOS ANTI-FIM2 IGG1 E IGG2A.....	117
FIGURA 39. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARNM DE CITOQUINAS EN PULMÓN POR QPCR.	120
FIGURA 40. SECCIONES REPRESENTATIVAS DE PULMONES DE RATONES BALB/C LUEGO DEL DESAFÍO CON <i>B. PERTUSSIS</i>	122
FIGURA 41. ESTRUCTURA DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN PAECTXB.....	142

Índice de tablas

TABLA I. COMPLICACIONES DE LA TOS CONVULSA.	17
TABLA II. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>BORDETELLA</i>	20
TABLA III. FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>B. PERTUSSIS</i>	23
TABLA IV. EFECTOS ADVERSOS ASOCIADOS A LA ADMINISTRACIÓN DE LAS VACUNAS DTAP Y DTP	36
TABLA V. PROGRAMAS DE VACUNACIÓN HASTA EL AÑO 2010 EN 7 PAÍSES DE EUROPA.	36
TABLA VI. ESTRATEGIAS DE INMUNIZACIÓN EVALUADAS POR LA GPI.	45
TABLA VII. CLASIFICACIÓN Y LISTADO DE LOS PRINCIPALES ADYUVANTES VACUNALES	48
TABLA VIII. VACUNAS INTRANASALES CONTRA <i>B. PERTUSSIS</i>	51
TABLA IX. ANTÍGENOS HACIA LOS CUALES CTB TIENE ACTIVIDAD ADYUVANTE.	55
TABLA X. PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE POR AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE <i>B. PERTUSSIS</i>	71
TABLA XI. TRATAMIENTOS REALIZADOS EN LOS ENSAYOS EMPLEANDO EL MODELO MURINO	84
TABLA XII. GRUPOS DE RATONES INMUNIZADOS CON SUS RESPECTIVOS INMUNÓGENOS Y DOSIS UTILIZADAS.	107
TABLA XIII. ANÁLISIS DE DOBLE VARIANZA (ANOVA) PARA COMPARAR ISOTIPOS DE IGG EN SUERO.	118
TABLA XIV. SECUENCIA DE LOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR	143

Abreviaturas

AC-Hly	Adenilato ciclasa hemolisima
ADP	Adenosín difosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Célula presentadora de antígenos
ATP	Adenosín trifosfato
BpFim2	Fimbria 2 purificada de un cultivo de <i>Bordetella pertussis</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CD4	Cúmulo de diferenciación 4
CI	Cuerpos de inclusión
CO ₂	Dióxido de carbono
DAB	Diaminobenzidina
DO	Densidad óptica
dNTPs	Deoxirribonucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FHA	Hemaglutinina filamentosa
Fim	Fimbria
g	Fuerza gravitacional
GTP	Guanosina trifosfato
HCl	Ácido clorhídrico
HRP	Peroxidasa de rábano
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados
IN	Intranasal
IP	Intraperitoneal
INF- γ	Interferón gamma
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	10 ³ Daltons

LB	Medio Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
mg	Miligramo (10^{-3} gramos)
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
Ni ²⁺ -NTA	Ácido nitrilotriacético conjugado con níquel
Célula NK	Célula <i>natural killer</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
OPD	Orto-fenil-dietanolamina
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PBST	PBS-Tween 20 0,1%-leche
PRN	Pertactina
PTx	Toxina pertussis
rFim2	Fimbria 2 recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TE	TRIS-EDTA
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Célula Th	Célula tipo <i>helper</i>
TLR	Receptor tipo Toll
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
U	Unidades
μg	Microgramos (10^{-6} gramos)
μl	Microlitros (10^{-6} litros)

μm

Micrometros (10^{-6} metros)

μM

Micromolar (10^{-6} molar)

**CAPÍTULO
I**

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Pertussis o coqueluche, un poco de historia

Pertussis, tos convulsa, coqueluche o tos ferina son todos sinónimos que se emplean para designar a la enfermedad respiratoria aguda causada por la bacteria Gram negativa *Bordetella pertussis*. Esta enfermedad inmunoprevenible y de alta contagiosidad es más grave en lactantes y niños pequeños pero también afecta a los adolescentes y adultos. Su principal manifestación es una tos prolongada que dura varias semanas, marcada por accesos típicos de tos violenta y espasmódica con sensación de asfixia, que terminan con un ruido estridente durante la inspiración (estridor inspiratorio).

El primer registro de un brote de tos convulsa fue realizado por Guillaume De Baillou. Dicho brote que tuvo lugar en París en el verano de 1578 afectó principalmente a lactantes y niños pequeños y tuvo una elevada mortalidad (119).

En 1679, Sydenham nombró a la enfermedad como "tos ferina" (es decir, tos violenta). En 1865 el profesor Trousseau durante su clase magistral en el Hotel-Dieu de París, se refiere a la enfermedad como la "*toux qui houpe*", de donde los ingleses hicieron derivar el término "*whooping cough*".

Por su parte, coqueluche es una palabra de origen francés que fue incluida en algunas ediciones del Diccionario de la Real Academia (1927, 1950, 1983, 1989), siempre con la marca de galicismo como sinónimo de tos ferina. El vocablo francés se formó a partir del bajo latín *cuculuccia*, derivado del latín *cucullus* o "capucha". En Francia, antiguamente, las personas enfermas de tos ferina estaban obligadas a cubrirse la cabeza con una capucha o caperuza, lo que dio lugar al nombre francés de la enfermedad, coqueluche, así adoptado durante algún tiempo por el español. Se cree que la palabra francesa recibió, asimismo, la influencia de *coq*, "gallo", ya que la tos ferina se conocía también como *chant du coq* (canto del gallo).

En relación al agente etiológico de la tos convulsa, hasta el advenimiento del siglo XX se pensaba que la enfermedad era causada por un hongo (155). En el año 1883 esta descripción fue rebatida por Burger, quien publicó el hallazgo de un bacilo pequeño y elipsoidal en la expectoración de los coqueluchosos. En 1901, Jochmann y Krause a partir del esputo de un pequeño paciente lograron aislar en placas agar sangre, un bacilo que llamaron *Bacillus pertussis eppendorf*, en honor al sector de Hamburgo donde estaba su hospital. Solo recién en el año 1906 Jules Bordet y Octave Gengou lograron identificar como el agente causal de la sintomatología de la enfermedad a una bacteria que denominaron *Bordetella pertussis*. Estos autores lograron además replicarlo *in vitro* gracias al desarrollo de un medio de cultivo formulado en base a sangre, glicerol y papa (29).

1.2 Manifestaciones clínicas

La tos convulsa es una enfermedad respiratoria aguda que se caracteriza por presentar una tos progresiva, repetitiva y con paroxismos.

El período de incubación dura entre 7 y 10 días. La enfermedad clásica ocurre con mayor frecuencia como una infección primaria en niños no vacunados, dura de 6 a 12 semanas y tiene tres fases: catarral, paroxística y de convalecencia.

Entre las manifestaciones que se presentan durante la fase catarral se encuentran la rinorrea, lagrimeo y tos leve. Estos síntomas son similares a los de un resfrío común. En los siguientes 7 a 14 días, generalmente la tos empeora, tanto en la frecuencia como en intensidad aunque la temperatura corporal es normal o ligeramente elevada. Durante este período, el agente causal *B. pertussis* puede ser aislado a partir de las secreciones nasofaríngeas de los pacientes.

La fase paroxística tiene su inicio durante la segunda semana de la enfermedad y puede extenderse hasta 6 semanas. Se caracteriza por numerosos y rápidos paroxismos de tos, debido a la dificultad de expulsar el moco espeso del espacio broncoalveolar. Los ataques paroxísticos se producen con frecuencia por la noche, con un promedio de 15 ataques cada 24 horas. Luego de un paroxismo, se produce un fuerte esfuerzo inspiratorio durante el cual se produce el silbido o estridor inspiratorio clásico. Además del paroxismo, pueden manifestarse síntomas como cianosis, ojos saltones, protrusión de la lengua, salivación, lagrimeo, y la distensión de las venas de cuello. Los paroxismos se asocian con mucosidad, pero la producción de esputo purulento no se produce. El vómito después de la tos es común, lo cual puede llevar a la pérdida de peso.

Las manifestaciones clínicas de coqueluche varían con la edad del paciente, la inmunización o la infección previa y el tratamiento con antibióticos, así como la carga bacteriana en la exposición, factores genéticos del huésped y el genotipo del microorganismo (169).

Las complicaciones más frecuentes de la enfermedad incluyen neumonía, otitis, convulsiones y encefalopatía. La neumonía puede ser un evento primario en respuesta a la infección por *B. pertussis* o puede deberse a una infección secundaria con otros patógenos. En la **Tabla I** se detallan algunas de las complicaciones descritas de acuerdo a la edad del paciente.

El diagnóstico etiológico de la patología suele ser realizado en la fase paroxística pero se vuelve más difícil a medida que pasa el tiempo.

La fase convaleciente puede durar entre 4 y 21 días y se caracteriza por una recuperación gradual del paciente. En esta etapa los paroxismos ocurren con menor frecuencia y desaparecen dentro de las 2-3 semanas (169).

Tabla I. Complicaciones de la tos convulsa.

Infantes y niños	Adolescentes y adultos
Apnea	Pérdida de peso
Neumonía	Incontinencia urinaria
Convulsiones	Síncope
Encefalopatía	Fractura de costillas por tos severa
Dificultad para dormir	Otitis
Otitis	Deshidratación
Deshidratación	Epistaxis
Epistaxis	Encefalopatía por hipoxia
Muerte	Hematoma subdural

1.3 Agente causal

El principal agente causal de la tos convulsa es *Bordetella pertussis*, un bacilo Gram negativo pequeño y aerobio de metabolismo no fermentativo. *B. pertussis* es un patógeno obligado del hombre del cual no se conoce hasta el presente ningún reservorio ambiental o animal. *B. parapertussis* también es capaz de causar la enfermedad aunque en general con sintomatología más moderada (24).

Actualmente, se conocen diez especies del género *Bordetella*: *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* (humana), *B. parapertussis* (ovina), *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii* y *B. ansorpii*. Todas estas especies son cocobacilos pequeños (0.2 μm por 0.7-1 μm), Gram negativos, aerobios estrictos (con excepción de *B. petrii*) con un metabolismo no fermentativo.

De las especies que se han identificado hasta la fecha, además de *B. pertussis* solo tres han sido asociadas con infecciones respiratorias en humanos y otros mamíferos: *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* (170).

B. bronchiseptica infecta una amplia gama de huéspedes (perros, gatos, conejos, ovejas, roedores, caballos, cerdos y osos) y ocasionalmente causa enfermedades de tos en humanos. En particular, se han observado infecciones graves en personas inmunocomprometidas, como pacientes con SIDA (53).

En relación a *B. parapertussis* se describen dos especies: una capaz de producir infección en los humanos, *B. parapertussis_{hu}* y otra que infecta exclusivamente al ganado ovino, *B. parapertussis_{ov}* (53). *B. holmesii* es una especie del género que fue asociada primariamente con septicemias pero recientemente se la ha asociado a infecciones del tracto respiratorio humano que conducen a sintomatologías similares a la de la tos convulsa (272). Se la ha encontrado en adultos jóvenes (260), así como también en niños menores de 1 año (33).

En la **Tabla II** se muestran algunas características de las distintas especies del género *Bordetella*.

Desde el punto de vista evolutivo, se ha propuesto a *B. bronchiseptica* como el progenitor de *B. pertussis*. Por su parte *B. pertussis* y *B. parapertussis* se consideran dos linajes separados adaptados al ser humano (169).

A continuación describiremos características de *B. pertussis* y el proceso infeccioso que induce, por ser el patógeno de cual nos ocuparemos en este trabajo.

1.4 *B. pertussis*: proceso de infección y patofisiología

La infección comienza con el ingreso de *B. pertussis* a las vías aéreas de un huésped susceptible a través de gotitas o aerosoles expelidos por un individuo infectado. Una vez dentro del huésped, la bacteria se adhiere a la mucosa nasofaríngea causando una leve inflamación local. También puede adherirse a otros tipos celulares como los macrófagos alveolares y células dendríticas (208). Las bacterias adheridas proliferan y liberan toxinas causando ciliostasis, daño en el epitelio respiratorio, liberación de mucus, inflamación del lumen del tracto respiratorio e inhibición de las funciones de células del sistema inmune del huésped. Esta disrupción de la función normal de la mucosa ciliada y el daño del epitelio respiratorio son las patologías primarias asociadas con la infección por *B. pertussis*.

En los pulmones, la primera lesión causada por pertussis parece ser la hiperplasia linfoide de los nódulos linfáticos peribronquiales y traqueobronquiales. En la mayoría de los casos de muerte por pertussis, los pacientes presentan bronconeumonía, generalmente debida a una infección secundaria (118) aunque también puede producirse solo por la propia infección por *B. pertussis*.

Los modelos de infección en animales han permitido conocer mejor la patofisiología de esta infección. En el modelo murino de infección intranasal de *B. pertussis*, la bacteria causa una bronconeumonía asociada a hemorragia alveolar con edema, sin evidencia de lesiones necróticas. El pulmón infectado presenta una inflamación perivascular y peribronquial generalizada, con un gran número de células infiltrantes, predominando los neutrófilos. La

distribución de estas células es homogénea en todo el pulmón. Se observa en general, inflamación del parénquima pulmonar con aflujo de linfocitos, mientras que el exudado intra-alveolar está compuesto principalmente por monocitos. En la infección murina temprana también se ha observado una afluencia de células T y δ en los pulmones, así como un rápido reclutamiento de células dendríticas. En animales inmunizados el curso de la infección es menos prolongado y el influjo de células es más transitorio (178).

Factores de virulencia

Para el desarrollo de las distintas etapas de infección, la bacteria utiliza una serie de factores que en conjunto se denominan factores de virulencia. De acuerdo a su rol, a varios de estos factores se los ha clasificado como adhesinas o toxinas. Sin embargo, hay otros factores más complejos como el Sistema de Secreción Tipo III, que también juegan un rol clave en la patogénesis de pertussis, u otro grupo de proteínas denominadas autotransportadores. En la **Tabla III** se muestran los factores de virulencia más relevantes de *B. pertussis* que ha continuación son descriptos.

- **Adhesinas**

Dentro de este grupo se encuentran:

La **hemaglutinina filamentosa (FHA)** es una de las principales adhesinas de *Bordetella*. Consiste en una proteína de 220 kDa asociada a la superficie bacteriana pero también se secreta al medio extracelular. FHA posee varios dominios involucrados en la adhesión a las superficies del huésped. Estos incluyen: unión a fagocitos mediada por integrinas, unión a azúcares sulfatados de la matriz extracelular y de las células epiteliales, y adhesión a células epiteliales ciliadas. La región responsable de esta adhesión es un dominio tipo lectina que se denomina CRD (Carbohydrate Recognition Domain). Este dominio tiene afinidad particular por carbohidratos y glicolípidos y participa en la unión de la bacteria a las células ciliadas y a los macrófagos.

La adhesina FHA también promueve la fagocitosis de *B. pertussis* por macrófagos y neutrófilos, efecto que puede ser inhibido *in vitro* por anticuerpos anti-FHA obtenidos de niños infectados (182). Dada las propiedades inmunogénicas de esta proteína, se la ha incluido como componente en la mayoría de las formulaciones acelulares contra pertussis (53).

Tabla II. Principales características de las especies del género *Bordetella*.

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. trematum</i>	<i>B. ansorpii</i>	<i>B. petrii</i>
Hospedador	Hombre	Hombre, ovejas	Mamíferos, incluyendo al hombre	Hombre	Aves y hombre	Aves y reptiles	Hombre	Hombre	Hombre
Enfermedad	Tos convulsa	Tos convulsa leve	Rinitis atrófica en cerdos, tos ferina en perros y gatos, infecciones respiratorias en humanos	Septicemia, enfermedad respiratoria	Septicemia	Enfermedad respiratoria en el pavo	Infecciones en heridas, otitis media	Infecciones oportunistas	Infecciones oportunistas
Lugar de aislamiento	Tracto Respiratorio	Tracto respiratorio	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio	Heridas, oído	Herida	Infección y Medio ambiente
Contenido G+C (% en moles)	66-68	66-68	66-68	61.5-62.3	65-67	62	64-65	ND	63.8
Tamaño del genoma (Kpb)	4086	4773	5338	ND	ND	3730	ND	ND	5287
Crecimiento en agar MacConkey	-	Variable	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+		+	+	+	+	ND	ND
Producción de ureasa	-	+(24 hs)	+(4 hs)	-	variable	-	-	-	-
Oxidasa	+	-	+	-	+	+	-	-	+
Asimilación de Citrato	+	+	+	+	+	+	-	ND	ND
Movilidad	-	-	+	-	+	+	-	+	-

Las **Fimbrias (Fim)** son proteínas poliméricas y filamentosas de la superficie bacteriana. *B. pertussis* produce dos tipos de fimbrias serológicamente diferentes, fimbrias 2 y 3 (Fim2 y Fim3, respectivamente). Las Fim2 y Fim3 están compuestas por una subunidad proteica mayoritaria de 22,5 kDa y de 22 kDa respectivamente y una subunidad minoritaria FimD, de 40 kDa, que se ubica en el extremo de la proteína (169). Las proteínas que forman la estructura helicoidal de las fimbrias se unen a receptores heparán sulfato, sulfato de condroitina y dextrán sulfato, azúcares ampliamente distribuidos en el tracto respiratorio de los mamíferos, pudiendo mediar de esta manera la función de adhesión (84). Varios estudios sugieren que las fimbrias pueden participar en la unión de *Bordetella* al epitelio respiratorio a través de las subunidades mayores, y a los monocitos a través de FimD (107). Por otra parte, estudios *in vivo* demostraron que cepas defectivas en la expresión de fimbrias presentan alteraciones en su capacidad de multiplicarse en el tracto nasofaríngeo y en la tráquea de los ratones (184).

Desde hace varios años, se ha visto que los anticuerpos anti-fimbria en suero de pacientes infectados o de niños vacunados aglutinan la bacteria. Además, se ha visto que existe una correlación directa entre la presencia de anticuerpos aglutinantes y la protección contra pertussis (210), lo cual ha justificado su inclusión como antígenos en algunas de las vacunas acelulares contra pertussis.

Dentro de los factores de virulencia de *B. pertussis* denominados autotransportadores, el más relevante es la **pertactina (PRN)**. PRN es una proteína autotransportadora presente en la membrana externa de *B. pertussis* que participa en el proceso de adhesión de la bacteria al hospedador. Esta proteína es secretada al espacio periplásmico y posteriormente se autoprocesa mediante clivaje sobre su extremo C-terminal. PRN participa en la adhesión a través del motivo Arg-Gly-Asp (RGD) para facilitar la unión e invasión a células eucariotas (169).

PRN es altamente inmunogénica y es un componente de la mayoría de las vacunas acelulares en uso. Después de la infección natural o de la inmunización con vacunas que contienen esta proteína, se encuentran anticuerpos contra PRN en suero de pacientes (45). Además, ratones que han sido inmunizados pasivamente con anticuerpos contra PRN son altamente resistentes a un desafío intranasal con *B. pertussis* virulenta (47).

Se ha demostrado que existe variación genética en PRN, con un cambio en el tiempo de las cepas circulantes hacia variantes que no están representadas por las vacunas contra pertussis que se utilizan como medida de prevención contra la enfermedad en la comunidad (186).

Además de la PRN se han descrito otras proteínas autotransportadoras como BrkA (del inglés, *Bordetella resistance killing*), el factor de colonización traqueal (TcfA) y Vag8. A estas proteínas se les ha adjudicado un rol durante el proceso infeccioso. BrkA parecería impedir la lisis mediada por la vía clásica del complemento y contribuiría a la adhesión de *B. pertussis* a las células del huésped (66, 207). Además, esta proteína posee actividad protectora, siendo capaz de aumentar la eficacia de vacunas acelulares cuando ésta es evaluada en el modelo murino (166). Vag8 es una proteína autotransportadora de 95 kDa que contiene una secuencia RGD involucrada en procesos de adhesión (169). El rol de esta proteína en la patogénesis de *B. pertussis* aún no ha sido determinado. TcfA es una proteína autotransportadora expresada exclusivamente por *B. pertussis*. Ensayos *in vivo* empleando el modelo murino sugieren que el Tcf es importante para la colonización y persistencia de la bacteria en la tráquea de los ratones (250).

- **Toxinas**

Las toxinas producidas por *B. pertussis* son conocidas por contribuir a la patogénesis y por estar involucradas en la protección o evasión del sistema inmune. Entre ellas se encuentran:

La **toxina pertussis (PTx)** es una toxina del tipo AB con actividad ADP-ribosiltransferasa. Esta toxina multimérica solo es sintetizada por *B. pertussis* y está compuesta por 5 subunidades polipeptídicas diferentes S₁ a S₅, cuyos pesos moleculares estimados son de 28, 23, 22, 11,7 y 9,3 kDa, respectivamente. El monómero A de la toxina está compuesto por la subunidad S₁ y posee actividad ADP ribosiltransferasa. El oligómero B posee

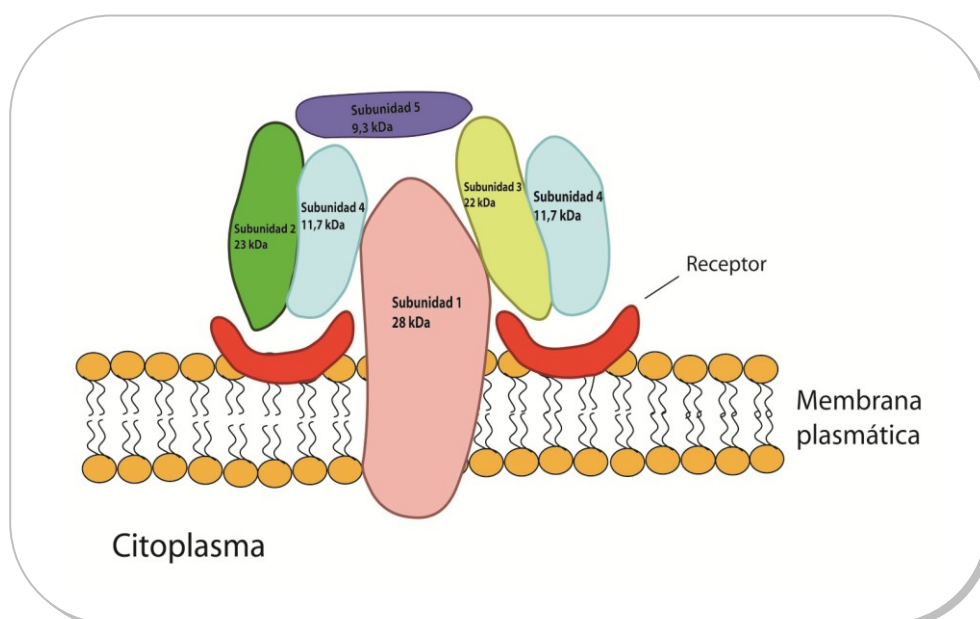


Figura 1. Esquemización de la estructura de la toxina pertussis. (Adaptado de <http://pathmicro.med.sc.edu>).

Tabla III. Factores de virulencia de *B. pertussis*.

	Factor de virulencia	Descripción
Adhesinas	Hemaglutinina filamentosa (FHA)	Adhesina dominante; necesaria para la colonización traqueal, altamente inmunogénica, principal componente de las vacunas acelulares.
	Fimbrias (Fim)	Estructuras filamentosas de la superficie celular, requeridas para la colonización persistente de la traquea; componentes de algunas vacunas acelulares.
Auto-transportadores	Pertactina (PRN)	Media la unión de células eucariotas <i>in vitro</i> ; mejora la inmunidad protectora.
	Vag8	Proteína de membrana externa.
	BrkA	Confiere resistencia al suero y protección contra péptidos antimicrobianos en <i>B. pertussis</i> .
	Factor de colonización traqueal (FCT)	Rol en la colonización de la traquea en el modelo murino.
Toxinas	Toxina pertussis (PTx)	Toxina AB; ADP-ribosila proteínas G; responsable de la tos convulsa asociada a linfocitosis; adyuvante fuerte y principal componente de las vacunas acelulares.
	Adenilato ciclasa (AC)	Posee actividad adenilato ciclasa/hemolisina; actúa como factor anti-inflamatorio y antifagocítico durante la infección.
	Sistema de Secreción tipo III (SSTT)	Permite a <i>Bordetella</i> trasladar proteínas efectoras directamente en las células huésped. Se requiere para la colonización traqueal persistente; inhibe la respuesta inmunitaria del huésped.
	Toxina dermonecrótica	Toxina lábil al calor secretada; activa Rho; induce necrosis <i>in vitro</i> .
	Toxina citotraqueal (TCT)	Causa hinchazón mitocondrial, alteración de las uniones estrechas, daño a los cilios, y la producción de IL 1- α y ON
	LPS	Efectos mitogénicos y tóxicos. Contribuye a la colonización de la traquea.

(Matoo and Cherry, Clin Microbiol Rev, 2005)

estructura de anillo, está formado por las subunidades S₂ (1), S₃ (1), S₄ (2) y S₅ (1) y es el responsable de la unión de la toxina a las células blanco (**Figura 1**). Se une a glicoproteínas de superficie y gangliósidos de una variedad de células de mamíferos (135). Luego del proceso de adhesión, el monómero A de la toxina es translocado al citosol de la célula blanco en un proceso independiente de endocitosis. La unión de ATP al oligómero B de la toxina causa la liberación de la subunidad S₁ en el citosol y es activada luego de sufrir la reducción de su puente disulfuro. En su forma reducida, S₁ cataliza la transferencia de una unidad de ADP-ribosa del NAD a la subunidad α de una proteína G, inactivándola. Los efectos biológicos atribuidos a la interrupción de estas vías de señalización incluyen sensibilización por histamina, aumento de la secreción de insulina en respuesta a señales regulatorias, y efectos inmunológicos tanto supresores como estimuladores (116). Recientemente se ha sugerido que PTx sería importante en los primeros estadios de la infección (43).

Actualmente, PTx está incluida en todas las vacunas acelulares contra la tos convulsa licenciadas a la fecha y posee epitopes protectores polimórficos situados en las subunidades S₁ y S₃, denominadas hoy subunidad A y C, respectivamente. Al igual que la pertactina, se encontraron variantes polimórficas de PTx en la subunidad A, clasificadas como ptxA 1, 2, 3 y 4. Estas variaciones se encuentran localizadas en regiones que codifican para epitopes involucrados en la unión a células T (188).

La **adenilato ciclasa-hemolisina (AC-Hly)**, es una proteína bifuncional sintetizada por todas las especies de *Bordetella* que infectan mamíferos. Pertenece a la familia de citotoxinas formadoras de poro y dependientes de calcio conocidas como toxinas RTX (repeticiones en toxinas). Estas toxinas contienen un arreglo de repeticiones en tándem de 9 aminoácidos (L-X-G-G-X-G (N/D)-D-X) que están involucrados en la unión a calcio. Esta proteína se caracteriza por ser expresada solo en el estado virulento de la bacteria y por esto es considerada un marcador de dicho estado.

Tanto la actividad hemolítica como la de ciclasa son esenciales para el inicio de la infección de *B. pertussis*. Se ha observado que mutantes defectivos en la expresión de AC-Hly presentan una menor virulencia en el modelo de infección murino. Ensayos en modelos animales demostraron que inmunizaciones con esta proteína inducen protección contra la colonización bacteriana. Además, AC-Hly participaría también en etapas posteriores a la colonización, modulando la respuesta del hospedador (63).

La **toxina citotraqueal (TCT)** es un disacárido-tetrapéptido derivado del peptidoglicano. Aunque es producido por todas las bacterias Gram negativas, solamente *Bordetella spp* y *Neisseria gonorrhoeae* lo liberan durante la fase exponencial de su crecimiento (221).

Esta toxina induce parálisis y destrucción del epitelio ciliado respiratorio, causando ciliostasis y tos persistente. La toxicidad es inducida por un mecanismo indirecto, a través de la inducción del aumento de la producción de IL-1. Esta interleuquina activa a la enzima óxido nítrico sintasa, produciendo grandes cantidades de radicales ON (óxido nítrico). Estos radicales destruyen enzimas dependientes de iones y eventualmente inhiben la función mitocondrial y la replicación del ADN de las células epiteliales ciliadas que se encuentran en contacto con la bacteria. Esta toxina también actúa sobre otras células, inhibe la quimiotaxis y el metabolismo oxidativo de neutrófilos, lo cual podría contribuir a la persistencia de *B. pertussis* en el huésped (170). Estudios recientes han mostrado que TCT estimula la respuesta en células inmunes a través de moléculas patrones de reconocimiento microbiano que interactúan con peptidoglicano y sus derivados (41).

La **toxina dermonecrótica (TDN)** es una típica toxina AB compuesta de un dominio N-terminal de unión a receptor de 54 aminoácidos y un dominio C-terminal de actividad enzimática de 300 aminoácidos. Esta toxina es lábil al calor e induce lesiones locales necróticas en ratones y otros animales de laboratorio cuando se la inyecta por vía intradérmica, mientras que es letal cuando se la administra por vía intravenosa en dosis bajas. Estudios *in vitro* mostraron que la TDN purificada a partir de *B. bronchiseptica* induce cambios morfológicos, estimula la replicación de ADN, y perjudica la diferenciación y proliferación de células osteoblásticas (169).

El **lipopolisacárido (LPS)** de la especie *Bordetella* es pirogénico, mitogénico, tóxico y puede activar e inducir la producción de factor de necrosis tumoral en macrófagos (169). A diferencia de otras bacterias Gram negativas, *B. pertussis* no presenta antígeno O. En corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida, el perfil del LPS se presenta con una banda denominada B de mayor movilidad, compuesta por el lípido A y el core interno, y una banda de menor movilidad denominada banda A (203).

Estudios con ratones defectivos en TLR₄ sugieren que la señalización del LPS mediada a través de los receptores TLR₄ es necesaria para inducir una respuesta innata robusta y generar una respuesta protectora contra *B. pertussis* en el modelo murino (115). En los ratones defectivos, la colonización bacteriana en los pulmones fue mayor a la observada en los ratones salvajes, y con un mayor aumento de infiltrado celular y de patología pulmonar (115).

Recientemente, nuestro grupo de investigación encontró que la estimulación exacerbada de la respuesta inmune innata en los pulmones por el LPS confiere un alto nivel de protección frente al desafío con dosis altas de *B. pertussis* y que esta protección es dependiente de la producción de especies reactivas del oxígeno (68, 280).

El **Sistema de Secreción de Tipo III** o SSTT, es un aparato secretor especializado que permite a bacterias Gram negativas inyectar proteínas efectoras directamente en el citosol de la célula eucariótica. Las proteínas secretadas por el SSTT se dividen en dos grupos: proteínas translocadoras y proteínas efectoras. Las proteínas translocadoras son transportadas y translocadas en la membrana plasmática de la célula huésped, donde se insertan y forman un poro. Luego las proteínas efectoras pueden translocarse a través del SSTT por los poros formados por las translocadoras (1). Las proteínas efectoras constituyen normalmente factores de virulencia que producen efectos en la célula del hospedador que le permiten al patógeno invadir para colonizar, multiplicarse y en algunos casos persistir de forma crónica en la tráquea de ratas y ratones (274). Las proteínas efectoras BopC y BteA inducen la muerte celular por mecanismos desconocidos. Proteínas efectoras que aún no han sido identificadas estarían involucradas en la inhibición la translocación del factor NF- κ B al núcleo y la regulación positiva de la expresión de IL-10 (**Figura 2**) (274).

Dentro del género *Bordetella*, se ha descrito un *cluster* de genes del SSTT altamente conservados en *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* y *B. pertussis* (275). El locus del SSTT de *Bordetella*, denominado *bsc*, codifica para 22 ORF entre los que se encuentran los que codificarían para las proteínas de la maquinaria del SSTT, la ATPasa BscN, proteínas secretadas por el SSTT y posibles chaperonas. Originalmente, la expresión funcional del SSTT se describió solamente para *B. bronchiseptica* y la mayoría de los estudios del SSTT en *Bordetella* se han focalizado sobre esta especie. *B. bronchiseptica* expresa las proteínas BopB y BopD, que son ortólogas de las proteínas translocadoras YopB y YopD de *Yersinia spp.* Estas proteínas interaccionan entre sí para formar el poro en la membrana de la célula del huésped y son requeridas para la actividad citotóxica del SSTT (171). BopN aún no ha sido caracterizada en *Bordetella spp.* En *Yersinia*, su ortóloga YopN previene la secreción de proteínas en ausencia de contacto con células del huésped. A diferencia de las otras proteínas efectoras del SSTT, Bsp22 es exclusiva del género *Bordetella*. Esta proteína se sintetiza en mayor proporción durante el crecimiento *in vitro* de *B. bronchiseptica* y aunque mutaciones en *bsp22* no afectan la secreción de las otras proteínas, sí eliminan los efectos *in vivo* e *in vitro* descritos para el SSTT de *Bordetella* (174). Resultados sobre la inmunogenicidad de esta proteína se presentan en esta tesis (ver Capítulo II).

En el caso de *B. pertussis*, las condiciones de secreción del SSTT difieren entre la población bacteriana circulante y las cepas adaptadas al laboratorio. Por ejemplo, la expresión *in vitro* de Bsp22 se detectó en grandes proporciones en aislamientos clínicos irlandeses, pero no en las cepas adaptadas al laboratorio (71). El mismo resultado fue confirmado por nuestro grupo de investigación, donde además se demostró que la expresión de las proteínas asociadas al SSTT se pierde luego de pasajes *in vitro* en el laboratorio pero se recupera cuando la bacteria toma contacto con el hospedador. Esta activación *in vivo* se observó no solo para aislamientos clínicos sino también para cepas vacunales, sugiriendo una respuesta adaptativa de este patógeno (81).

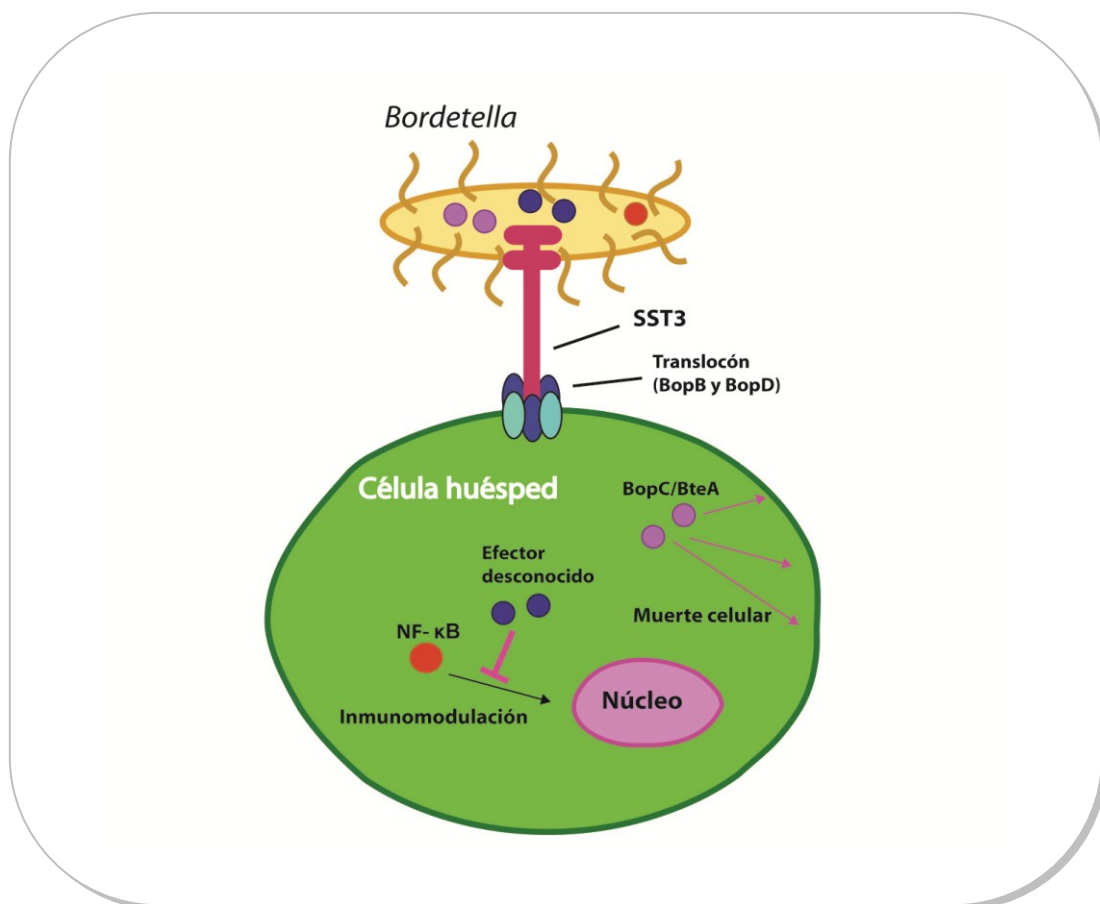


Figura 2. Sistema de Secreción de Tipo III en *Bordetella*. Adaptado de Abe *et. al.*, Microbiol Immunol, 2008.

Regulación de la expresión de factores de virulencia a través de un sistema de dos componentes

La expresión de la mayoría de los factores de virulencia antes descritos está regulada por un sistema de dos componentes al que se denomina BvgAS (50), el cual permite una variación

dinámica de la expresión génica en respuesta a las señales provenientes del entorno. Esto a su vez determina la capacidad de *B. pertussis* de oscilar entre distintos estados fenotípicos en cuyos extremos se encontraría, por un lado, el fenotipo virulento (más conocido como fase virulenta o Bvg⁺) y por otro el avirulento (conocido como fase avirulenta o Bvg⁻). Así, la fase virulenta se caracteriza por la expresión de un grupo específicos de genes de virulencia y la represión de otros. Entre los primeros se encuentran la mayoría de los factores de virulencia de *B. pertussis* antes descritos cuya activación no ocurre en forma simultánea sino de manera secuencial, pudiendo encontrar genes de activación temprana, intermedia y tardía de acuerdo a la etapa de la infección (50). Sin embargo, las señales *in vivo* que determinan el pasaje de una fase a otra en relación a la infección no son conocidas, al igual que el significado de la fase avirulenta, sobre todo teniendo en cuenta que a *B. pertussis* no se la ha encontrado en otro nicho que no sea el hombre.

Experimentos realizados con mutantes de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* bloqueados en Bvg⁺ o Bvg⁻ demostraron que la fase Bvg⁺ es necesaria y suficiente para que se desarrolle la infección, mientras que la fase Bvg⁻ sería incapaz de iniciarla. Estos datos sugieren que la función de BvgAS sería fundamental durante procesos como la transmisión, la persistencia o la sobrevivencia fuera del huésped para el caso de *B. bronchiseptica*. Recientemente se ha identificado un modelo animal de transmisión que quizás de luz sobre estos aspectos (258) lo que deberá ser confirmado en futuras investigaciones.

1.5 Respuesta inmune frente a *B. pertussis*

Los estudios inmunológicos señalan la complejidad de la infección por *B. pertussis*, en la cual parece no haber un único perfil de respuesta relevante sino que diversos mecanismos inmunológicos son capaces de brindar protección contra la enfermedad (178). Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre frente a otros patógenos, en *B. pertussis* no existe un antígeno dominante sino que la respuesta a distintos antígenos y factores de virulencia de la bacteria parecen tener una contribución, existiendo cierto grado de redundancia entre los mismos. La información disponible señala que tanto la inmunidad humoral como la celular son relevantes en la resolución de la infección participando ambos tipos de respuestas en la inmunidad conferida por las vacunas (144, 178, 180).

La mayor parte del conocimiento alcanzado sobre la respuesta inmunológica frente a *B. pertussis* proviene del estudio en modelos animales. El modelo más ampliamente utilizado para estos estudios es el modelo murino de infección intranasal o por aerosolización de una suspensión bacteriana (178). A pesar de la ausencia de tos, este modelo reproduce varias de

las características de la enfermedad incluido el ciclo de proliferación y eliminación bacteriana, la restricción de la infección al tracto respiratorio, el aumento de la severidad en animales jóvenes y varios de los cambios fisiológicos sistémicos como la leucocitosis y la hipoglucemia. El modelo incluso permite evaluar la eficacia de vacunas tanto celulares como acelulares (94, 181).

Para realizar una breve revisión sobre el conocimiento existente de respuesta inmune innata y adaptativa frente a *B. pertussis* nos referiremos primero a datos provenientes del estudio sobre la infección, y luego a la respuesta observada frente a la vacunación. Estos datos provienen tanto de estudios clínicos como de modelos animales.

1.5.1 Respuesta inmune innata

Dentro de las células que juegan un rol en la respuesta innata frente a *B. pertussis* se encuentran:

Macrófagos. Estudios *in vitro* e *in vivo* empleando el modelo de infección en animales han revelado que *B. pertussis* es capaz de persistir en los macrófagos (78, 232). Estos hallazgos indicarían que estas células pueden proporcionar un nicho intracelular para extender la infección y diseminarse a otros huéspedes susceptibles. La mayor parte de las bacterias que son fagocitadas son destruidas dentro de los compartimentos ácidos. Sin embargo, un grupo de bacterias elude la destrucción pudiendo multiplicarse y residir en los compartimentos no ácidos (151).

Se ha observado en ratones que los macrófagos contribuyen también a la inmunidad protectora ya que su depleción en las vías aéreas conduce a un incremento de la infección causada por *B. pertussis* (44). La capacidad de destrucción bacteriana de los macrófagos se ve aumentada por IFN- γ (163) e IL-17 (115), a través de un mecanismo que puede ser tanto dependiente como independiente de ON. Esto proporciona parte de la evidencia sobre la importancia de las células Th1 y Th17 en la eliminación de las bacterias (75).

Células dendríticas (CD). Las CD inmaduras residentes y las infiltradas del tracto respiratorio son las responsables de sensar los patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*) y los factores de virulencia de *B. pertussis*. Este reconocimiento promueve señales pro-inflamatorias que resultan ser cruciales para gatillar la producción temprana de citoquinas y quimiocinas. Esta etapa se acompaña de la infiltración de leucocitos, seguida por la activación de células T. La unión del LPS a los TLR4 de las CD promueve la maduración de las mismas y la secreción de IL-12 e IFN- γ (17), que lleva a la

inducción de células Th₁ las cuales ayudan a mediar la eliminación de la bacteria. Las CD que son activadas por la AC-Hly también promueven la inducción de células Th₁₇ específicas, las cuales actúan junto con las células Th₁ para eliminar a las bacterias.

Neutrófilos. *B. pertussis* puede sobrevivir dentro de estructuras subcelulares en los neutrófilos (150), aunque estos no actuarían como los macrófagos en ser reservorios intracelulares de la bacteria debido a su corta vida media. Sin embargo, los neutrófilos sí juegan un rol en la destrucción de bacterias fagocitadas. Los neutrófilos infiltran los pulmones desde los 5 días post-infección (7) y parecen ser importantes en el control de la infección en ratones inmunes, posiblemente a través de la captación mediada por anticuerpos y la muerte intracelular (7).

Células NK. Las células NK luego de la infección por *B. pertussis* proporcionan la fuente inicial de IFN- γ , el cual es esencial para contener las bacterias dentro del tracto respiratorio (39) y para promover una respuesta Th₁ responsable de la eliminación bacteriana (18). La depleción de las células NK lleva a la diseminación de la bacteria en el hígado (39) y a la reducción de las células Th₁ y al aumento de la respuesta Th₂. Estos resultados marcan el rol de las células NK en la protección y regulación de las respuestas Th (179).

Además de estas células existen otros mecanismos de defensa de la respuesta inmune innata entre los que se encuentran la secreción de **péptidos antimicrobianos** y **proteínas del complemento**. Todos estos elementos participan en las defensas del huésped contra la infección pero no son suficientes para eliminar al patógeno y controlar efectivamente la infección con *B. pertussis*, necesitando de una respuesta inmune adaptativa.

1.5.2 Respuesta inmune adaptativa

Inmunidad humoral

La infección natural con *B. pertussis* induce la formación de IgG e IgA en ratones y humanos. La IgA secretoria (IgA-S) ha sido detectada en las secreciones de la mucosa antes que la IgG en suero, sugiriendo que puede tener un rol importante en el control de la infección de *B. pertussis* (110).

En humanos, los anticuerpos IgA e IgG que están presentes en el pulmón tendrían un rol más relevante que los que se encuentran en circulación (116). Sin embargo, algunos estudios mostraron que la severidad de pertussis es menor en individuos con altos niveles de anticuerpos séricos contra PTx y PRN (240). Los anticuerpos anti-FHA parecerían tener poca relevancia según lo observado en los estudios clínicos. Más aún, parecería que lo más efectivo

sería una combinación de anticuerpos lo cual estaría de acuerdo con los ensayos clínicos de las vacunas acelulares de 3 y 5 componentes.

Los hallazgos **en ratones** defectivos en inmunoglobulinas mostraron que cuando estos animales son inmunizados con una vacuna acelular o celular no son capaces de eliminar a las bacterias del huésped, sugiriendo el rol de los mismos en la protección (144). Todos estos datos muestran que los anticuerpos juegan un rol importante en la defensa contra el patógeno aunque no hay un correlato directo entre protección y título de anticuerpos. De hecho, recientemente se ha establecido que la respuesta humoral por sí sola no alcanza para brindar una protección completa frente a la infección por *B. pertussis* (116).

Inmunidad celular

Si bien al inicio los estudios sobre la inmunidad protectora contra pertussis se centraron en el análisis de la respuesta de anticuerpos en suero, existe evidencia creciente de que la inmunidad celular es necesaria para el control efectivo de la infección inducida por *B. pertussis*.

En humanos, la infección por *B. pertussis* da como resultado la producción de células T CD4⁺ específicas para los antígenos PTx, FHA y PRN (59, 223). Más aún, se encontró que en sangre de bebés que padecían tos convulsa, las células T presentes secretaban IFN- γ e IL-2, pero poco o nada de IL-4 o IL-5 (223). Estos resultados, que han sido confirmados por otros estudios (102, 167), sugieren que durante la infección por *B. pertussis* se desencadena una respuesta de tipo Th1. Por otra parte, estudios recientes han sugerido que las células Th17 también son inducidas en respuesta a la infección con *B. pertussis* (115).

En ratones, las células T $\gamma\delta$ son reclutadas tempranamente a los pulmones luego de la infección con *B. pertussis* (172). Por otra parte, células CD4⁺ específicas de antígeno de ratones infectados o convalecientes secretan IFN- γ y/o IL-17, lo que sugiere que las células Th1 y Th17 son inducidas por la infección con *B. pertussis*, al igual que en humanos (62, 179). El IFN- γ producido por las células Th1 activa la producción de ON por los macrófagos, el cual ayuda a eliminar la bacteria (40, 245). Curiosamente, ratones IFN- γ ^{-/-} pueden eliminar a la bacteria si sobreviven a la infección inicial aunque carezcan de una respuesta Th1 y no desarrollen una respuesta Th2 (164). Esta eliminación de la bacteria probablemente ocurra a través de la función de las células Th17. Las células CD4⁺ que producen IL-17 son inducidas durante la infección (7, 62, 70) y su inducción es impulsada por las citoquinas de la respuesta innata, IL-1 e IL-23. Estas células CD4⁺ productoras de IL-17 son críticas para la eliminación de *B. pertussis* mediada tanto por macrófagos como por neutrófilos (115, 143).

Por otra parte, luego de la infección primaria con *B. pertussis* en ratones se producen muy pocas células Th2. Más aún, ratones IL-4^{-/-} eliminan la bacteria de la misma manera que los ratones salvajes (173). Por lo tanto, la inducción de una inmunidad adaptativa eficaz contra *B. pertussis* requiere tanto de células Th1 como Th17.

En la **Figura 3** se muestra la respuesta inmune del huésped frente a *B. pertussis* en el modelo murino.

En relación a la inmunidad inducida por vacunación, resulta importante tener en cuenta que en la actualidad existen dos tipos de formulaciones vacunales, una denominada celular o wP (del inglés, *whole cell pertussis vaccine*) constituida por una suspensión de bacterias enteras muertas por calor y detoxificadas, y otra acelular denominada aP (del inglés, *acellular pertussis vaccine*) o de componentes constituida por antígenos purificados (ver más adelante). La respuesta inmune que generan ambos tipos de vacunas está representada en la **Figura 4**. En

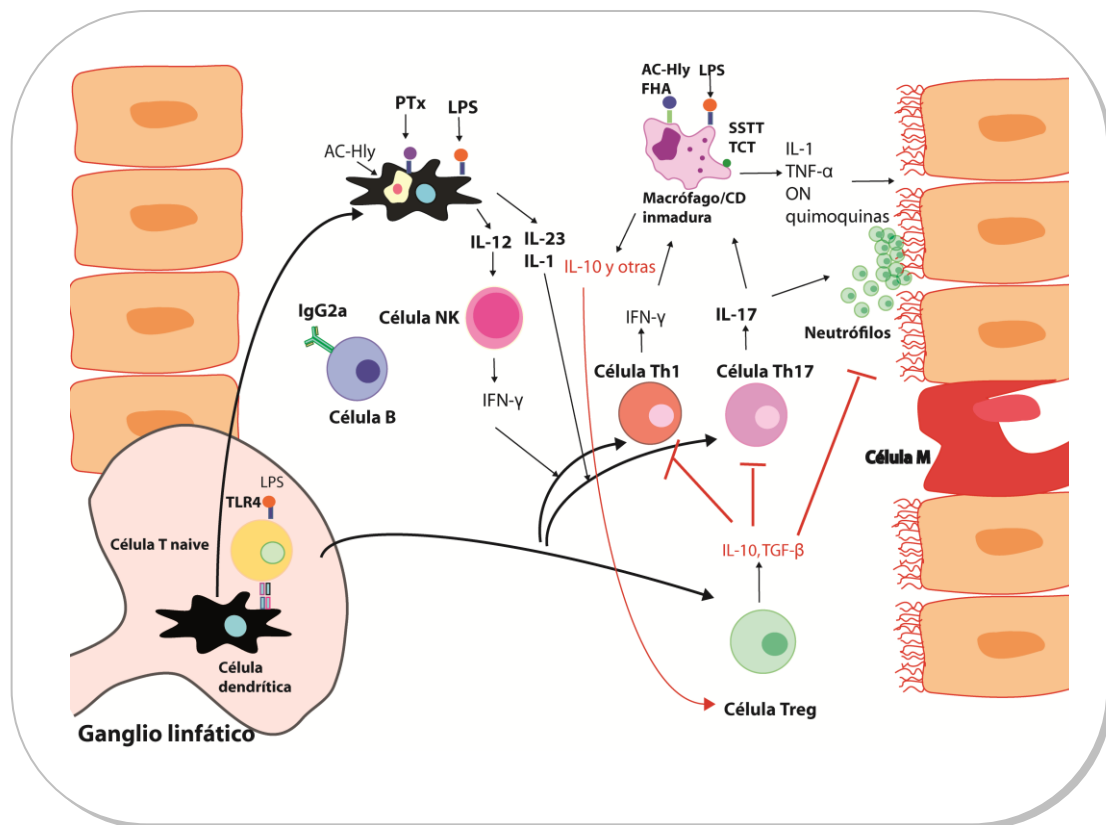


Figura 3. Inmunidad del hospedador frente a *B. pertussis* en el modelo murino. La bacteria se une a células epiteliales ciliadas y es captada por células del sistema inmune innato como macrófagos (Mac) y células dendríticas inmaduras (CDi). Las CD procesan y presentan antígenos bacterianos a las células T. La producción de IL-12 por las células innatas resulta en la polarización de la respuesta de células T hacia el subtipo Th1, y las interleuquinas IL-1β e IL-23 promueven la diferenciación de las células Th17. En la infección temprana las respuestas locales de células T son reprimidas por las células innatas secretoras de IL-10 en respuesta a FHA, AC-Hly o SSTT, y por las células Treg. El ON y las citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 y TNF-α son inducidas por LPS, TCT, AC-Hly y PTx. El IFN-γ secretado por las CD y las células NK y luego por las células Th1, estimula el reclutamiento y la activación de Mac y neutrófilos y ayudan a las células B a secretar los anticuerpos IgG2a. La IL-17 promueve el reclutamiento y activación de neutrófilos. Las bacterias opsonizadas o no opsonizadas son captadas por neutrófilos y Mac y son eliminadas por el ON o por los intermediarios reactivos de oxígeno. Las flechas negras representan respuestas inmunes inflamatorias/efectoras y las rojas representan respuestas anti-inflamatorias e inmunesupresivas. Adaptado de Higgs *et. al*, Nature, 2012

las vacunas wP se incluyen PAMPs tales como LPS, que inducen la activación de las interleuquinas IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23 por las CD y los macrófagos. Estas citoquinas proinflamatorias promueven la inducción de células Th1 y Th17 a partir de células T *naive*. El IFN- γ y la IL-17 estimulan la producción de anticuerpos opsonizantes y la activación de macrófagos y neutrófilos que ayudan a lisar las bacterias que persisten dentro de las células (116). Por el contrario, las vacunas aP, que se administran junto con el hidróxido de aluminio como adyuvante, carecen de PAMPs pero estimulan la producción de IL-1, y en consecuencia de células Th17. Las células Th17 ayudan al reclutamiento y activación de neutrófilos, los cuales captan y aniquilan a *B. pertussis*. Las células Th2 son también inducidas por la influencia de la IL-4 y proporcionan ayuda a las células B para la secreción de inmunoglobulina E (IgE) e IgG1 e IgG3, las cuales evitan fundamentalmente la adherencia de la bacteria al epitelio respiratorio.

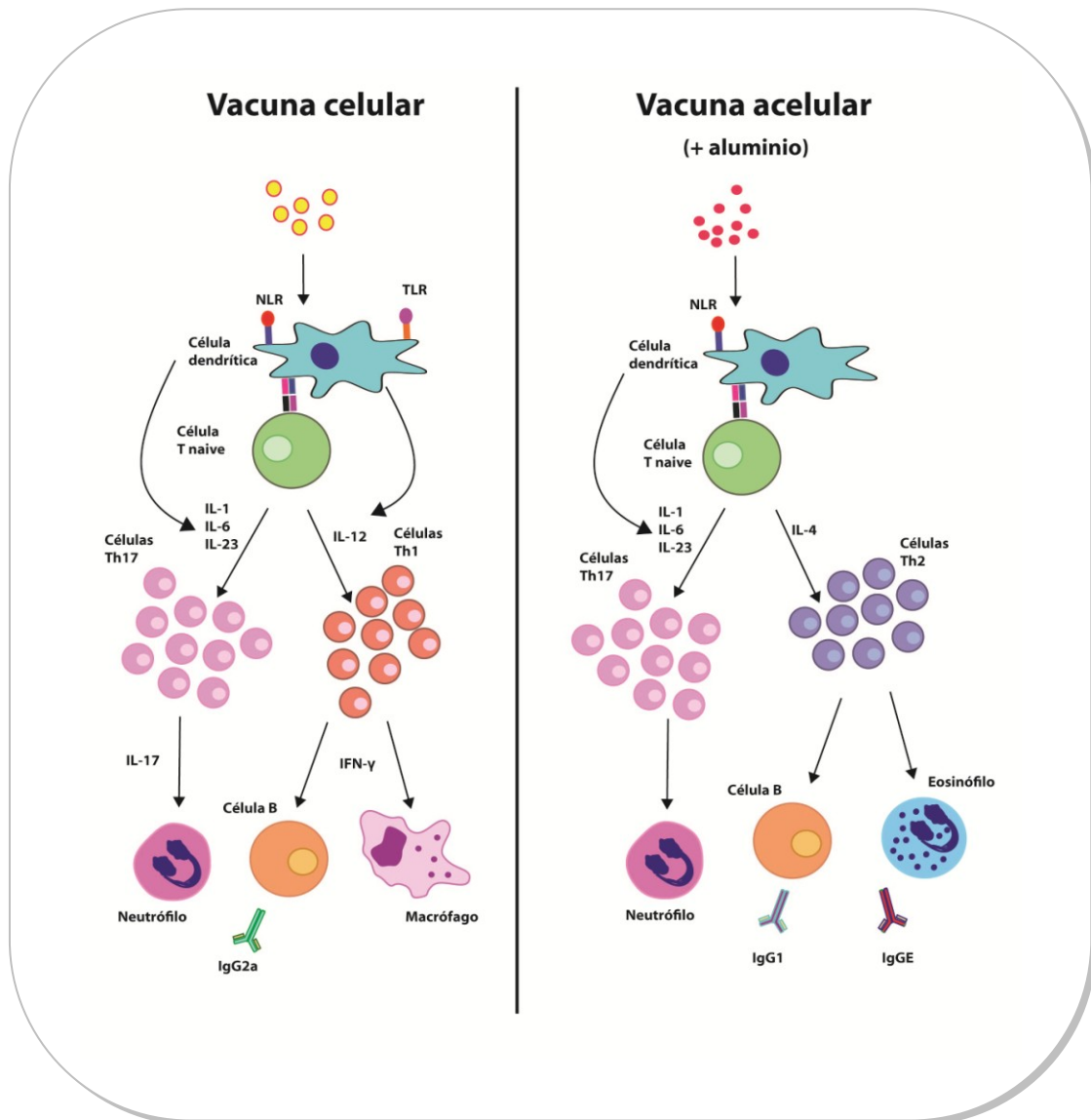


Figura 4. Mecanismos de inmunidad inducidos por las vacunas celular y acelular contra *B. pertussis*. NLR, NOD-like receptor, TLR, Toll-like receptor. Adaptado de Higgs *et. al*, Nature, 2012

1.6 Quimiopprofilaxis

Para el tratamiento de esta patología y para el control del foco de infección, se emplean agentes antimicrobianos para limitar la transmisión a los contactos susceptibles. Los antimicrobianos recomendados son los macrólidos como eritromicina, azitromicina o claritromicina. En caso de intolerancia a los mismos puede emplearse trimetoprima sulfametoxazol (TMS). La duración del tratamiento es de 7 o de 14 días según el antimicrobiano que se emplee. Si el tratamiento se comienza en la primera semana de iniciados los síntomas, su efecto es el de reducir la duración y severidad de los mismos. Como a veces esto no es posible debido a las demoras en consultar al médico, en la sospecha del

caso y en su confirmación en el laboratorio, el objetivo del tratamiento con antibióticos se limita entonces a prevenir la diseminación de la enfermedad. Por esto es que se recomienda la administración de antibióticos en las primeras cuatro semanas de iniciados los síntomas y en las seis a ocho semanas para individuos que están en contacto con personas de alto riesgo como niños, mujeres en el tercer trimestre de embarazo y profesionales de la salud (114).

1.7 Vacunas

Debido a que los agentes antimicrobianos no previenen la infección, la medida más importante para el control y prevención de la infección con *B. pertussis* es la vacunación. Como ya se ha mencionado, existen en la actualidad dos tipos de vacunas: las vacunas celulares y las acelulares. En general, estas formulaciones se aplican de forma combinada como mínimo con los toxoides diftérico y tetánico, dando lugar a las vacuna DTwP y DTaP o dTap, según si el componente pertussis es celular o acelular (en dosis pediátrica (DtaP) o adolescente-adulto (dTap), respectivamente).

La historia de las vacunas celulares se remonta al año 1906 cuando los investigadores Joules Bordet y Octave Gengou identificaron y aislaron en el laboratorio al agente causal (29). Fue recién en los 40's que Perla Kendrick y colaboradores formularon la vacuna pertussis junto a los toxoides tetánico, diftérico y adyuvantes (DTwP) (136). En base a los buenos resultados de eficacia en la década del 40' y 50', la vacuna DTwP fue incluida en los programas masivos de inmunización. Dicha incorporación condujo a una disminución significativa de la morbilidad y la mortalidad debido a pertussis (169).

Este rotundo éxito fue al poco tiempo ensombrecido por los reportes de reacciones adversas asociadas con la vacunación las cuales incluían la aparición de un enrojecimiento, hinchazón, dolor en el sitio de inyección, o fiebre, hasta encefalitis, encefalopatía, daño cerebral permanente y muerte (73, 246). Esto generó preocupación en el área de la salud pública y en la población en general y como consecuencia de ello a mediados de los años 70' algunos países como Japón, Suecia e Inglaterra dejaron de emplear estas formulaciones, lo que llevó al aumento de la incidencia de la enfermedad. Este acontecimiento impulsó la búsqueda y desarrollo de vacunas anti-pertussis conteniendo solo factores asociados con la protección en ausencia de aquellos componentes que ejercían reacciones adversas (169). Comenzó así el desarrollo de vacunas acelulares o de componentes. La primera formulación consistió en la PTx. Luego se desarrollaron las vacunas compuestas por dos componentes, PTx y FHA, tres componentes PTx, FHA y PRN y cinco componentes: PTx, FHA, PRN, fimbrias Fim2 y Fim3.

Para estas formulaciones se observó una marcada disminución de la magnitud y de la frecuencia de aparición de los efectos adversos llevando a la aceptación de las vacunas anti-pertussis por parte de la población (**Tabla IV**).

Tabla IV. Efectos adversos asociados a la administración de las vacunas DTaP y DTP

Categoría	% de niños con reacción a	
	DTaP	DTP
Fiebre > 38 °C	4,2	27,3
Agitación	6,6	20,6
Somnolencia	29,9	43,5
Anorexia	9,3	19,5
Vómitos	6,3	7,0
Hinchazón	8,7	39,7
Dolor	3,8	27,7

Todas estas formulaciones son eficaces siendo la de cinco componentes la que induce niveles de protección similares a los de la vacuna celular contra pertussis (99, 195).

No existe un consenso internacional respecto a qué vacuna usar, ni qué esquema de vacunación seguir, sino que cada país decide qué aplicar y cómo aplicarlo. En el caso particular de las vacunas acelulares, tampoco existe consenso sobre qué formulación usar, pero está aceptado que las de mayor componentes son las más eficaces (99). Por lo general, todos los esquemas de vacunación incluyen tres dosis administradas durante el primer año de vida (generalmente a los 2, 4 y 6 meses de edad).

Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la inclusión de una dosis de refuerzo entre los 18 y 24 meses (<http://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/pertussis>) y varios países incluyen además una segunda dosis de refuerzo al ingreso escolar. En la **Tabla V** se muestran esquemas de vacunación de algunos países de Europa y el tipo de vacuna recomendada en cada caso.

Tabla V. Programas de vacunación hasta el año 2010 en 7 países de Europa.

País	Año	Calendario de vacunación	Calendario de refuerzos
Finlandia	1952	3, 4 y 5m DTP	20-24m DTP
	2003	3, 4 y 5m DTP	20-24m DTP y 6a dTap

	2005	3, 4 y 12m DTaP	4a dTaP y 14a dTap
	1953	3, 4 y 5m DTP	4a DTP
Holanda	2001	2, 3, 4, 11m, DTP-IPV-Hib	4a, DTP, aP
	2006	2, 3, 4, 11m, DTP-IPV-Hib	4a, dTaP
	1959	3, 4, 5m, DTP-IPV	16–18m, DTP-IPV
Francia	1995	2, 3, 4m, DTP-IPV-Hib	16–18m, DTP-IPV-Hib
	2008	2, 3, 4m, DTaP-IPV-Hib	16–18mo, DTaP-IPV-Hib; 11–13a, DtaP-IPV; 26–27a, dTap-IPV
	1995	2, 3, 4m, DTaP-IPV-Hib-HB	11–14m, DTaP-IPV-Hib-HB
Alemania	2000	2, 3, 4m, DTaP-IPV-Hib-HB	11–14m, DTaP-IPV-Hib-HB; 9–17a, dTap o dTap-IPV
	2009	2, 3, 4m, DTaP-IPV-Hib-HB	11–14m, DTaP-IPV-Hib-HB; 5–6a, dTap; 9– 17a, dTap o dTap-IPV
	1953	3, 5, 12m, DTP	
	1976-	No hubo vacunación contra	
	1996	pertussis	
Suecia	1996	3, 5, 12m, DTaP	
	1998	3, 5, 12m, DTaP-IPV-Hib	
	2007	3, 5, 12m, DTaP-IPV-Hib	5–6a, DTaP-IPV; 14–16a, dTap
	1961	5, 6, 7, 15m, DTP	
Dinamarca	2004	3, 5, 12m, DTaP-IPV/HIB	5a, Tdap-IPV
	1950	3, 5, 10m DTP	
UK	1990	2, 3, 4 m DTP	
	2004	DTaP-Hib	aP sumada a DT preescolar

m: meses de edad, a: años de edad DTP, IPV: vacuna Polio inactivada, Hib: vacuna Haemophilus influenzae, tipoB. HB: Hepatitis B, aP: pertussis acelular, DTaP: Difteria- Tétanos- Pertussis acelular. dTap: Difteria- Tétanos- Pertussis acelular (con cantidades reducidas de los componentes diftéria y pertussis). Fuente: Advani *et. al*, J Clin Microbiol, 2013.

En nuestro país, el esquema de vacunación contra pertussis incluye tres dosis primarias con vacuna pentavalente DTP-Hib-HB (Difteria, Tétanos, Pertussis, *H. influenzae* tipo b y Hepatitis B) a los 2, 4, 6 meses, dos refuerzos a los 18 meses con vacuna cuádruple bacteriana DTP-Hib, y a los 6 años con vacuna triple bacteriana DTP. Recientemente se ha incluido en el calendario un nuevo refuerzo a los 11 años con una vacuna triple bacteriana acelular Tdap (http://www.msal.gov.ar/htm/site/vacuna_cal2.asp).

Los programas de inmunización masivos han sido muy exitosos ya que han reducido significativamente la morbi-mortalidad asociada a pertussis. Sin embargo, en las últimas dos

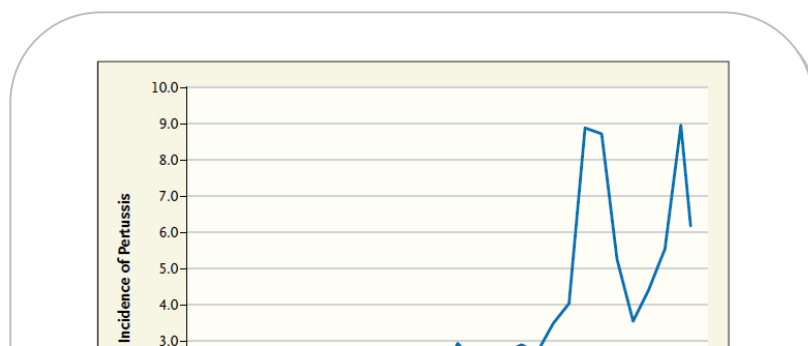
décadas, muchos países incluidos Estados Unidos, Francia, Canadá y Australia, han registrado un incremento significativo en el número de casos notificados de tos convulsa, en proporciones importantes para los infantes pero también para los adolescentes y adultos (20, 98, 175, 192). Nuestro país no ha sido ajeno a esta situación y desde el año 2002 viene registrando un sostenido aumento de casos.

En respuesta a esta situación epidemiológica, las autoridades sanitarias de varios países han incluido nuevos refuerzos empleando vacunas acelulares en las que se ha disminuido la cantidad de PTx y toxoide diftérico para disminuir la severidad de las posibles reacciones adversas (38). La magnitud del incremento no es del todo conocida ya que existe sub-diagnóstico y sub-reporte para esta enfermedad (51, 77).

1.8 Estado actual de la epidemiología de pertussis

La OMS ha considerado a esta enfermedad como resurgente y ha estimado que en el 2008 el número de casos fue aproximadamente de 16 millones con 195.000 muertes. En la actualidad pertussis constituye una de las cinco primeras causas de mortalidad infantil asociadas a enfermedades infecciosas. Aproximadamente entre el 50% y el 75% de los niños menores de 6 meses que padecen pertussis requieren hospitalización. El 90% de las muertes debidas a esta patología ocurren en los lactantes no inmunizados (58, 169). Si bien la mayoría de los casos se registran en los niños pequeños y más específicamente en los que por la edad no han podido completar los esquemas de vacunación, también se registran casos en alza en la población adolescente y adulta. Este aumento en la incidencia de la infección en la población adolescente adulta es más evidente en los países con coberturas de vacunación que superan el 85% (267).

En varios países incluidos los desarrollados se ha documentado un resurgimiento de la tos convulsa. En la **Figura 5** se muestra el aumento de la incidencia de pertussis en Estados Unidos. En los últimos años, Estados Unidos ha experimentado el brote epidémico de coqueluche más grande de los últimos 50 años. Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), el recuento provisional de los casos reportados durante el año 2012 superó los 41.880, más del doble de los registros del 2011 (18.719) y muy por encima del récord anterior de 27.550 en 2010. En 2012, la tasa de incidencia nacional era 13,4 por 100.000 con valores muy superiores en varios estados de Estados Unidos.



En ese país, pertussis es ahora un problema de dos grandes grupos de edad: los niños mayores de 10 años y los menores de 5 meses, a diferencia de lo que ocurría en la era prevacunal en la cual el 93% de los casos correspondía a niños menores de 10 años (108, 265). Este aumento de la incidencia de pertussis entre individuos con mayor edad facilita la circulación de *B. pertussis* en la población y su transmisión. En la **Figura 6** se muestra la incidencia de pertussis por grupo de edad en Estados Unidos.

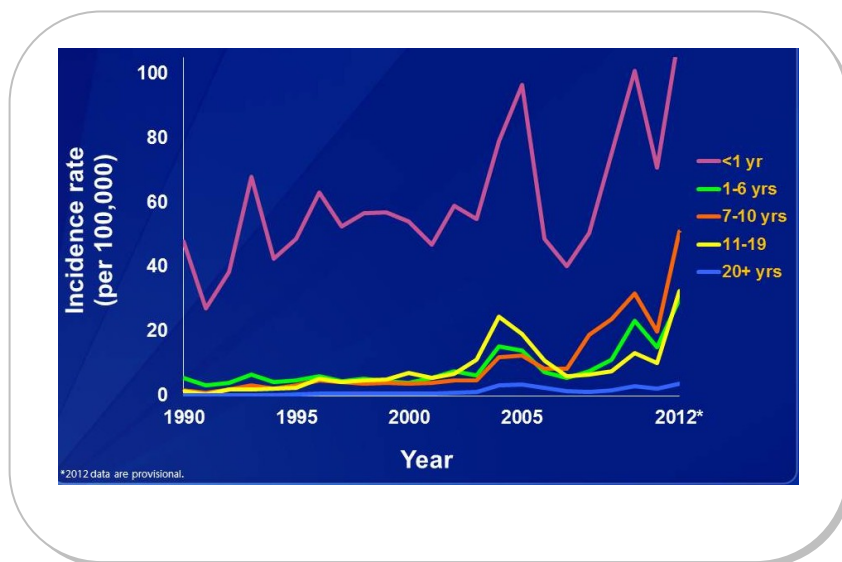


Figura 6. Incidencia de pertussis cada 100.000 habitantes en Estados Unidos por grupo de edad, 1990-2012. (<http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html>)

Además de Estados Unidos, varios son los países que han registrado esta situación, entre ellos Holanda, Bélgica, España, Alemania, Francia, Australia, Canadá, y la Argentina (51, 242). En Holanda en el año 1996 tuvo lugar un brote epidémico de tal escala que la tasa de incidencia resultó ser 5 veces mayor que las de epidemias anteriores (60). La Argentina no es ajena a esta situación y viene registrando desde el año 2002 un aumento sostenido del número de casos. Si bien las coberturas de vacunación según el Informe Global se encuentran en ascenso durante los últimos años, en nuestro país la cobertura anti-pertussis se encuentra por debajo del nivel óptimo (**Figura 7**). Esta situación implica un riesgo de aumento de la incidencia y ocurrencia de brotes de esta patología, por acumulación de susceptibles. Este aumento de la incidencia se ha sostenido en el tiempo, como puede observarse en la **Figura 8**. Varios brotes se han registrado en distintas localidades y provincias de nuestro país (124).

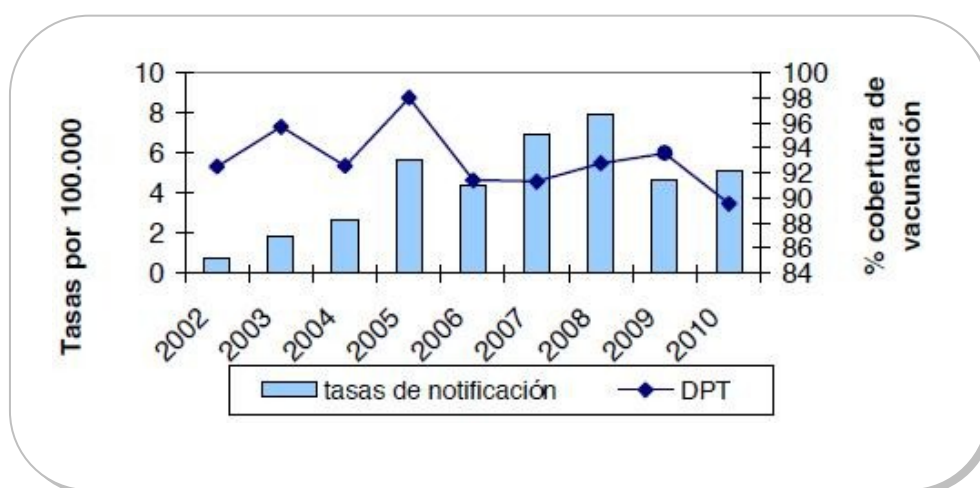


Figura 7. Tasa de notificación y cobertura DTP. Años 2002-2010. Argentina. Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica por Laboratorios de Argentina.

La distribución por grupo de edad, para lo que se ha tomado como base las notificaciones realizadas por SIVILA, se ha concentrado en los menores de 6 meses, representando el grupo de edad de 0 a 2 meses el 40,37% del total de las notificaciones para todos los grupos de edad (**Figura 9**). Cabe destacar que dentro de este grupo, la mayoría corresponden a niños no vacunados o inmunizados con menos de 3 dosis. No obstante, también se han registrado casos con tres y cuatro dosis con edades en la que no es esperable pérdida de inmunidad (124). Estos datos no deben descuidarse, sobre todo en el momento de diseñar una nueva estrategia para mejorar el control de la enfermedad.

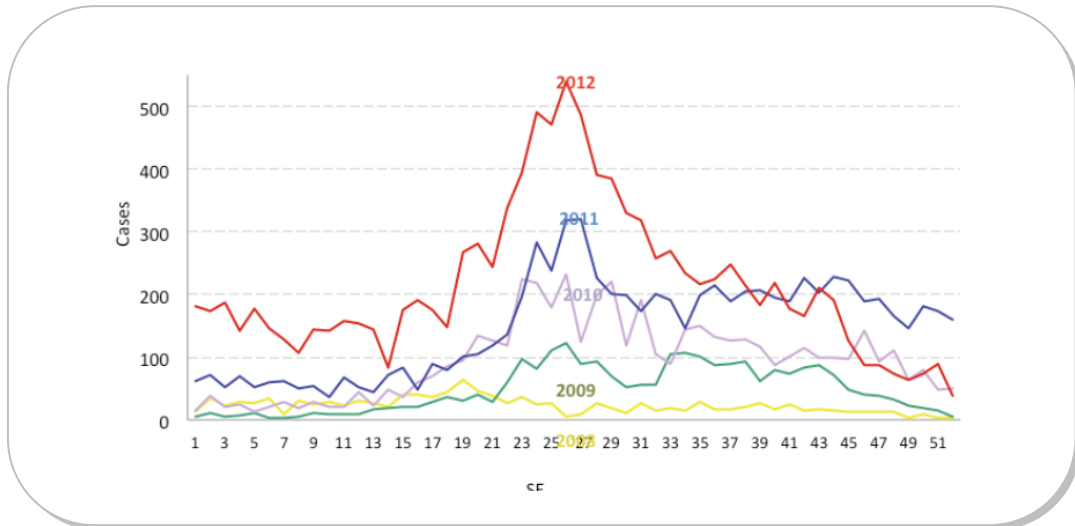


Figura 8. Fichas notificadas para estudio de Coqueluche en Argentina. Semanas 1-52. 2008-2012 (www.vacunas-vacsal.org.ar)

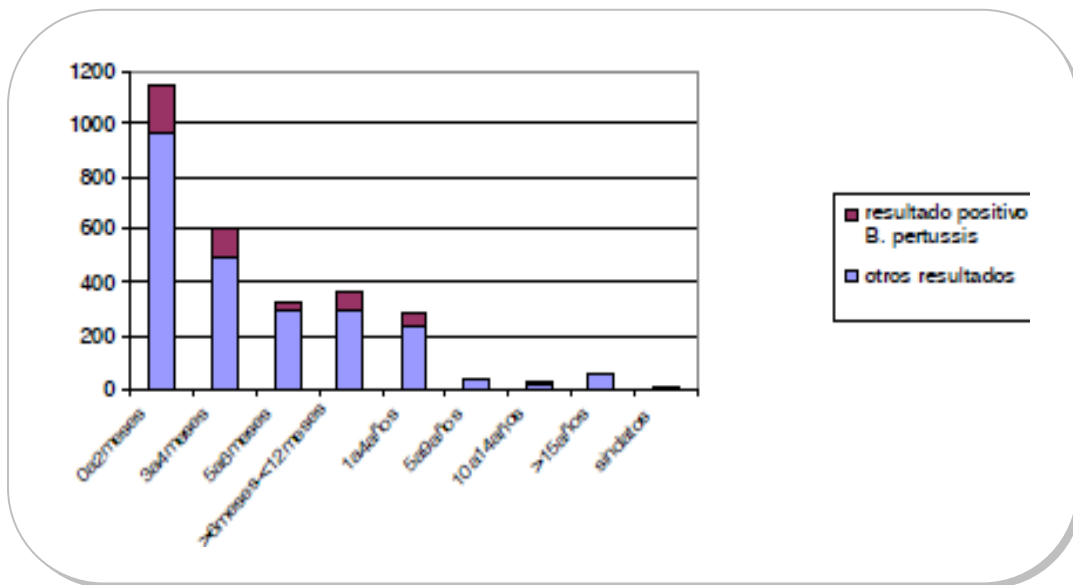


Figura 9. Número de notificaciones y resultados positivos *B. pertussis* por grupo de edad en Argentina. Año 2011. Fuente: SIVILA.

1.9 Resurgencia de la enfermedad.

Varias son las razones que se han propuesto para esta situación de resurgencia de la enfermedad. Las causas principales a este fenómeno se dividen en tres grandes grupos: definición de caso y diagnóstico incierto, pérdida de inmunidad luego de la vacunación, y cambios genéticos en *B. pertussis*.

1) Definición de caso y diagnóstico incierto

La OMS recomienda emplear como definición clínica de caso la siguiente: todo paciente que presenta una tos de 14 días de duración y al menos uno de los siguientes síntomas o signos: paroxismos de tos, estridor inspiratorio, cianosis, apneas o vómitos luego de toser sin otra causa aparente. La confirmación de la infección puede realizarse mediante una prueba en el laboratorio o por presentar síntomas y ser contacto de un caso confirmado de coqueluche (55). Esta definición no tiene en cuenta a la enfermedad más leve, lo cual podría dar una sobreestimación de la eficacia de las vacunas. Por otro lado, si bien los métodos de PCR han sido de gran ayuda en el diagnóstico de pertussis, estos deben realizarse siguiendo los protocolos recomendados por el CDC, la OMS o por Laboratorios Nacionales de Referencia (124) ya que aquellos métodos que solo usan como secuencia blanco la secuencia de inserción IS481, puede detectar ADN de *B. holmesii* además de *B. pertussis* (218). Debido a que *B. holmesii* no se puede prevenir con las vacunas acelulares de pertussis, la medida adicional en que este patógeno está representado en los ensayos anteriores tendería a subestimar la eficacia de las vacunas. Lo mismo sucede con un método de PCR que detecta *B. parapertussis* (55).

2. Pérdida de la inmunidad adquirida por infección o vacunación

La inmunidad conferida por las vacunas o por la infección no es de por vida. Se estima que la duración de la inmunidad adquirida ya sea por infección natural o por vacunación dura entre 4-20 y 4-12 años, respectivamente (259). Esto hace que adolescentes y adultos se vuelvan susceptibles con el tiempo constituyéndose además en una fuente de contagio para los niños más pequeños (104).

Se han reportado datos que muestran que las vacunas celulares inducen una inmunidad más duradera que las vacunas acelulares, aumentando la posibilidad de que el cambio de wP a aP haya agravado el problema de pertussis (99, 235). El aumento de la incidencia de pertussis en EEUU y otros países que emplean en sus dosis primarias vacunas acelulares en niños de 7-10 años y de 13-14 años sugiere que la inmunidad después de la inmunización con una vacuna aP disminuye mucho antes de lo esperado. La preocupación por la corta duración de la inmunidad luego de la vacunación contra pertussis salió a la luz en el año 2006, cuando se reportó un incremento específico de la incidencia de la enfermedad en niños suecos de 6-8 años de edad, los cuales en su mayoría habían sido inmunizados con la vacuna acelular DTaP a los 3, 5 y 12 meses de edad (100). Los autores concluyeron que probablemente sería necesario un refuerzo a los 5-7 años. En varios países de Europa se está sugiriendo la necesidad de refuerzos a lo largo de la toda la vida de forma de prolongar la duración de la inmunidad (277).

Esta pérdida de la inmunidad luego de la inmunización con vacunas acelulares de pertussis parece estar asociada a falencias propias de las vacunas en cuanto a su composición y dosis de inmunógenos (56, 57, 169, 195, 240).

Además de los problemas asociados a las vacunas es importante tener en cuenta que un esquema de inmunización incompleto genera protección incompleta. Al menos son necesarias 3 dosis de inmunizaciones para generar protección contra *B. pertussis* (133, 194). En un estudio realizado entre varios países, aproximadamente el 75% de los niños hospitalizados había recibido ninguna o una dosis única de la vacuna contra pertussis (147).

3. Polimorfismo en cepas de *B. pertussis*.

La disminución de la eficacia vacunal también se ha asociado a la aparición de variaciones genéticas de *B. pertussis* que han permitido la adaptación del patógeno a las vacunas actuales (87). Los cambios observados en las frecuencias alélicas en las poblaciones de *B. pertussis* preceden a la introducción de las vacunas acelulares y eran entonces presumiblemente impulsadas por la vacunación con wP. Las vacunas aP se introdujeron entre 1994 y 2005 en un gran número de países y pueden ejercer presiones selectivas que son cualitativamente y cuantitativamente diferentes de las wP. Las vacunas wP inducen un perfil de citoquinas Th₁, mientras que la respuesta después de la vacunación con vacunas aP muestra un perfil de Th₂ (116). Además, las vacunas wP inducen una respuesta inmune amplia, con relativamente bajos títulos contra antígenos individuales, mientras que las vacunas aP inducen una respuesta inmune contra solo unos pocos antígenos, pero con títulos más altos (64). Por lo tanto, la introducción de las vacunas aP podrían haber dado lugar a nuevas adaptaciones en la población de *B. pertussis*. Se ha sugerido que cepas adaptadas de *B. pertussis* expresan los factores de virulencia PTx y PRN antigénicamente distintos a los de las cepas incluidas en las vacunas. Este fenómeno se observó principalmente en Finlandia y los Países Bajos, pero en Argentina también se hallaron cepas antigénicamente distintas pre-vacunales (32, 134, 142, 183). Incluso con altas dosis de vacuna, la vacuna de uso local elimina rápidamente a las cepas vacunales pero no es eficaz en la eliminación de aislamientos de *B. pertussis* que expresan una PTx antigénicamente distinta, asignándole un rol también al polimorfismo observado en la PTx (101). Resultados similares se observaron al evaluar la capacidad protectora de la vacuna frente a aislamientos de *B. pertussis* conteniendo alelos de *prn* diferentes a los vacunales, en donde se observó que la vacuna vigente resultaba efectiva solo contra cepas que llevan el mismo alelo de *prn* pero no contra los aislamientos con alelos de *prn* diferentes (141).

Además, en estos países se hallaron cambios significativos no solo en la expresión sino también en la producción diferencial de proteínas en la población bacteriana que circula en la

actualidad respecto de aislamientos más antiguos como lo son las cepas vacunales o los aislamientos obtenidos en la era prevacunal. De esta manera, la adaptación de la población de *B. pertussis* parece haber afectado la eficacia de la vacuna y contribuido a la reemergencia. Durante la disminución de la respuesta inmune inducida por la vacuna, los aislamientos divergentes podrían producir una infección reduciendo así el tiempo en el que las vacunas son eficaces. Esto indicaría que la adaptación bacteriana y la pérdida de la inmunidad son dos caras de una misma moneda como se ha propuesto recientemente (185). Este tema será abordado en el Capítulo II ya que forma parte de los objetivos de este trabajo de tesis.

En resumen, las vacunas DTP generalmente tienen mayor eficacia que las vacunas DTaP. La eficacia de las vacunas se ha sobreestimado debido, al menos en parte, a la definición de caso empleada cuando se realizaron los ensayos clínicos. Otros factores asociados a fallas en las vacunas acelulares en cuanto a su composición, o a cambios genéticos en el microorganismo pueden contribuir al problema de la resurgencia de pertussis. De esta manera, el resurgimiento de pertussis en niños muy jóvenes y en los mayores de 10 años hace que la tos convulsa sea una enfermedad vigente en la cual es una necesidad prioritaria la reevaluación de los planes de vacunación.

1.10. Acciones y perspectivas.

Para superar el problema de la resurgencia de la enfermedad, es necesario reconocer que *B. pertussis* está circulando en todos los grupos de edad y, por lo tanto, con las herramientas actuales es necesario no solo alcanzar buenas coberturas en las dosis primarias sino también aplicar refuerzos sobre todo en la población que es fuente de contagio de los pequeños, los cuales representan la población más vulnerable de contraer la enfermedad y tener complicaciones. Resulta indispensable también desarrollar nuevas vacunas más efectivas y en lo posible que confieran inmunidad por más largo plazo y contra los alelos hoy circulantes. Esto podría lograrse identificando nuevos componentes o haciendo que las vacunas celulares contengan aislamientos circulantes pero tratando de disminuir la reactividad debida principalmente al LPS.

1.10.1 Efectivización del empleo de las vacunas actuales: administración de refuerzos

La GPI (del inglés, *Global Pertussis Initiative*) evaluó recientemente siete estrategias potenciales de vacunación contra la tos convulsa (**Tabla VI**) (267). Estas estrategias, que no son excluyentes entre sí, incluyen: la vacunación universal de adolescentes y/o adultos,

vacunación en capullo (vacunación de los padres y otras personas que estén en contacto directo con el recién nacido como abuelos y trabajadores de la salud), vacunación del personal de salud y cuidadores de niños pequeños, inmunización infantil temprana (desde el nacimiento hasta 1 mes de edad) e inmunización en mujeres embarazadas o durante el postparto (95).

Tabla VI. Estrategias de inmunización evaluadas por la GPI.

Estrategia	Objetivo primario	Objetivo secundario
Inmunización universal de adultos	Reducir la morbilidad en adultos, desarrollar inmunidad de grupo	Reducir la transmisión de <i>B. pertussis</i> a los lactantes
Inmunización selectiva de las nuevas madres, familiares y contactos cercanos de los recién nacidos (vacunación en capullo)	Reducir la transmisión de la enfermedad a los bebés	Reducir la morbilidad en adultos, especialmente los adultos jóvenes
Inmunización selectiva de los trabajadores de la salud	Reducir la transmisión de la enfermedad a los pacientes susceptibles	Reducir la morbilidad en los trabajadores de la salud
Inmunización selectiva de los trabajadores de cuidado infantil	Reducir la transmisión de la enfermedad a los bebés	Reducir la morbilidad en los trabajadores de cuidado infantil
Inmunización universal de los adolescentes	Reducir la morbilidad en adolescentes y adultos jóvenes; desarrollar inmunidad de grupo	Reducir la transmisión de la enfermedad a los bebés
Dosis universal de refuerzo en edad preescolar a los 4-6 años de edad	Reducir la morbilidad en los niños en edad escolar; desarrollar inmunidad de grupo	Reducir la transmisión de la enfermedad a los bebés
Reforzar y/o mejorar las estrategias actuales de inmunización infantil	Reducir la morbilidad y la mortalidad en lactantes, niños pequeños y niños	Reducir la circulación general de <i>B. pertussis</i>

Varios países están aplicando algunas de las estrategias mencionadas anteriormente, aunque todavía es temprano poder evaluar el resultado de la implementación de las mismas.

Argentina, Australia, Austria, Canadá, Francia, Alemania y Suiza incluyeron refuerzos de inmunización para adolescentes con vacunas acelulares (77). Para América del Norte, se acordó que el objetivo principal sea el desarrollo de inmunidad de por vida a la infección por *B. pertussis*. Esto se debería lograr mediante la introducción de refuerzos de vacunación en adolescentes y adultos.

Para la mayoría de los países de Europa, la mejor estrategia sería añadir una dosis al calendario existente mediante un refuerzo preescolar o adolescente. La vacunación de los trabajadores de la salud debe aplicarse en todos los países, de acuerdo con la directiva de la Comunidad Europea.

En Australia se ha retirado la dosis de la vacuna DTaP a los 18 meses de edad del calendario de vacunación y se ha sustituido la vacuna dT de los adolescentes de 15-19 años de edad con una vacuna DTaP.

En la Argentina y otros países de América han recomendado también la vacunación en el personal de salud, en mujeres embarazadas luego de la semana de gestación y en el postparto. En nuestro país se ha desarrollado un modelo matemático el cual permite predecir el impacto que tendrían distintas medidas de control en la población más vulnerable (0 a 1 año). Los resultados mostraron que la inclusión de un refuerzo a los 11 años disminuiría un 3% la incidencia de pertussis en los menores de 1 año. Por su parte, la aplicación de las dosis primarias a tiempo calendario (sin retrasos) la reduciría un 16%. Al aumentar la cobertura del 80% al 95%, la incidencia en la población vulnerable se reduciría significativamente (38%). Si el porcentaje de embarazadas inmunizadas alcanza el 50%, la reducción de los casos más graves en los infantes superaría el 43% (0 - 2 meses) (205).

1.10.2 Desarrollo de nuevas vacunas

El objetivo principal de las nuevas estrategias debe ser la reducción de pertussis entre los niños pequeños, en los que la enfermedad es más grave y a veces fatal. Un segundo objetivo debe ser la disminución de pertussis en adolescentes y adultos de forma de disminuir la circulación del patógeno.

En cuanto a las vacunas celulares, la mejora principal además de la incorporación de aislamientos locales debería ser la reducción de la reactogenicidad. Esto puede lograrse mediante la modificación del LPS de *B. pertussis* (85). Este enfoque ha mostrado ser efectivo para la vacuna contra los serotipos B de *Meningococco*. Otra opción sería disminuir el contenido de LPS en la formulación, estrategia utilizada en Brasil (279). Las vacunas wP también pueden mejorarse mediante el aumento de su contenido en antígenos de protección,

por ejemplo, mediante la construcción de cepas en las que se aumenta la transcripción de genes de virulencia.

Por otra parte, dada la creciente incidencia de la tos convulsa en poblaciones vacunadas y en adolescentes y adultos, es necesaria la investigación de estrategias para que las nuevas formulaciones acelulares sean capaces de inducir una protección perdurable en el tiempo y además protejan frente a cepas antigénicamente distintas. Para ello hay que tener en cuenta los hallazgos recientes sobre los mecanismos de la inmunidad inducida por las vacunas, especialmente el rol de los subtipos de células T. La disminución de la duración de la inmunidad inducida por las vacunas aP puede deberse a una menor eficacia de estas vacunas en comparación con las wP. Como mencionamos anteriormente, esta disminución también puede ser causada por la presión de selección y variación antigénica, que permiten que las cepas circulantes de *B. pertussis* escapen de la inmunidad inducida por los antígenos presentes en las vacunas aP, ya que éstos se derivan de las cepas de laboratorio (187, 193). Alternativamente, también puede ser una consecuencia del adyuvante utilizado en las vacunas aP existentes. Actualmente, las mismas se administran con hidróxido de aluminio, el cual es un adyuvante que favorece la inducción de células Th2 y la producción de anticuerpos. Ya hemos visto que la infección natural o las vacunas wP, que inducen niveles relativamente más altos de protección, promueven respuestas de tipo Th1 y Th17, mientras que las vacunas aP inducen células Th2 y Th17 en ratones (116).

Dentro de las mejoras que se pueden introducir en las formulaciones vacunales se pueden mencionar entre otros: **cambio en el adyuvante utilizado, composición de la vacuna y vía de inmunización** o una combinación de las anteriores.

Respecto de los adyuvantes, las vacunas basadas en agentes patógenos enteros por lo general no requieren la adición de adyuvantes ya que a menudo son lo suficientemente inmunogénicas, aunque algunas de ellas (por ejemplo, las vacuna contra hepatitis A) se pueden formular con adyuvantes para mejorar aún más las respuesta inmune. Por el contrario, las vacunas basadas en componentes o partes de componentes de los agentes causales de enfermedades como proteínas, aunque seguras en la mayoría de los casos generan una inmunogenicidad limitada y requieren la adición de adyuvantes para inducir una respuesta inmune protectora y de más larga duración. Los adyuvantes que se incluyen actualmente en las vacunas se dividen en inmunoestimulantes y vehículos (216). Los inmunoestimulantes actúan directamente sobre el sistema inmune para aumentar la respuesta a los antígenos, mientras que los vehículos funcionan presentando los inmunógenos de una manera óptima al sistema inmune.

Los adyuvantes utilizados son varios y generalmente se los clasifica de acuerdo a sus propiedades químicas y/o físicas, lo que convierte su clasificación en una lista que puede ser resumida según se muestra en la **Tabla VII**.

Tabla VII. Clasificación y listado de los principales adyuvantes vacunales

Adyuvantes	Composición o acción	Vacuna
Sales minerales		
Sales de aluminio	Absorben el antígeno	DT, TT
Fosfato cálcico	Absorben el antígeno	múltiples
Emulsiones		
MF59	Escualeno/agua	Gripe, VHB, VIH, VIH,
QS21	Saponina purificada	melanoma
SBAS-2	Escualeno/agua+MPL+QS21	Malaria, VIH
SBAS-4	Gel de alumbre+MPL	VHB, VHS
Detox	Escualeno/agua+MPL+CWS	Malaria, melanoma
Sistemas de partículas		
Liposomas (LP)	Vesículas con membrana bilipídica	Gripe (monovalente)
Virosomas	Liposomas asociados a prot. de fusión vírica	DT, TT, VHA
ISCOMs	Micelas de QuilA, colesterol y fosfolípidos	VPH16, <i>H. pylori</i>
Agonistas de TLR		
MPL	Monofosforil lípido A de <i>S. Minnesota</i>	VHS, VHB, malaria, VSR
OM-174	Derivado del lípido A	Malaria, cáncer
CpG oligonucleótidos	Oligonucleótidos con motivos CG (TLR-9 agonista)	VIH, gripe (trivalente), melanoma
Poly (I:C)	RNA bicatenario (TLR-3 agonista)	VIH, cáncer
Otros		
Citoquinas	IL-2, IL-12, IFN- γ , GM-CSF, etc	Malaria, VHB, VHA
Toxinas	Toxina colérica, toxina de <i>E. coli</i> , etc	Varias vacunas orales

ISCOM (*immunoetimating complex*); MPL (*monophosphoryl lipid A*); VHA y VHB (virus de hepatitis A y B); VHS (virus herpes simple)

En lo que respecta a la mejora de la vacuna acelular de pertussis, la introducción de adyuvantes alternativos que favorezcan la inducción de células Th₁ podría proporcionar una mejor protección contra *B. pertussis* que una vacuna formulada con aluminio. Existen datos promisorios en los que se emplea a oligonucleótidos de CpG solos o en combinación con sales de aluminio como adyuvantes para las vacunas acelulares contra *B. pertussis* (15, 82). Los

resultados alcanzados muestran un aumento en la respuesta humoral y una mayor proporción de respuesta del tipo Th1.

Sin dudas es un área que debe trabajarse de forma de hacer a esta alternativa factible en lo que se refiere a pertussis.

En relación a cambios en la composición de la vacuna, la incorporación de nuevos inmunógenos constituye un camino tentador (195), ya que no solo podrían incorporarse inmunógenos propios de la población bacteriana circulante sino también inmunógenos con modificaciones génicas como puede ser el caso de la toxina pertussis. Resultados alentadores se han obtenido reemplazando la PTx detoxificada químicamente (Pt_x_{quim}) por la proteína recombinante carente de reactividad (Pt_x_{gen}) (204, 240). En particular se ha demostrado que el tratamiento químico de esta toxina con formaldehído limita la presentación de antígenos a las células T y además, tiene un efecto significativo sobre la estructura de la proteína y puede destruir epitopes protectores (61). Por su parte la Pt_x_{gen} es más inmunogénica en humanos que Pt_x_{quim} (64).

La adición de otros factores de virulencia de *B. pertussis* en las vacunas, como la toxina adenilato ciclasa hemolisina, también puede mejorar la inmunidad inducida por estas (42). Otra opción es agregar en la formulación vacunal, proteínas expresadas predominantemente por cepas circulantes de *B. pertussis*, de manera tal de eliminar el desajuste respecto a las cepas vacunales. Por ejemplo, la proteína IRP-3, la cual se encuentra altamente conservada en cepas circulantes de *B. pertussis* y se expresa bajo condiciones de bajas concentraciones de hierro, demostró ser protectora en el modelo murino (6).

Otra estrategia que se puede emplear para mejorar las vacunas actualmente en uso es, como mencionamos anteriormente, **cambiar la ruta de inmunización.** *B. pertussis* es un patógeno exclusivo de la mucosa y la vacunación por vía de la mucosa nasal podría ser una estrategia particularmente adecuada para la inmunización contra patógenos respiratorios como *B. pertussis*.

Las superficies de la mucosa constituyen la mayor interfase entre el cuerpo y el ambiente externo, incluyendo los tractos respiratorio, gastrointestinal y genital (**Figura 10A**). La inmunidad de mucosas (**Figura 10B**) juega un papel crucial en la defensa contra los patógenos invasores en la superficie de las células epiteliales, lo cual implica una compleja red de componentes de las respuestas inmune innata y adaptativa. La vigilancia continua de los patógenos en la superficie de mucosas está mediada por células especializadas de transporte de antígenos (células M) y CD de la lámina propia. Una vez activadas, las CD migran a los ganglios linfáticos y allí median la expansión de células T naïve a distintos tipos de células T *helper* y T *reg*. Esas células T vuelven luego a las superficies de la mucosa para efectuar sus

funciones. Las citoquinas TGF- β , IL-4, IL-6 e IL-10 son importantes para la inducción de células B productoras de IgA. Las células Th17 y la expresión de IL-17 pueden aumentar la expresión del receptor polimérico plg y promover el *switch* hacia IgA, aumentando la secreción de esta inmunoglobulina. Más aun, factores solubles secretados por las CD como BAFF y APRIL promueven el *switch* hacia IgA independiente de células T (153). El aumento de la producción de IgA-S y la

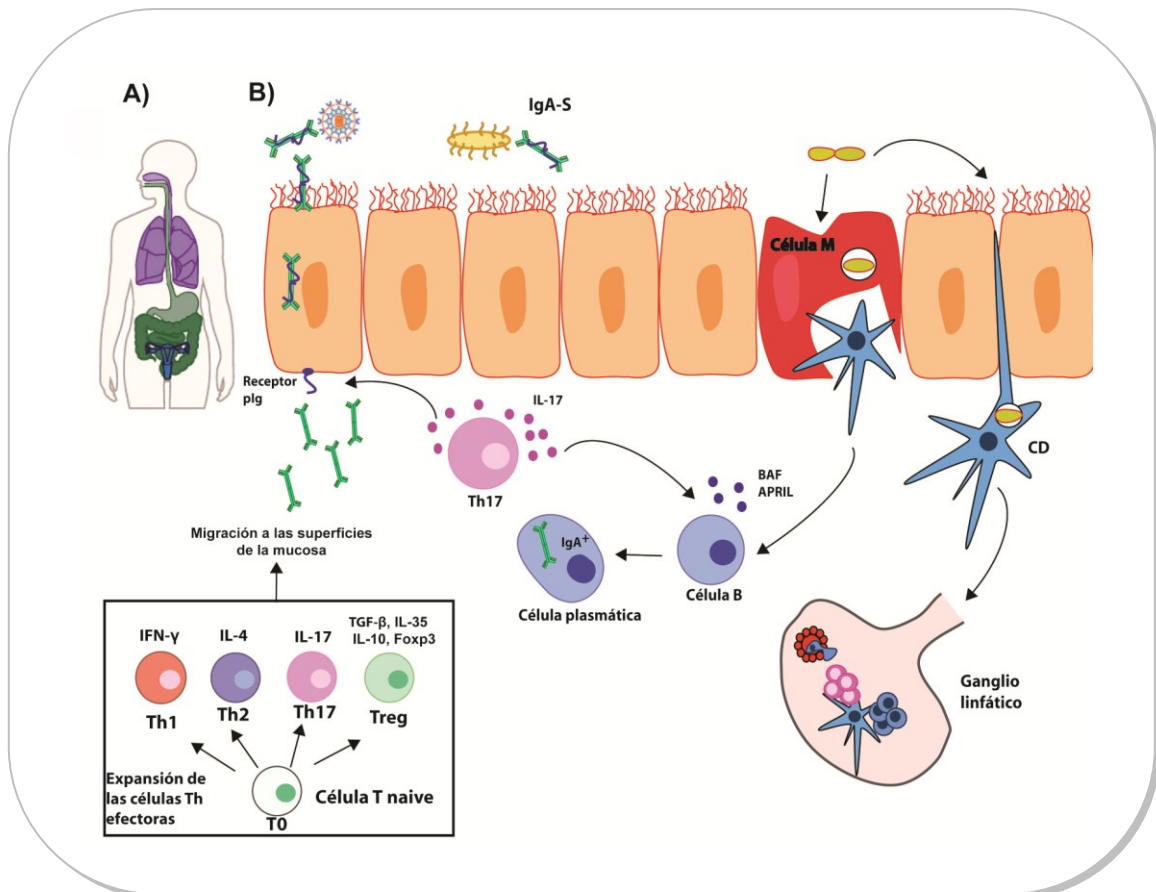


Figura 10. Sistema inmune de mucosas. A) Superficie de mucosas. B) Inmunidad de mucosas. Adaptado de Lawson *et. al*, Curr Opin Immunol, 2011.

translocación a través de las células epiteliales dificulta la invasión del patógeno y genera inmunidad en las superficies de mucosas.

De esta manera, la inmunización intranasal induce la formación de anticuerpos en la superficie de la mucosa tanto de la parte superior como inferior de las vías respiratorias, incluyendo la IgA-S necesaria para la protección local (196). También genera la inmunidad sistémica requerida para proteger contra la infección invasiva de ciertos patógenos. Además de las ventajas inmunológicas mencionadas, la inmunización por vía intranasal ofrece otras ventajas

frente a la inmunización por vía parenteral: a) la mucosa nasal es de fácil acceso para la aplicación de la vacuna; b) los antígenos transportados a la superficie de la mucosa sufren menos dilución y degradación enzimática que la que se produce en el epitelio intestinal; c) requiere de profesionales menos especializados ya que son más fáciles de aplicar; y d) el riesgo de contaminación y de transmitir enfermedades que existe en la aplicación tradicional se reduce debido a la ausencia de agujas. Teniendo en cuenta estos factores, los costos de vacunación masiva tienden a ser inferiores a los de las vacunas parenterales (137).

Actualmente, la mayoría de las vacunas administradas por vía mucosal están en la etapa de ensayos en modelos animales experimentales. Se han desarrollado algunas vacunas intranasales contra *B. pertussis* las cuales han sido probadas en ratones. Algunas de ellas están basadas en la atenuación del patógeno, mientras que otras están compuestas por componentes proteicos. Interesantemente, estas vacunas mostraron una respuesta inmune comparable a la generada por las vacunas de pertussis acelulares administradas por vía sistémica convencionales (Tabla VIII).

Tabla VIII. Vacunas intranasales contra *B. pertussis*.

Vacuna	Efecto	Referencia
Patógenos atenuados o inactivados		
Cepas atenuadas de <i>B. pertussis</i>	Protección contra desafío respiratorio	(162)
BPZE	Protección contra <i>B. pertussis</i> e infección por <i>B. parapertussis</i>	(177)
wP*	Respuesta de células T a wP. IgG e IgA contra wP y FHA.	(26, 27)
<i>B. pertussis</i> atenuada, que expresa HtrA**	Respuesta inmune de mucosas contra FHA y HtrA	(5)
Vacunas basadas en proteínas		
Pertactina+LT	Protección contra <i>B. pertussis</i>	(103)
S1-CtxA2B	Protección contra <i>B. pertussis</i>	(156)
Fragmento de FHA+CT	Protección contra <i>B. pertussis</i>	(4)
FHA+PTx+quitosan	Inducción de IgG e IgA	(129)
OMVsBpPagL	Protección contra <i>B. pertussis</i>	(12)

* Testeada en humanos

** High temperature requirement factor A

Generalmente, la simple administración de un antígeno por vía mucosal es ineficaz para la estimulación del sistema inmune. Es por esto que es fundamental la utilización de adyuvantes de la mucosa para mejorar dicha respuesta. Los adyuvantes de la mucosa más comunes son las toxinas bacterianas, como la toxina lábil de *Escherichia coli* (LT) y la toxina colérica (CT), las citoquinas, y los oligodesoxinucleótidos CpG (CpG ODN). Cualquiera sea el adyuvante elegido, el mismo no solo debe generar una potente respuesta inmune sino que además debe resultar inocuo para su uso en humanos. Es por esto que se ha puesto énfasis para encontrar derivados no tóxicos de LT y CT. Uno de estos derivados es la subunidad B de CT producida de manera recombinante y completamente no tóxica, CTB. Dependiendo de la naturaleza del antígeno co-administrado, CTB se puede utilizar para generar inmunidad de mucosas (principalmente S-IgA) contra patógenos o tolerancia periférica anti-inflamatoria a antígenos propios o alérgenos (120). Debido a que CTB está licenciada para su uso en humanos, y es de fácil producción en el laboratorio mediante la tecnología de ADN recombinante, resulta atractiva a la hora de elegir un adyuvante de mucosas para la producción de una vacuna humana. Dado que es objeto de este trabajo de tesis, a continuación describiremos las características que convierten a CTB en un potente adyuvante de mucosas.

1.11 Estructura y mecanismo de acción de la toxina colérica

La toxina colérica o CT (del inglés, *cholera toxin*) pertenece a la familia de toxinas del tipo AB₅, ya que está compuesta por dos subunidades en una relación 1:5. La subunidad A o CTA de 28 kDa, es un heterodímero asociado no covalentemente a un homopentámero formado por las subunidades B (CTB) de 56 kDa (252). CTA posee actividad biológica y CTB se une al receptor de la membrana celular (123) (**Figura 11**). CTA se sintetiza como una sola cadena polipeptídica y luego de la traducción es modificada por la acción de una proteasa (140). El clivaje de este aminoácido genera los fragmentos CTA₁ y CTA₂, los cuales permanecen unidos por un puente disulfuro (157). La actividad tóxica de CTA reside en CTA₁, mientras que CTA₂ inserta CTA dentro del pentámero CTB (229).

La notable estabilidad del pentámero CTB se debe a interacciones no covalentes entre 130 puentes de hidrógeno, 20 puentes salinos, así como también interacciones pentámero-

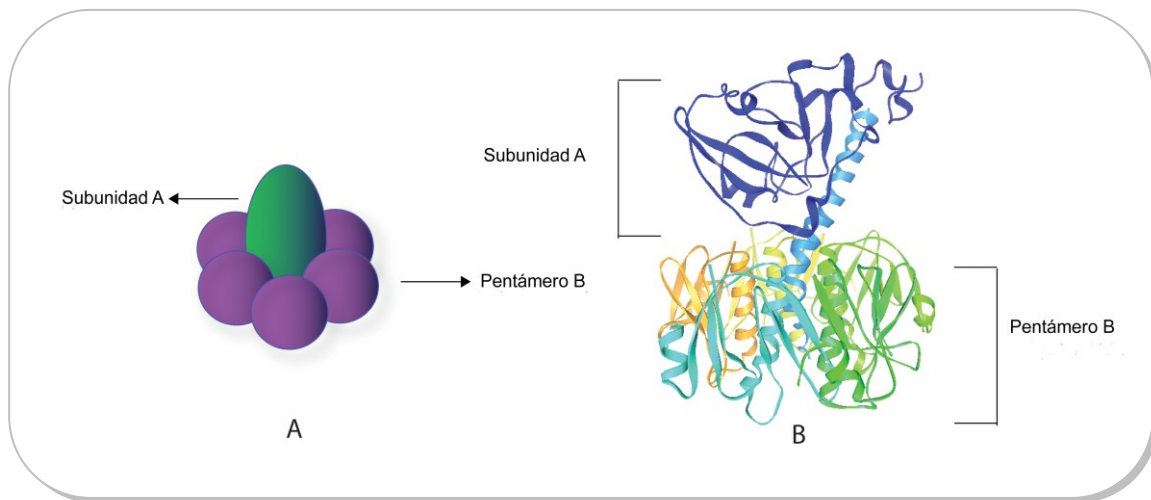


Figura 11. Estructura de la toxina colérica A) Modelo esquematizado de la toxina. La subunidad A contiene la actividad tóxica mientras que la subunidad B se une a las células. B) Modelo basado en un análisis realizado por cristalografía de rayos X. Cada subunidad es representada por un color distinto.

pentámero. En consecuencia, CTB se mantiene como un complejo unido a no ser que sea tratada con temperaturas próximas a los 100 °C o monomerizado por acidificación a un pH menor a 3 (230). La CT se secreta a través de la membrana externa de *V. cholerae* y su acción tóxica comienza cuando la subunidad B se une con gran afinidad a su receptor, el monosialogangliósido GM1. GM1 es un glicolípido que se encuentra comúnmente en caveolas. Las caveolas son dominios de membrana enriquecidos en glicolípidos, colesterol y caveolina, que participan en la endocitosis y transcitosis, transporte celular y transducción de señales (236). Estas estructuras de membrana están presentes en varios tipos de células, incluyendo células del sistema inmune (244). Cada monómero de la subunidad B tiene un sitio de unión a GM1. Sin embargo, el pentámero tiene una afinidad de unión mucho mayor al receptor (176). Después de la unión al receptor, CT entra en las células intestinales humanas a través de la endocitosis y se transporta desde endosomas tempranos hacia el aparato de Golgi. Una vez dentro de las células del huésped, A1 cataliza la transferencia de una unidad de ADP-ribosa del agente oxidante NAD^+ a un residuo de arginina de una proteína Gs. Esta modificación covalente lleva a la pérdida de la actividad GTPasa de la proteína Gs, la cual permanece unida a GTP manteniendo a la enzima adenilato ciclasa activa, que produce cantidades crecientes de AMPc. Un aumento de más de 100 veces en la concentración normal de AMPc en las células de la mucosa intestinal provoca la apertura de canales de Cl^- en la membrana plasmática, resultando en un gran flujo de iones y agua al lumen intestinal que causa la diarrea

característica del cólera (239). Tan poco como 5 µg de CT pura administrada oralmente es suficiente para inducir diarrea en humanos (158).

1.12 Propiedades inmunológicas y adyuvantes de CTB

La enterotoxicidad inherente de CT ha limitado su uso generalizado como componente de vacunas y como adyuvante, lo cual ha llevado a buscar estrategias que involucren mutantes no tóxicos y subunidades B purificadas.

Varios estudios empleando diferentes condiciones y vías de administración han descrito que CTB posee varias propiedades inmunomoduladoras, abriendo numerosas perspectivas para futuras aplicaciones terapéuticas y biotecnológicas. En este sentido, la inmunización intranasal de mujeres con CTB dio como resultado la producción de anticuerpos anti-CTB IgG e IgA de larga duración en el suero, secreciones nasales y vaginales, de manera dosis-dependiente (25).

CTB recombinante se ha utilizado con éxito como adyuvante de mucosas en vacunas para uso humano, como la propia vacuna del cólera (213), y la vacuna contra la bacteria *E. coli* enterotoxigénica que causa diarrea (202, 212). Análogamente, CTB ha demostrado ser buen adyuvante para una vacuna celular de *Streptococcus pneumoniae* cuando se la administra por vía intranasal en ratones (165).

Otra manera de utilizar CTB como adyuvante es en construcciones genéticas basadas en la toxina y antígenos heterólogos. En general, estas moléculas híbridas se componen de antígenos fusionados al extremo amino (149, 238) o carboxilo (139, 256) terminal de CTB, siendo la unión a GM1 mucho más eficiente en el último caso (160). Algunos ejemplos incluyen el ácido glutámico descarboxilasa (88) y la cadena B de la insulina humana (224). Hay muchos estudios que muestran la inducción de una respuesta inmune mediante la inmunización de ratones con CTB fusionada a antígenos solubles expresados tanto en bacterias (152, 156, 241, 247) como en plantas transgénicas (130, 168). En todos los casos descritos hubo generación de anticuerpos IgG e IgA específicos contra el antígeno y, en algunos casos, protección. Algunos ejemplos de la acción adyuvante de CTB se muestran en la **Tabla IX**.

El mecanismo de la actividad adyuvante de CTB todavía no está claro pero se lo ha relacionado con: 1) la inducción del aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal, lo cual conduce a la absorción mejorada de antígenos administrados conjuntamente a la toxina; 2) la inducción de una presentación de antígenos más eficiente por diversas APC; 3) la promoción de la diferenciación de isotipo en las células B que conduce a la formación de un aumento de IgA; y 4) exhibición de efectos estimulatorios e inhibitorios sobre la proliferación de células T y

la producción de citoquinas. Entre estos efectos, los que conducen a un aumento en la presentación de antígenos son probablemente de mayor importancia (229). La polaridad de la respuesta inmune generada por CTB es cuestión de debate. Algunos estudios *in vitro* indican que CTB promueve un fenotipo Th₂, con producción de interleuquinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, pero poco IFN- γ (37, 145, 262), mientras que en otros estudios induce una respuesta tipo Th₁ (8, 67). Por otra parte, CTB aumenta notablemente la presentación de antígenos por parte de las CD, los macrófagos y las células B (83). Además, CTB regula la expresión de moléculas coestimuladoras, así como de receptores de quimioquinas, tanto en CD murinas y humanas, entre otras APC (48, 80). Por otra parte, provoca la depleción de la población de linfocitos CD8⁺ intraepiteliales (75) e induce la diferenciación de isotipo de las células B que actúan de forma sinérgica con IL-4 (226). El mecanismo de acción propuesto para CTB se grafica en la **Figura 12**.

En este trabajo de Tesis se ha intentado aprovechar la excelente capacidad de CTB como adyuvante de mucosas para presentar antígenos de *B. pertussis* al sistema inmune de mucosas utilizando la ruta de inmunización intranasal. Posteriormente, se ha evaluado la respuesta inmune y protectora generada por los mismos y la factibilidad de la utilización de la vía intranasal y la incorporación de nuevos inmunógenos en el desarrollo de nuevas vacunas acelulares contra la tos convulsa.

Tabla IX. Antígenos hacia los cuales CTB tiene actividad adyuvante.

	Antígeno	Vía de inoculación	Administración de CTB	Referencia
Proteínas	Nucleoproteína del virus Influenza A	IN	Co-administrada	(96)
	Antígeno de superficie de Hepatitis B	IN	Co-administrada	(127)
	Proteína de Malaria MSP _{4 5}	Oral	Co-administrada	(257)
	OVA	IM	Co-administrada	(220)
	HIV-gp ₄₁	SL	Conjugado químicamente	(113)
	Epitopes de la glutatión-S	IN	Genéticamente fusionado	(154)

	transferasa de <i>Schistosoma mansoni</i>			
Polisacárido	Polisacárido capsular tipo III de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	IN, oral, rectal y vaginal	Químicamente conjugado/ co- administrado	(234)
	Lipopolisacárido de <i>Vibrio cholerae</i> O ₁ , serotipo Inaba	SC	Químicamente conjugada	(97)
	Polisacárido de pseudomona aeruginosa	Oral	Co-administrada	(2)
Microorganismos	Virus del sarampión	IN, IG	Co-administrada	(190)
	Virus influenza	IN	Co-administrada	(271)
	<i>Pneumocystis carinii</i>	IN	Co-administrada	(201)

IN: intranasal, IM: intramuscular, SL: sublingual, SC: subcutáneo, IG: intragástrico

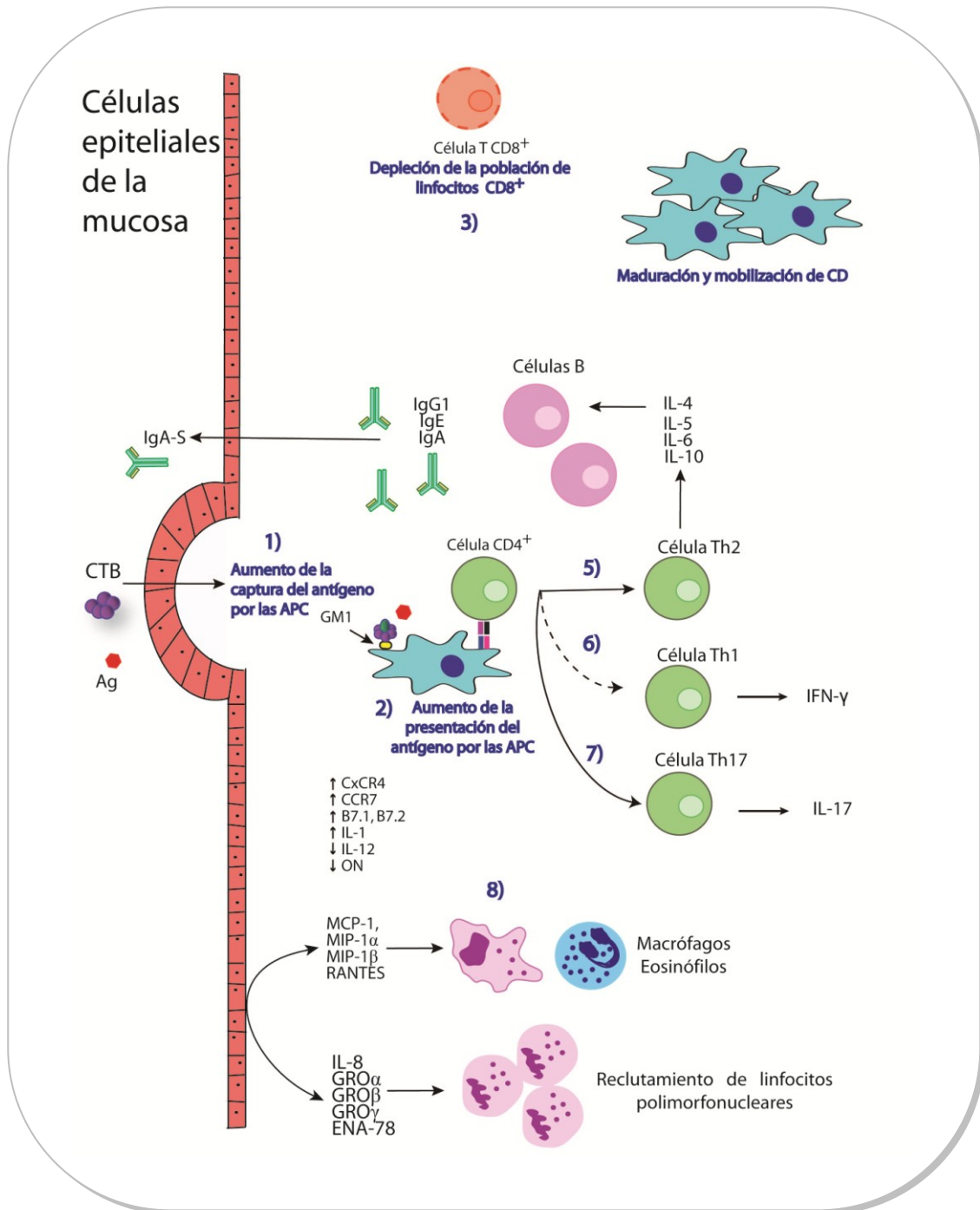


Figura 12. Mecanismo de acción propuesto para CTB como adyuvante de mucosas. CTB induce un aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal que conduce a 1) una mejor captura de antígenos co-administrados y 2) un aumento de la presentación de antígenos por varias APC. 3) Causa la depleción de la población de linfocitos CD8⁺ que pueden producir citoquinas inhibitorias, e 4) induce la maduración y la movilización de DC. Además, 5) CTB promueve una fuerte respuesta Th2, y puede 6) inducir o inhibir una respuesta Th1. Por otra parte, 7) CTB induce además una respuesta del tipo Th17. Finalmente, 8) las células epiteliales de la mucosa contribuyen a la actividad adyuvante de CTB al secretar quimocinas y actuando en leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos y células T.

OBJETIVOS

Contexto

Hemos visto que la tos convulsa es una enfermedad aguda, respiratoria y altamente contagiosa que a pesar de ser inmunoprevenible, hoy en día es considerada una enfermedad resurgente. Surge entonces la necesidad de aplicar refuerzos de inmunización de forma de prolongar la duración de la inmunidad contra la enfermedad, así como también de mejorar las vacunas actuales de manera tal que no solo ofrezcan una protección duradera en el tiempo sino que también protejan contra cepas circulantes antigénicamente distintas. Es por esto que la inclusión de antígenos expresados por cepas circulantes en las formulaciones vacunales podría ofrecer una mejora en el control de esta enfermedad

Por otra parte, ante las vacunas parenterales convencionales, una vacuna mucosal podría ser una alternativa válida para mejorar las vacunas existentes, ya que imita a la infección natural y puede prevenir la colonización de *B. pertussis* mediante la generación de anticuerpos en la mucosa. Sin embargo, la inducción de una respuesta inmune protectora es difícil de lograr mediante inmunización por vía mucosal con antígenos recombinantes solubles. Es por esto que el uso correcto de adyuvantes es fundamental a la hora de diseñar vacunas recombinantes administradas por vía de mucosas. En este sentido, se ha demostrado que la subunidad B de la toxina colérica es un potente inmunoestimulador que puede actuar como adyuvante estimulando la respuesta inmune sistémica y de mucosas contra antígenos administrados por vía mucosal, además de ser seguro para su uso en humanos.

Con el objetivo de contribuir al desarrollo de una vacuna recombinante acelular para la mejora de la prevención de la infección por *B. pertussis*, planteamos los siguientes objetivos generales y específicos:

Objetivo general e hipótesis de trabajo

El propósito general de este trabajo fue generar herramientas moleculares que resulten útiles en el control de la infección causada por *B. pertussis*.

Nuestro trabajo contempló la identificación, caracterización, y la validación de proteínas de *B. pertussis* como candidatos vacunales así como el estudio de la respuesta del huésped a dichas proteínas. Nuestra hipótesis es que proteínas recombinantes de *B. pertussis* fusionadas con CTB son buenos candidatos vacunales para ser utilizados por vía mucosal.

De esta manera, en este trabajo utilizamos a la vía de **inmunización intranasal** como ruta de administración de los inmunógenos, y **CTB como adyuvante mucosal**. En particular se realizó la construcción de 3 formas quiméricas en fusión con la notablemente inmunogénica subunidad B de la toxina colérica, tomando ventaja de un vector de expresión (generado por otros investigadores) y el estudio de su valor como herramienta preventiva.

Basándonos en la hipótesis que afirma que la disminución de la eficacia y de la inmunidad inducida por las vacunas aP es causada por la **presión de selección y variación antigénica**, que permiten que las cepas circulantes de *B. pertussis* escapen de la inmunidad inducida por los antígenos presentes en las vacunas aP, como primera estrategia utilizamos como candidatos vacunales a inmunógenos expresados por aislamientos clínicos de *B. pertussis*, pero no por las cepas utilizadas en las vacunas actuales. El criterio de selección de estos candidatos se basó en los resultados de trabajos previos realizados por otros grupos de investigación, incluyendo el nuestro. Los resultados de esta primera parte del trabajo están descritos en el Capítulo II.

La segunda estrategia empleada tiene su base en la hipótesis que sostiene que la resurgencia de la tos convulsa es debida a una **pérdida de la inmunidad adquirida por infección o vacunación**, lo cual hace que adolescentes y adultos se vuelvan una fuente de contagio para los niños más susceptibles. En esta segunda estrategia ensayamos la inmunización intranasal para imitar la infección natural y generar una respuesta protectora comparable o superior a la inducida por la inmunización por vía sistémica. De esta manera, en el Capítulo III de esta tesis evaluamos la capacidad protectora de un antígeno incluido actualmente en las formulaciones actuales de las vacunas acelulares, y estudiamos si el cambio en la vía de inmunización y la utilización de CTB son eficientes en la generación de una respuesta inmune protectora superior.

Por lo tanto, en el Capítulo II se han incluido dos candidatos expresados por cepas de *B. pertussis* pertenecientes a aislamientos clínicos (Bsp22 y LpdA), mientras que en el Capítulo III estudiamos como candidato vacunal a un inmunógeno conocido, la fimbria (Fim2), presente en las formulaciones vacunales actuales.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos abordados en este trabajo de tesis fueron los siguientes:

1. Clonar los ORF codificantes para las proteínas Bsp22, LpdA, y Fim2 de *Bordetella pertussis* en el vector de expresión pAE-ctxB.
2. Expresar las proteínas recombinantes CTB-Bsp22, CTB-LpdA y CTB-Fim2 en una cepa de expresión de *Escherichia coli* adecuada.
3. Purificar las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.
4. Caracterizar las proteínas recombinantes con anticuerpos anti-CTB.
5. Obtener las proteínas recombinantes en su estado de plegamiento correcto y verificar su unión al gangliósido GM1.
6. Inmunización y desafío con una cepa adecuada de *Bordetella pertussis* patogénica.
7. Análisis de la respuesta inmune.

CAPÍTULO II

*EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
PROTECTORA CONTRA PERTUSSIS
DE PROTEÍNAS PROPIAS DE LOS
AISLAMIENTOS DE *BORDETELLA*
PERTUSSIS CIRCULANTES EN
NUESTRA REGIÓN.*

2.1 Introducción

Según lo expuesto en la Introducción general, las causas que podrían explicar el incremento en el número de casos notificados (124) incluyen la mejora en la vigilancia de la enfermedad, la corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas, la circulación de bacterias inmunogénicamente diferentes a las cepas que se emplean en la producción de vacunas, o una combinación de ellas.

Las **mejoras en la vigilancia** refieren principalmente a la mayor sensibilización de los médicos en la sospecha clínica y a la incorporación en los laboratorios de diagnóstico de métodos más sensibles y específicos. Si bien esta causa es clara, en varios lugares ya han transcurrido varios años en que estas mejoras han sido introducidas y sin embargo el aumento de casos continúa registrándose. Esto ha llevado a minimizar el impacto de la misma en el incremento de casos detectado.

La hipótesis sobre la **disminución de la inmunidad conferida por las vacunas** cuenta con la evidencia experimental de la presencia de la enfermedad en la población adolescente y adulta (54, 132, 254). Como ya se ha mencionado en el Capítulo I, la tasa de incidencia de la enfermedad en Estados Unidos y Europa fue aumentando en los adolescentes y adultos luego del uso masivo de las vacunas acelulares (277). En Estados Unidos, en los brotes de pertussis detectados en varios estados se encontró la presencia de pertussis no solo en infantes sino también en niños de 4-12 años, varios de ellos con esquema completo de inmunización con DTaP (264). Por ejemplo, en el 2012 el estado de Washington registró más de 4.900 casos, mientras que en el 2011 no había superado los 948 casos (CDC, julio 2012). En este estado la incidencia fue mayor en niños menores a 1 año y en niños-adolescentes de 10, 13 y 14 años. Fueron muy llamativos los casos en los adolescentes de 13 y 14 años de edad ya que habían recibido recientemente un refuerzo de vacuna triple bacteriana acelular Tdap (formulada para población adolescente y adulta). Estos datos sugieren que la pérdida de la inmunidad adquirida por la vacuna acelular es más rápida de lo anteriormente estimado. Esta acelerada pérdida de la inmunidad parece darse mayormente en la población que recibió vacunas acelulares en las dosis primarias en contraste cuando estas dosis fueron cubiertas con vacunas celulares.

Toda esta situación de pertussis por demás preocupante parece agravarse como consecuencia de la **divergencia molecular** existente entre la población bacteriana circulante y las cepas que se emplean en la producción de vacunas tanto celulares como acelulares. Holanda fue el primer país que reportó el hallazgo de divergencia antigénica entre las cepas *B. pertussis* empleadas en la producción de vacunas y la población bacteriana circulante al evidenciar que

la secuencia que codifica para la PRN cambió a lo largo del tiempo (188). Así, en el periodo 1949-1980, la población bacteriana circulante contenía dentro de su genoma el alelo *prn1*, mientras que en 1981 aparecieron bacterias conteniendo nuevos alelos: *prn2* y *prn3*. A partir de 1989, la proporción de estas variantes alélicas aumentó a 90%. Es importante recordar que las cepas empleadas en la producción de vacunas en Holanda contenían la variante alélica *prn1*. Algo similar fue detectado para la toxina pertussis cuando se identificaron cuatro variantes alélicas de la subunidad A (*ptxA*) de las toxinas designadas actualmente *ptxA1*, *ptxA2*, *ptxA4* y *ptxA5*. Las cepas vacunales utilizadas para la producción de vacunas poseen los alelos *ptxA2* y *ptxA4*, los cuales prácticamente dejaron de circular. En el periodo 1978-1985 en Holanda se detectó la circulación de un nuevo alelo para la subunidad A de la toxina pertussis, el alelo *ptxA1*. A partir de ese período la frecuencia de aparición de dicho alelo se incrementó hasta llegar a valores del 88% en el período 1990-1996. Más recientemente se ha detectado una población bacteriana circulante que contiene la secuencia designada como *ptxP3* en el promotor de la secuencia que codifica para la toxina pertussis que era inusual hasta hace 10 años (187). Las bacterias que contienen a *ptxP3* parecen producir mayores cantidades de la toxina pertussis lo cual impactaría en la virulencia de *B. pertussis* (3, 187, 206). La circulación de este genotipo se ha detectado en diversos países, entre otros Australia (193) y Argentina (nuestro grupo).

Desde la descripción del polimorfismo genético en la pertactina y en la toxina pertussis, se han utilizado distintas metodologías para la genotipificación de la población bacteriana circulante. Entre estas metodologías se encuentran: *fingerprint*, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), VNTR (*Variable Number Repeat Analyses*), PFGE (*Pulsed- Field- Gel - Electrophoresis*) y MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) (199, 233). Estas nuevas metodologías detectaron cambios en las secuencias que codifican para *Fim2* y *Fim3*. *B. pertussis* puede expresar uno o ambos genes pero su variación alélica es limitada. En las poblaciones de *B. pertussis* se han encontrado dos variantes para *fim2* y tres variantes para *fim3* aunque la variante *fim3-3* se ha detectado solo esporádicamente (185).

Por otro lado, se ha descrito la circulación de bacterias incapaces de sintetizar la proteína PRN (34, 109, 198). Esta alteración se ha observado en países en los que se emplea desde hace varios años vacunas acelulares. Los investigadores proponen que estos cambios, y los anteriormente descritos, parecen ser consecuencia de la presión de selección que la vacunación ejerce ya que se estarían seleccionando variantes alélicas que estarían más adaptadas a superar la respuesta inmune generada por el huésped (60).

En un estudio publicado en el año 2012, se comparan los genomas de cepas aisladas entre los años 1949-2010 y se muestran pequeñas variaciones en las secuencias de los genes *fim3*, *prn*,

ptxA y *ptxP* que se han acumulado resultando en grandes cambios de poblaciones de bacterias patógenas en un lapso de 6 a 19 años (249). Este tipo de divergencia genotípica fue observada también a nivel local, en concordancia con los hallazgos internacionales (21, 30, 32, 74, 76).

En modelos en animales se pudo demostrar que las cepas vacunales inducen una respuesta inmune parcialmente ineficaz frente a los aislamientos circulantes divergentes (32, 101, 141).

Por todo lo mencionado, resulta de interés evaluar el rol en la inmunidad y protección de ciertas proteínas expresadas diferencialmente por aislamientos clínicos locales de *B. pertussis*.

Dentro de la expresión diferencial de proteínas por cepas circulantes de *B. pertussis*, se encuentran proteínas del Sistema de Secreción Tipo III (SSTT), como la Bsp22, y la proteína del metabolismo celular dihidrolipoamida deshidrogenasa, LpdA (31, 81). En la **Tabla X** se detallan algunas de las proteínas expresadas diferencialmente por aislamientos clínicos de *B. pertussis* y las cepas vacunales.

El caso particular de la expresión diferencial del SSTT podría deberse a que las cepas vacunales no han estado en contacto con células eucariotas desde su aislamiento, hace más de 50 años, y este contacto sería necesario para la expresión de este tipo de sistemas. Se ha demostrado que las cepas adaptadas a las condiciones de cultivo de laboratorio no son capaces de expresar un SSTT funcionalmente activo mientras que aquellas bacterias que han tenido un contacto reciente con el huésped sí pueden hacerlo (71, 81).

La proteína LpdA en otros patógenos ha mostrado tener un rol en la patogenicidad, la respuesta inmunológica e incluso se la ha asociado a protección (69).

En este Capítulo presentamos los resultados alcanzados sobre la capacidad protectora de dos proteínas, Bsp22 y LpdA, expresadas diferencialmente por aislamientos clínicos de *B. pertussis* pero no por las cepas vacunales. Para ello empleamos el modelo murino de desafío intranasal. Este modelo reproduce algunos aspectos de la enfermedad humana, como la mayor susceptibilidad a la infección en ratones recién nacidos respecto de los adultos, períodos similares de infección pulmonar y manifestaciones asociadas a la acción de la toxina pertussis tales como hipoglucemia, leucocitosis y sensibilización a la histamina (65, 181). Además, ha tenido un importante rol en el avance del actual conocimiento de pertussis respecto de los mecanismos de patogenicidad e inmunidad (169, 170, 178) y es el empleado en los ensayos preclínicos y en la evaluación de la capacidad protectora de las vacunas (35, 49, 94, 181).

Tabla X. Proteínas expresadas diferencialmente por aislamientos clínicos de *B. pertussis*.

Gen	Localización	Nombre de la proteína/Función	PM (kDa)	Presencia de la proteína				
				Bp137 (aislamiento)	Bp509 (aislamiento)	Bp10536 (aislamiento)	Bp106 (aislamiento)	Tohama I (cepa vacunal)
<i>bp0468</i>	Periplasma	Putative Molybdoterin oxidoreductase	121,6	no	no	sí	no	no
<i>bp2439</i>	Citoplasma	3-oxoacyl-synthase	43,6	sí	no	no	sí	no
<i>bp0995</i>	Citoplasma	Dihidrolipoamide deshidrogenase	62,3	no	no	no	sí	no
<i>bp3150</i>	Citoplasma	Polysaccharide byosynthesis protein	46,7	sí	no	no	sí	no
<i>bp1630</i>	Citoplasma	Capsular polysaccharide byosynthesis protein	37,3	sí	no	no	sí	no
<i>bp0379</i>	Citoplasma	Putative L lactato deshidrogenase	37,2	no	no	no	sí	no
<i>bp2435</i>	Periplasma	Putative sigma factor regulatory protein	39,2	no	no	no	sí	no
<i>bp0102</i>	Periplasma	Putative penicillin binding protein precursor	44,9	no	no	no	sí	no
<i>bp2235</i>	Membrana externa	Putative Type III secretion system	63,2	sí	no	no	sí	no
<i>bp1499</i>	Citoplasma	Glutathione synthetase	34,7	no	no	no	sí	no

Bottero et. al, J Appl Microbiol, 2012

Este desafío puede hacerse por aerosol o por inoculación intranasal siendo este último más efectivo. En el caso de la inoculación intranasal, un pequeño volumen menor o igual a 50 µl de una suspensión bacteriana es depositado en las narinas del ratón anestesiado. Aunque este método es más simple y no requiere disponer de un equipamiento especial, se ha reportado que el desafío por aerosol es más reproducible, con una distribución regular de la infección en toda la superficie pulmonar y con menos variación en la recuperación bacteriana (105, 231). Aunque no hay consenso respecto de la metodología a emplear en el desafío por vía respiratoria, distintos estudios han demostrado que el modelo respiratorio ya sea por desafío intranasal o por aerosol resulta útil para evaluar la eficacia tanto de vacunas celulares como acelulares (181, 269).

Como ya hemos mencionado en la Introducción, la vacunación por vía intranasal es una alternativa prometedora a la vacunación clásica por vía parenteral, ya que no es invasiva y en principio es capaz de inducir fuertes respuestas inmunes locales y sistémicas.

En este contexto y dada su simplicidad, para abordar el objetivo planteado se decidió emplear la vía de inmunización y el desafío intranasal.

2.2 Resultados

2.2.1 Justificación de los candidatos seleccionados

Bsp22

La proteína Bsp22, a diferencia de las otras proteínas efectoras del SSTT, es exclusiva del género *Bordetella*, y en el caso de *B. Bronchiseptica*, es la proteína de sistema SSTT que se expresa y se secreta en mayor proporción (275).

El rol de la proteína Bsp22 en el funcionamiento del SSTT, tanto *in vitro* como *in vivo*, solo ha sido descrito para *B. bronchiseptica* (81). Se ha demostrado que esta proteína efectora del sistema SSTT es capaz de autopolimerizarse para exponerse en la superficie bacteriana formando filamentos flexibles (174). Además de ser altamente inmunogénica, Bsp22 está asociada a una gran variedad de fenotipos. *In vitro*, Bsp22 es requerida para la inducción de apoptosis en macrófagos (274). *In vivo*, Bsp22 media la colonización e infección persistente de *B. bronchiseptica* en el tracto respiratorio inferior de ratones e induce apoptosis en células inflamatorias del hospedador. Por otro lado, si bien una mutación en la secuencia del gen

bsp22 no afecta la secreción de otras proteínas efectoras como la denominada BopC, sí disminuye la citotoxicidad y afecta la formación del complejo BopB/BopD translocador del poro (274). También se ha demostrado que anticuerpos contra la proteína Bsp22 son capaces de eliminar *in vitro* la actividad citotóxica del TTSS y, más interesante aún, la inmunización de ratones con Bsp22 es capaz de generar cierto grado protección contra la infección de por *B. bronchiseptica* (174). Interesantemente, la proteína Bsp22 de *B. pertussis* muestra un 96% de homología con la de *B. bronchiseptica* por lo que en principio podría esperarse que fuera protectora para *B. pertussis* también.

Dihidrolipoamida Deshidrogenasa o LpdA

La LpdA, detectada como diferencial entre la población bacteriana circulante y las cepas vacunales, está ligada al metabolismo y constituye una subunidad funcional del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDH), el cual está compuesto de múltiples copias de una triada formada por las enzimas dihidrolipoamida deshidrogenasa, dihidrolipoamida transacetilasa y piruvato deshidrogenasa (**Figura 13**).

Este complejo multienzimático está involucrado en la oxidación de piruvato a acetyl CoA. La enzima dihidrolipoamida deshidrogenasa permite el funcionamiento continuo de esta vía metabólica al mantener el poder reductor correcto para la bioconversión desde el piruvato.

LpdA ha sido descrita como un determinante de virulencia en otros patógenos como *Mycobacterium* en la que se ha descrito con un importante rol tanto en la colonización como en la patogénesis (125). En *Haemophilus influenzae* Tipo B la inserción de un transposón en el gen homólogo que codifica para LpdA convierte a la bacteria virulenta en una atenuada en el modelo animal murino (112). En *Anaplasma phagocytophilum*, también se observó que la LpdA es importante para la colonización microbiana (52). En *Neisseria meningitidis* y en *Pseudomonas aeruginosa*, LpdA es una proteína de membrana externa altamente inmunogénica (106). Esta proteína representa un ejemplo sobre el poder inmunogénico de proteínas que no son toxinas ni adhesinas y están asociadas al metabolismo (92).

Todos estos antecedentes han llevado a la elección de LpdA como candidato vacunal e incluso como transportador inmunológico de antígenos débiles (69, 89, 93, 159). La LpdA de *B. pertussis* no ha sido estudiada desde el punto de vista inmunológico y el antecedente de que es expresada solo en los aislamientos clínicos y no en las cepas vacunales la hace un candidato vacunal aún más atractivo (31).

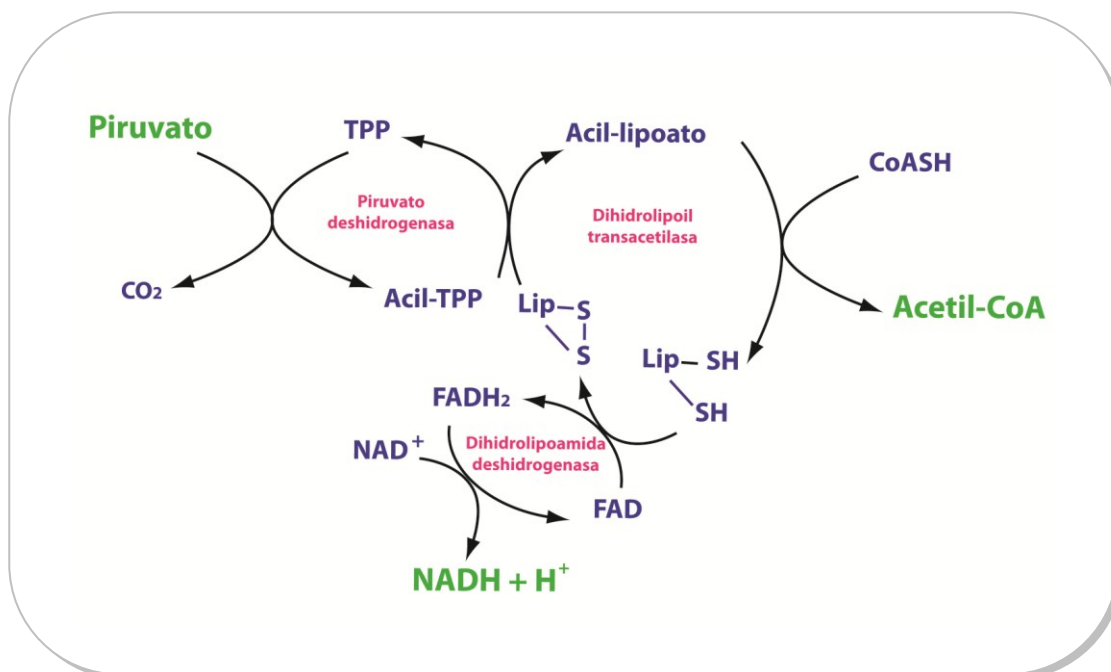


Figura 13. Complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDH). El PDH cataliza la unión de la coenzima A (CoASH) al piruvato que se descarboxila rindiendo en el proceso NADH. Estructuralmente el complejo multienzimático, además de otras proteínas, está formado por 3 enzimas catalizando cada una de éstas uno de los pasos de la reacción completa. La enzima piruvato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación del piruvato y su unión a la lipoamida de la siguiente enzima, la dihidrolipoil transacetilasa, con unión del piruvato de manera transitoria a la coenzima tiamina pirofosfato (TPP). La dihidrolipoil transacetilasa transfiere el grupo acetil que se encuentra unido a la lipoamida a la coenzima A para dar el acetil-CoA, producto de la reacción y la lipoamida en su forma reducida. Por último, la dihidrolipoamida deshidrogenasa enzima recupera la forma oxidada de la lipoamida rindiendo un NADH. Para ello requiere de la intervención de FAD como coenzima.

2.2.2 Clonación de proteínas de *Bordetella pertussis* fusionadas a la subunidad B de la toxina colérica.

La estrategia general que se emplea para la clonación de proteínas fusionadas a CTB ha sido descrita previamente por otros autores (9). Esta estrategia utiliza al vector de expresión pAEctxB cuyas características principales se esquematizan en la **Figura 14**. Siguiendo esta estrategia, las secuencias de ADN que codifican para las proteínas Bsp22 y LpdA fueron amplificadas con *primers* específicos diseñados para incorporar sitios *HindIII* y *MluI* en los extremos (**Tabla XI**). Los amplicones obtenidos con el tamaño esperado fueron clonados en el vector pAEctxB corriente debajo de la secuencia codificante para CTB (**Figura 15**). Estas construcciones fueron corroboradas por *colony* PCR, digestión con enzimas de restricción y, posteriormente, por secuenciación (**Figura 16**). Los *primers* y las enzimas utilizadas en el *screening* fueron los mismos que en el clonado.

Tabla I. Amplificación de las secuencias *bsp22* y *lpdA* por PCR para el clonado en el vector pAEctxB

Secuencia a clonar	DNA molde	Designación de los primers utilizados*	Producto (pb)
<i>bsp22</i>	DNA genómico <i>Bordetella pertussis</i> Tohama I	<i>bsp22</i> <i>Mlu</i> I / <i>bsp22</i> <i>Hind</i> III	641
<i>lpdA</i>	DNA genómico <i>Bordetella pertussis</i> Tohama I	<i>lpdA</i> <i>Mlu</i> I / <i>lpdA</i> <i>Hind</i> III	1814

*Las secuencias nucleotídicas de cada uno se detallan en la sección Materiales y Métodos.

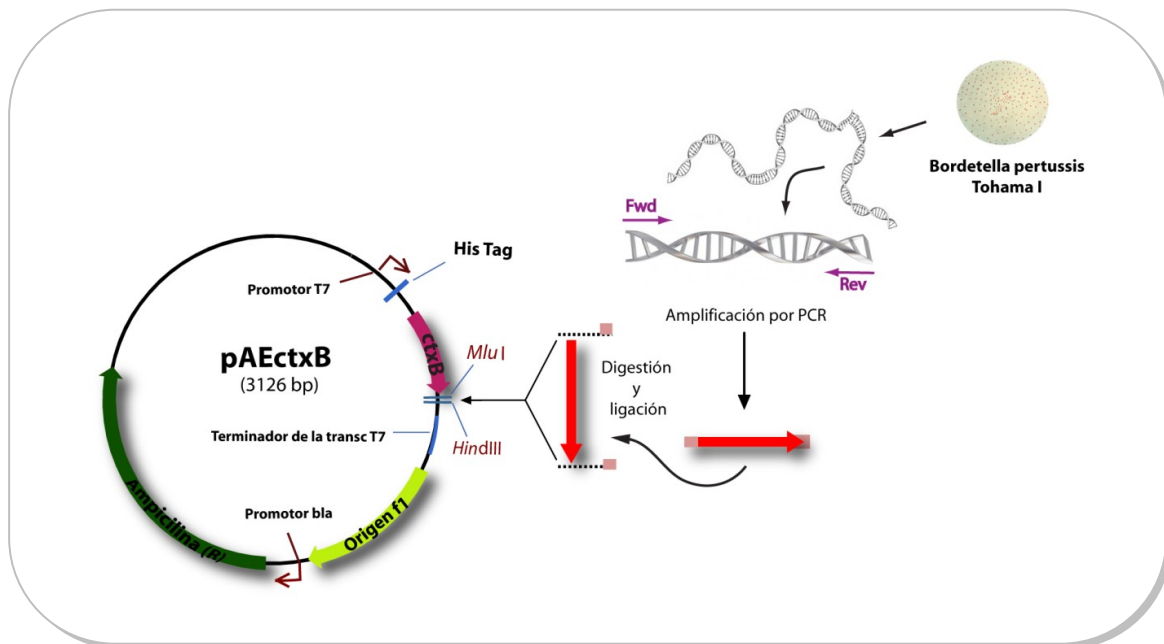


Figura 15. Estrategia de clonado en el vector pAEctxB. Estructura del plásmido de expresión pAEctxB. Se indican los promotores T7 y bla que permiten la expresión de las proteínas heterólogas fusionada a CTB y de la β-lactamasa (resistencia al antibiótico ampicilina), respectivamente. Además, se indican los sitios de clonado *Mlu*I y *Hind*III empleados para clonar los distintos ORF de *Bordetella pertussis*.

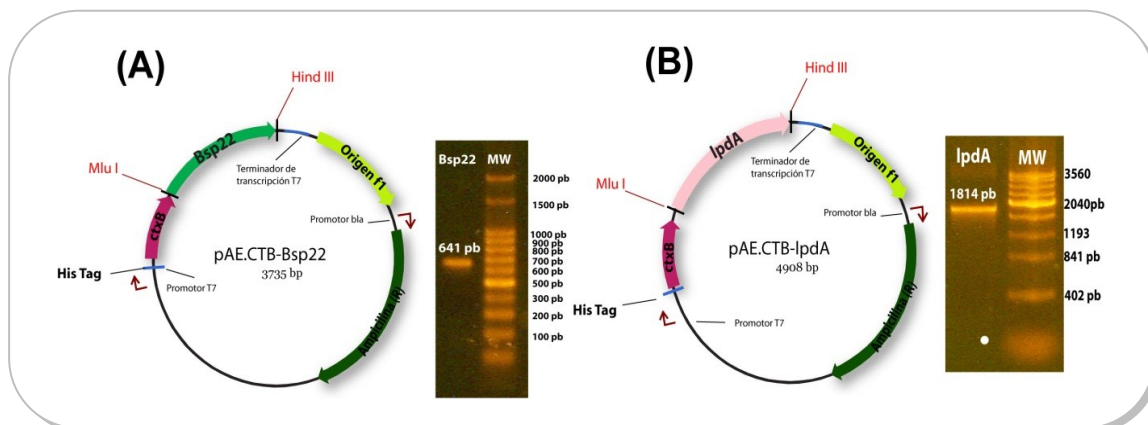


Figura 14. Generación de los vectores pAEctxB-*bsp22* y *lpdA*. Esquematización de las construcciones realizadas pAEctxB-*bsp22* (A) y pAEctxB-*lpdA* (B). A la derecha de cada esquema se muestra la corrida electroforética de los productos de amplificación obtenidos al emplear los primers específicos empleados para el clonado.

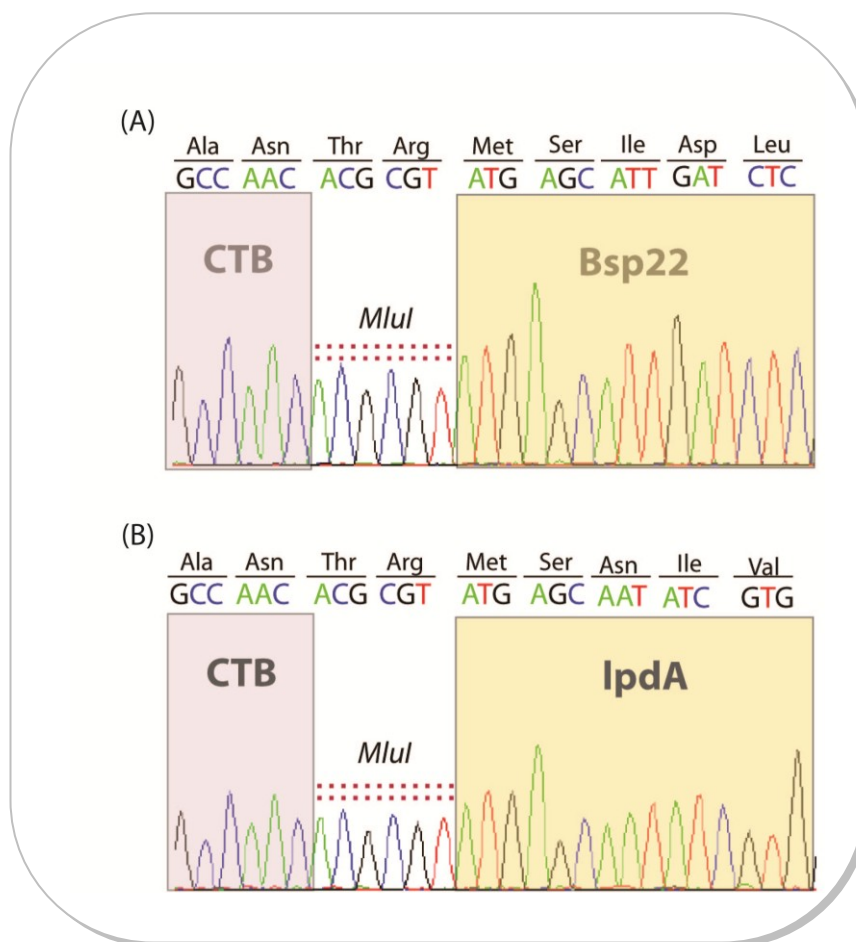


Figura 16. Cromatogramas representativos de la secuenciación con primers T7 promotor y T7 terminator de los vectores pAEctxB-*bsp22* y pAEctxB-*lpdA*. En la figura se muestran las secuencias de los extremos 5'. Con recuadros sombreados se indican regiones codificantes para CTB y para los dos genes clonados.

2.2.3 Expresión de CTB-Bsp22, CTB-LpdA, Bsp22 y LpdA.

Con el fin de evaluar la expresión de las proteínas recombinantes, se transformaron bacterias *E. coli* BL21-SI (inducibles por sal) con los plásmidos pAEctxB-*bsp22* y pAEctxB-*lpdA*. Esta cepa deriva de *E. coli* GJ1158 y tiene integrada en el cromosoma una copia de la ARN polimerasa del fago T7, bajo el control de un promotor inducible por sal (28). Dicho promotor es un elemento regulador del operón *proU*, el cual responde a variaciones de osmolaridad (90). La expresión de los productos fusionados a CTB fue ensayada en pequeña escala variando la temperatura del crecimiento bacteriano de *E. coli* a fin de disminuir la velocidad de síntesis de proteínas y mejorar el rendimiento de obtención de proteínas solubles. Se ensayaron cultivos a 37 °C, 30 °C y 20 °C. Luego de la cosecha de bacterias, se utilizaron como métodos de ruptura celular la

sonicación y/o la lisis celular mediante la utilización de la prensa francesa. Para las dos construcciones realizadas en este trabajo se observó la expresión de las proteínas recombinantes en los extractos crudos de las bacterias luego de 3 h de inducción con NaCl (NaCl 0,3 M) mediante corridas electroforéticas en geles SDS-PAGE. En la **Figura 17 A** se muestra la expresión de las proteínas recombinantes obtenidas con NaCl 0,3 M y a 37 °C. Para ambos casos se encontró también una banda con el peso molecular correspondiente al de la proteína de interés en los extractos de bacterias no inducidas, aunque en menor intensidad. Para determinar si las proteínas se expresaban de manera soluble o formando cuerpos de inclusión, se tomaron muestras a distintos tiempos post-inducción y se analizó la expresión de las proteínas tanto en el sobrenadante como en el sedimento obtenido luego de la ruptura celular. Los resultados mostraron que las proteínas recombinantes se encontraron

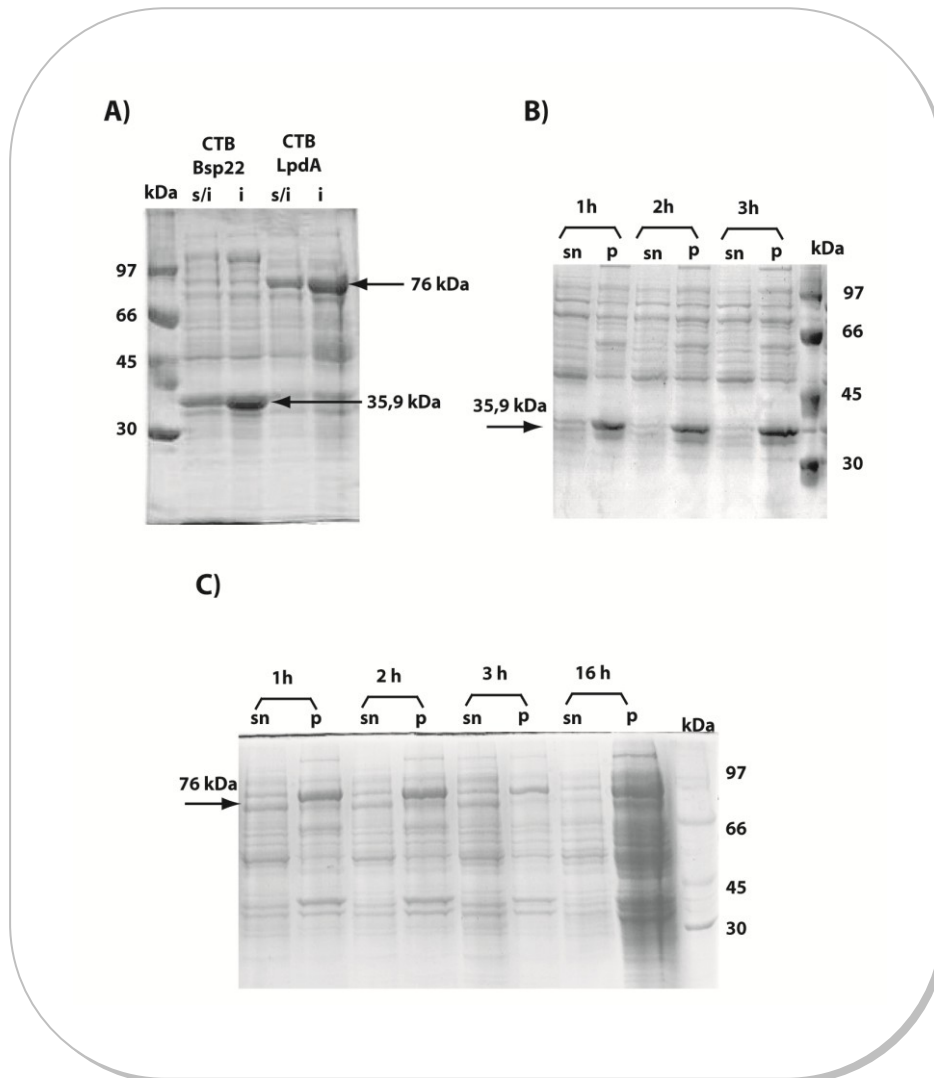


Figura 17. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes CTB-Bsp22 y CTB-LpdA en SDS-PAGE 10% (p/v). A) Extractos crudos de *E. coli* BL21 (SI) transformadas con las construcciones pAECTxB-bsp22 y pAECTxB-lpdA en condiciones no inducidas (s/i) y luego de 3 h de inducción con NaCl 0,3 M a 37°C (i). B) Cinética de expresión de la proteína CTB-Bsp22 a 20°C en *E. coli* BL21 (SI). C) Cinética de expresión de la proteína CTB-LpdA a 20°C en *E. coli* BL21 (SI). sn: sobrenadante p: pellet

mayormente formando cuerpos de inclusión insolubles. En la **Figura 17 B y C** se muestra la cinética de expresión de las proteínas CTB-Bsp22 y CTB-LpdA a 20 °C.

Siguiendo este protocolo se expresaron también las proteínas Bsp22 y LpdA no fusionadas a CTB. Los clones pDEST17-bsp22 y pDEST17-lpda fueron cedidos por la Dra. Hozbor. El plásmido pDEST17 es un vector comercial (Invitrogen) para la expresión y purificación de proteínas recombinantes, el cual posee un origen de replicación multicopia para *E. coli*. Es un vector de 6354 nucleótidos, que adiciona una cola de 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína, lo que permite una rápida purificación de la proteína de interés. Este plásmido permite la inserción de fragmentos de ADN bajo un promotor fuerte del bacteriófago T7 que resulta en una alta cantidad de proteína purificada (~20 mg/L de cultivo). Las construcciones fueron transformadas en la cepa de expresión BL21 (DE3) y la inducción se realizó con IPTG (**Figura 18 A y B**).

Cabe destacar que los pesos moleculares (PM) de las proteínas recombinantes resultaron ser ligeramente superiores respecto a los PM teóricos, debido a que la cola de 6 histidinas clonada en marco con las secuencias codificantes de *bsp22* y *lpdA* incrementa levemente el PM de la proteína recombinante.

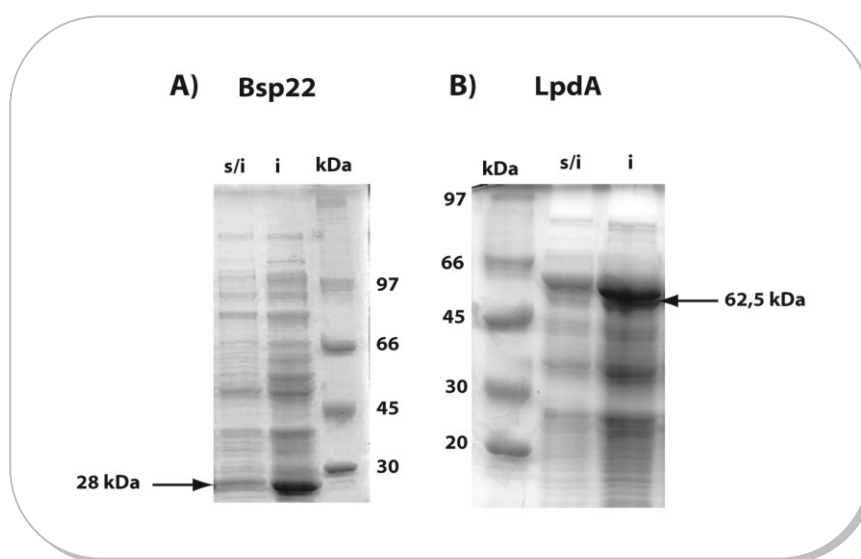


Figura 18. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes **Bs22** y **LpdA** en SDS-PAGE 10% (p/v). Extractos crudos de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con las construcciones A) pDEST17-bsp22 y B) pDEST17-lpdA en condiciones no inducidas (s/i) y luego de 3 hs de inducción con IPTG 1mM (i).

2.2.4 Inmunogenicidad de CTB-Bsp22 y CTB-LpdA

Para evaluar si las proteínas quiméricas conservaban sus sitios inmunogénicos reconocibles por anticuerpos específicos para CTB, Bsp22 y LpdA, se realizaron inmunoblots utilizando sueros específicos policlonales anti-CTB, anti-Bsp22 y anti-LpdA obtenidos por nuestro grupo. Los resultados alcanzados mostraron que las proteínas CTB-Bsp22 y CTB-LpdA fueron reconocidas tanto por el suero anti-CTB como por el suero específico contra la proteína de interés, es decir anti-Bsp22 y anti-LpdA, respectivamente. Como control negativo se empleó un extracto de proteínas de *E. coli* salvaje (no mostrado). Los resultados obtenidos muestran

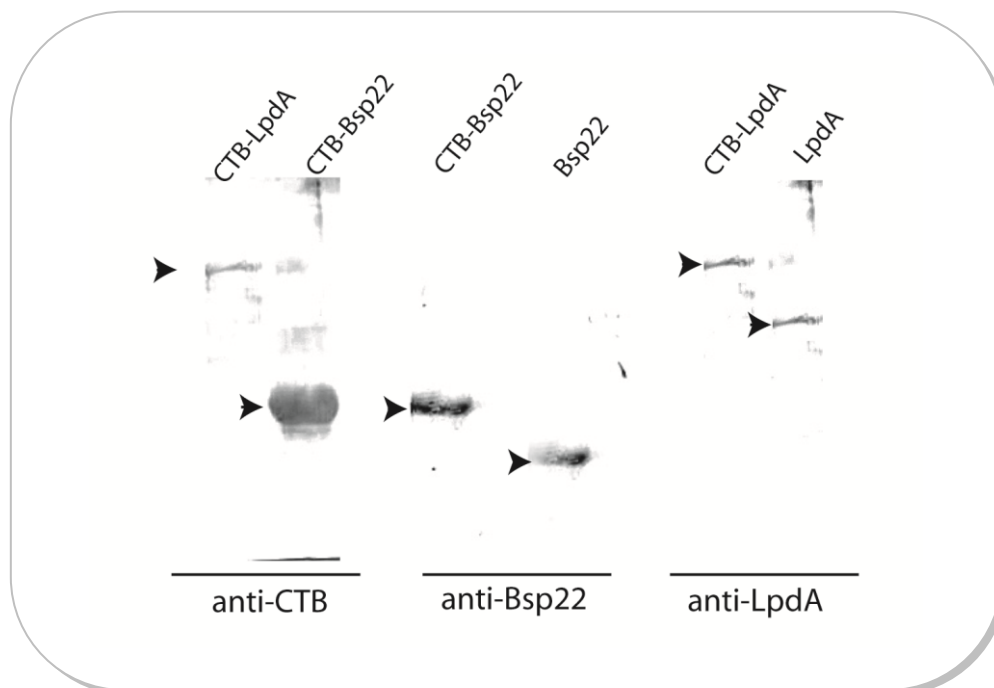


Figura 19. Inmunoblots de las proteínas recombinantes CTB-Bsp22, CTB-LpdA, Bsp22 y LpdA empleando antisueros específicos policlonales anti-CTB, anti-Bsp22 o anti-LpdA. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa y el revelado se realizó por quimioluminiscencia con ácido cumárico y luminol. Las proteínas transferidas fueron primeramente resueltas en geles SDS-PAGE 10% (p/v).

que frente a los sueros ensayados, las proteínas quiméricas son antigénicamente indistinguibles de las proteínas no fusionadas a CTB (**Figura 19**).

2.2.5 Purificación de las proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes CTB-Bsp22, CTB-LpdA, Bsp22 y LpdA fueron purificadas a partir de los cuerpos de inclusión por IMAC en condiciones desnaturizantes, con cloruro de guanidinio y urea como agentes caotrópicos según se describió en la sección de Materiales y Métodos de este trabajo. En todos los casos la purificación fue exitosa ya que si bien algunas veces se hallaron contaminantes, se detectaron bandas cuyos pesos moleculares coincidían

con los esperados para las proteínas recombinantes y sobre los que su identidad fue confirmada por MALDI-TOF (**Figura 20**).

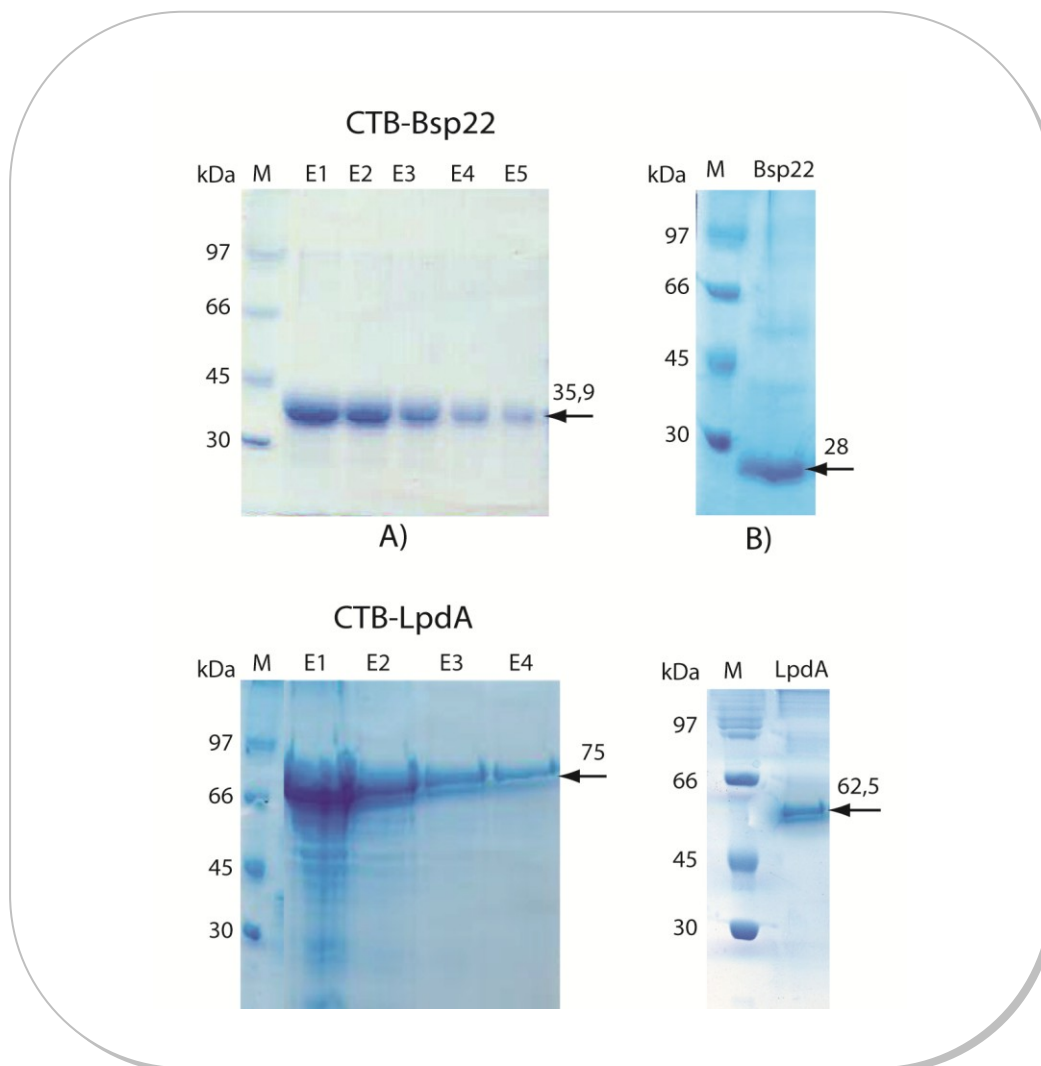


Figura 20. Purificación de las proteínas recombinantes. SDS-PAGE 10% (p/v) de las proteínas CTB-Bsp22 (A), Bsp22 (B), CTB-LpdA (C) y LpdA (D) purificadas por cromatografía de afinidad a ión metálico inmovilizado (resina de Ni-NTA) en condiciones desnaturizantes. M: marcador de peso molecular. E1-E5 corresponden a las eluciones en los tubos 1 hasta 5.

Con el fin de obtener a las proteínas en la fracción soluble, se modificaron las condiciones de cultivo pero en todos los casos la proteína recombinante se detectó en la fracción insoluble, o cuerpos de inclusión. A pesar de que las proteínas no fueron observadas en la fracción deseada mediante SDS-PAGE teñidos con *Coomassie Brilliant Blue*, se intentó la purificación de las mismas a partir de los sobrenadantes de cultivo mediante IMAC en condiciones nativas. Esta estrategia no dio resultados positivos y por ello se recurrió a la recuperación de proteína activa a partir de cuerpos de inclusión mediante el repliegamiento o *refolding* (225). Para ello,

los cuerpos de inclusión fueron solubilizados con urea 8M y luego sometidos a replegamiento por la técnica de dilución o por diálisis. La técnica por dilución fue empleada en el caso de las proteínas CTB-Bsp22 y Bsp22, y la técnica de diálisis para el caso de las proteínas CTB-LpdA y LpdA. Las proteínas replegadas fueron purificadas luego por IMAC mediante el empleo de columnas cargadas con Ni^{+2} en condiciones no desnaturizantes.

2.2.6 Recuperación de la conformación nativa de las proteínas recombinantes

Para evaluar la capacidad de las proteínas solubles CTB-Bsp22 y CTB-LpdA de formar pentámeros, se realizó un SDS-PAGE tanto con muestras tratadas en *sample buffer* en condiciones reductoras (con β -mercaptoetanol) y desnaturizadas por calor como con muestras no tratadas con este agente ni calentadas (11) (**Figura 21**).

Estos ensayos nos permitieron visualizar que las proteínas tratadas en condiciones desnaturizantes se encontraban efectivamente formando monómeros las cuales migraron como una única banda de peso molecular de 35,9 kDa para el caso de CTB-Bsp22, o de 75 kDa en el caso de CTB-LpdA.

En cambio, la muestra no tratada correspondiente a CTB-Bsp22 migró con un peso molecular aparente de 179,5 kDa correspondiente a la forma pentamérica de la proteína. Estos resultados indican que el pentámero característico de CTB nativa se formó luego del proceso de replegado. En el caso de CTB-LpdA, no se pudo observar la banda correspondiente al pentámero posiblemente a que su peso molecular de 380 kDa fue demasiado alto para resolverse en el gel utilizado.

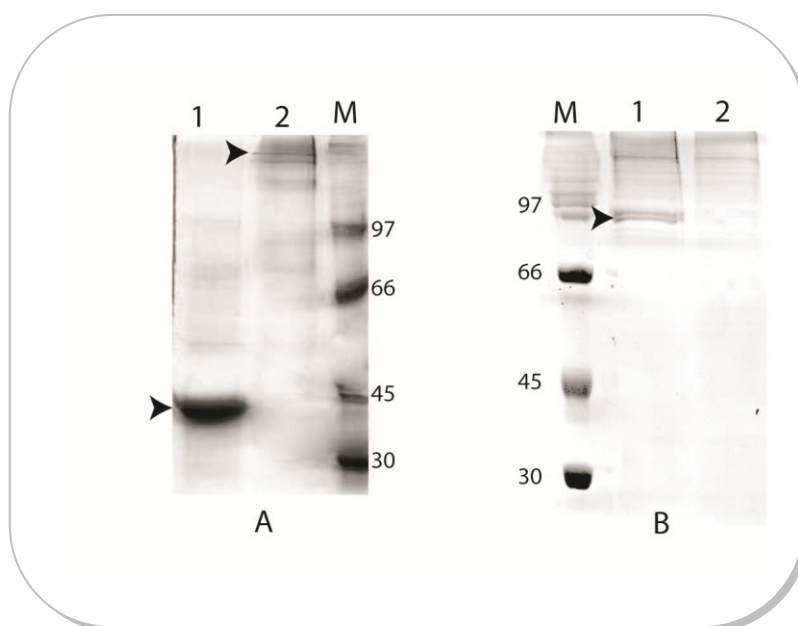


Figura 21. Proteínas quiméricas renaturalizadas y purificadas. SDS-PAGE 10% (p/v) de las proteínas CTB-Bsp22 (A) y CTB-LpdA (B) purificadas por IMAC en condiciones nativas. En todos los casos se muestra a la izquierda la muestra incubada a 100 °C y a la derecha la no calentada (sin β -mercaptoetanol). M: marcador de peso molecular

La conformación pentamérica de las proteínas fue evaluada también por su unión al gangliósido GM1 en un ensayo de ELISA, ya que es sabido que CTB en su conformación pentamérica pero no monomérica tiene una alta afinidad por GM1 (230). Como control positivo en el ensayo de ELISA se utilizó CTB comercial, y como control negativo se sensibilizó la placa de ELISA con seroalbúmina bovina (BSA). En este ensayo, tanto para las muestras de CTB comercial como para las muestras correspondientes a CTB-Bsp22 y CTB-LpdA, se observó una disminución dosis-dependiente en la absorbancia (**Figura 22**). Estos resultados sugieren fuertemente que las proteínas recombinantes obtenidas recuperaron su conformación pentamérica luego de la técnica de plegado realizado.

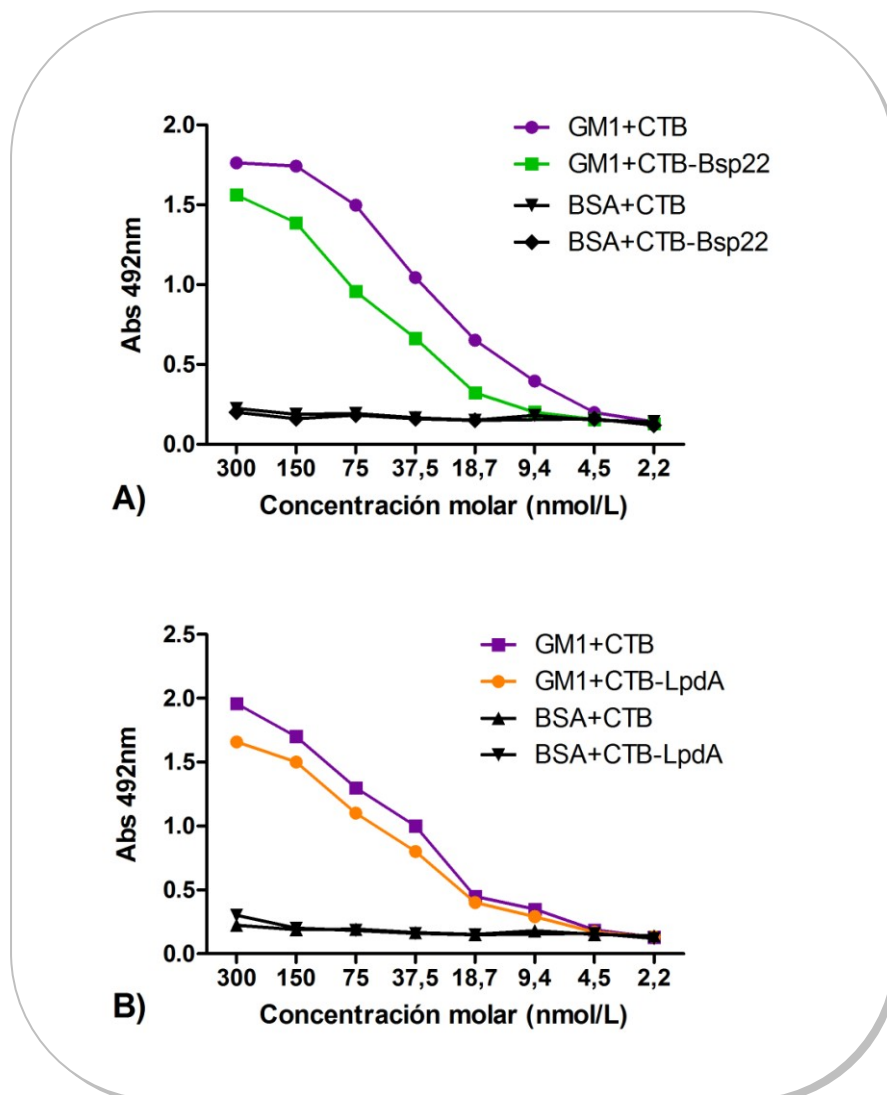


Figura 22. Ensayos de ELISA para la evaluación de la capacidad de las proteínas replegadas CTB-Bsp22, CTB-LpdA y CTB comercial de unirse a GM1. Las placas fueron sensibilizadas con GM1 o BSA (5 µg/ml). Para las determinaciones se realizaron diluciones seriadas 1:2 de las proteínas a evaluar a partir de ~300 nM de cada proteína hasta 220 pM.

También puede observarse que las curvas de CTB comercial y de las proteínas de fusión presentaron un patrón similar. Estos ensayos permitieron confirmar que la fusión de Bsp22 y LpdA a CTB no altera la estructura de CTB ni su capacidad de formar el pentámero y de unirse a GM1.

Las proteínas Bsp22 y LpdA fueron sometidas a protocolos de plegamiento similares a los antes descritos pero en estos casos no se pudo verificar el correcto plegamiento de las proteínas mediante GM1-ELISA.

2.2.7 Ensayos de inmunización y desafío por vía intranasal en el modelo murino para pertussis

Una vez obtenidas las proteínas de fusión CTB-Bsp22 y CTB-LpdA purificadas y en su conformación nativa, se procedió a evaluar la capacidad protectora de las mismas en ensayos *in vivo* empleando el modelo murino de desafío intranasal. Con este fin se realizó un esquema de 3 inmunizaciones intranasales con 20 µg de las proteínas de fusión recombinantes y el posterior desafío con una cepa virulenta de *B. pertussis* (Figura 23). En la Tabla XII se detallan los tratamientos realizados.

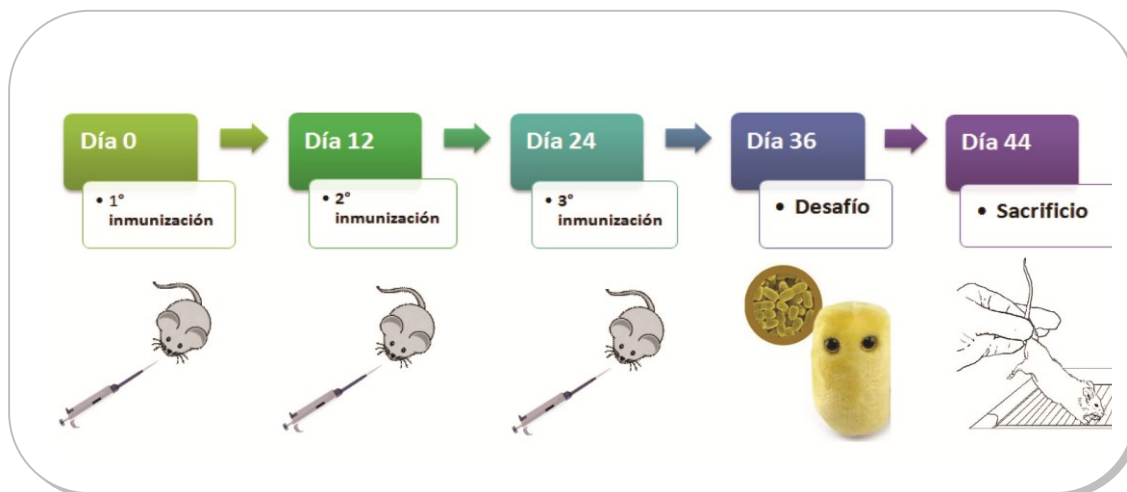


Figura 23. Esquema de inmunización y desafío con las proteínas CTB-Bsp22 y CTB-LpdA. Se realizaron tres inmunizaciones con 50 µl de muestra administradas por vía intranasal conteniendo 20 µg de inmunógeno. El desafío se realizó con 5×10^7 UFC 12 días después de la última inmunización. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 8 días postdesafío.

Debido a que estas proteínas son expresadas solamente por aislamientos clínicos de la bacteria y no por cepas incluidas en las vacunas actuales, se optó por utilizar para el desafío el aislamiento local de *B. pertussis* BP106 representativo de aislamientos locales de la colección del grupo dirigido por la Dra. Hozbor, el cual expresa tanto Bsp22 como LpdA (31). El desafío

de los ratones inmunizados o tratados con PBS fue realizado con una suspensión bacteriana de BP106 de aproximadamente 5×10^7 UFC en 50 μ l. A los 8 días

Tabla XI. Tratamientos realizados en los ensayos empleando el modelo murino

Candidato vacunal	Tratamientos				
CTB-Bsp22	PBS	aP 1/10	rBsp22	CTB-Bsp22 desnaturalizada	CTB-Bsp22 replegada
CTB-LpdA	PBS	aP 1/10	rLpdA	CTB+rLpdA	CTB-LpdA replegada

PBS: buffer fosfato empleado como control de ausencia de protección. aP: vacuna acelular comercial en dosis 1/10 de la dosis humana. r: se emplea para indicar proteína recombinante

post-desafío se evaluó el número de bacterias recuperadas de los pulmones de ratones desafiados para todos los tratamientos.

Para los ensayos con la proteína CTB-Bsp22, se incluyeron grupos de animales que fueron inmunizados con rBsp22 (Bsp22 recombinante) o con CTB-Bsp22 replegada. Este grupo fue incluido ya que es necesario que CTB se encuentre correctamente plegada para ejercer su función como adyuvante de mucosas. Como control incluimos además un grupo de animales tratados con CTB-Bsp22 desnaturalizada, de forma de poder comparar el efecto del plegamiento del candidato vacunal en los resultados. Como control negativo de la protección se utilizó un grupo de ratones inoculados con PBS y como control positivo incluimos un grupo de ratones inmunizados intraperitonealmente con una dosis de vacuna acelular comercial igual a 1/10 de la dosis utilizada en humanos (aP 1/10). En este caso se utilizó hidróxido de aluminio como adyuvante.

Por otra parte, en el ensayo de inmunización con la proteína CTB-LpdA, además de los grupos controles PBS, vacuna comercial aP 1/10 y rLpdA (LpdA recombinante), se incluyó un grupo de animales que fueron inmunizados con rLpdA mezclada con CTB comercial, de manera de comparar el efecto de CTB como adyuvante, ya sea cuando la misma es mezclada con el antígeno o genéticamente fusionada a él. En el grupo de ratones inmunizados con la fusión CTB-LpdA, la proteína se administró en su conformación nativa (ver explicación en la sección donde se presentan los resultados obtenidos). El posible contenido de LPS contaminante se eliminó de alícuotas de las proteínas recombinantes utilizando un kit comercial (Thermo Scientific-Pierce).

Con todos estos tratamientos nuestro objetivo fue **evaluar la capacidad protectora** de las proteínas CTB-Bsp22 y CTB-LpdA y **estudiar la respuesta inmune humoral contra estas**

proteínas más allá del poder protector que estas mismas pudieran ejercer en el modelo utilizado. Si bien es sabido que la respuesta inmune humoral por sí sola no alcanza para brindar una protección completa frente a la infección por *B. pertussis*, es interesante evaluarla ya que contribuye a la defensa contral el patógeno (116). Más aún, CTB como adyuvante de mucosas podría contribuir a mejorar la respuesta inmune humoral.

Comenzaremos exponiendo los resultados correspondientes a los ensayos en ratones con CTB-Bsp22 como candidato vacunal para luego presentar los correspondientes a la proteína CTB-LpdA.

I. Capacidad protectora de CTB-Bsp22

En primer lugar evaluamos la capacidad protectora de la proteína de fusión CTB-Bsp22 frente al desafío con *B. pertussis* BP106. En la **Figura 24** se muestran los resultados obtenidos respecto del número de colonias de *B. pertussis* recuperadas de los pulmones de los ratones inmunizados con CTB-Bsp22 a los 8 días post desafío en comparación con los otros tratamientos más arriba detallados. Los recuentos de bacterias realizados a partir de los animales empleados como controles fueron los esperados ya que al día 8 post desafío, de los ratones tratados con PBS se recuperaron entre 10^4 y 10^5 UFC/pulmón, mientras que de los ratones inmunizados con la vacuna acelular aP 1/10 no se contabilizó ninguna UFC. En lo que respecta al candidato vacunal ensayado, los resultados mostraron que solo aquellos animales inmunizados con la proteína rBsp22 no fusionada (20 μ g) presentaron una discreta disminución en los recuentos de UFC en pulmón, alrededor de un log con respecto al tratamiento con PBS. En los dos ensayos realizados se obtuvieron resultados similares. Este resultado resulta interesante ya que si bien no es significativo estadísticamente, hasta el presente no se había logrado ningún tipo de de protección con Bsp22 (74). Nuestras condiciones experimentales nos permitieron evidenciar al menos una disminución en los recuentos de UFC en pulmón inducido por rBsp22 cuando es administrada por vía mucosal.

Lamentablemente, en las condiciones experimentales ensayadas no pudimos observar que CTB mejorara la capacidad protectora del antígeno, en ninguna de sus conformaciones, desnaturalizada y monomérica (entre 10^4 y 10^5 UFC/pulmón) o replegada y pentamérica (10^5 UFC/pulmón). Es decir, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de animales inmunizados con los candidatos fusionados a CTB y el grupo de ratones tratados con PBS.

II. Análisis de la respuesta humoral inducida por CTB-Bsp22

Si bien CTB-Bsp22 no fue capaz de mejorar la protección frente a un desafío con *B. pertussis* luego de 3 inmunizaciones intranasales de 20 µg cada una, igualmente

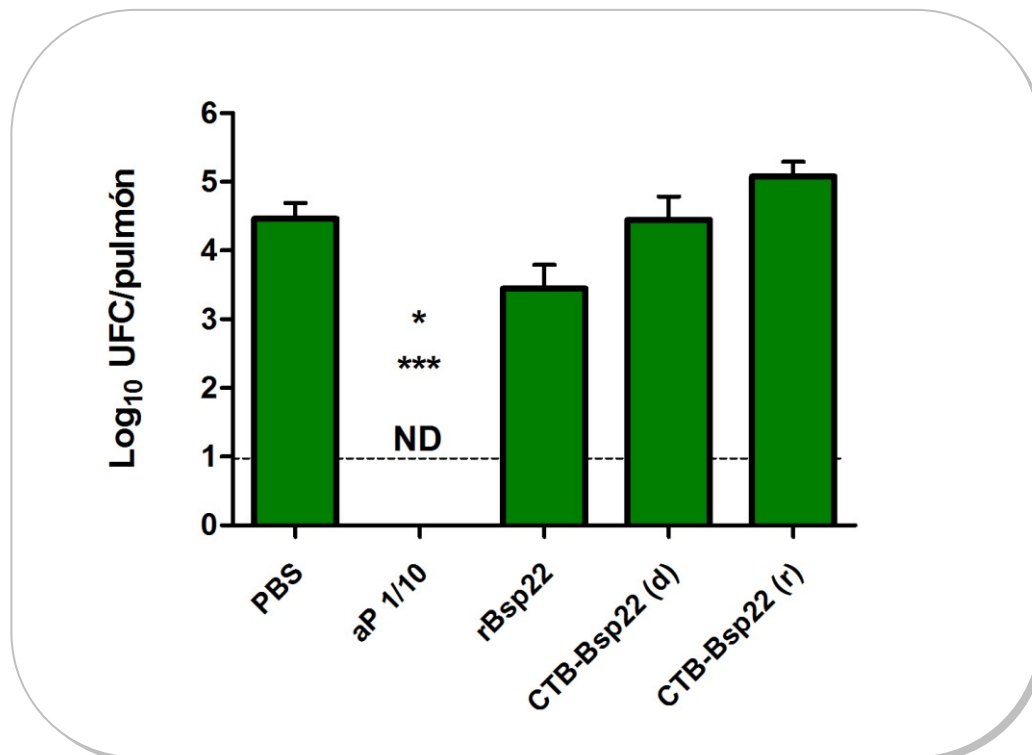


Figura 24. Evaluación de la protección contra pertussis conferida por la administración intranasal de CTB-Bsp22. Las inmunizaciones fueron realizadas con 20 µg de inmunógeno por vía intranasal. Como control positivo se inmunizó a un grupo de ratones con una vacuna acelular comercial utilizando una dosis 1/10 de de la dosis en humanos. Como cepa de desafío se empleó a la cepa BP106. Se grafica Log UFC/pulmón a los 8 días post-desafío. Las barras representan el promedio ± SEM. aP 1/10: vacuna acelular de pertussis comercial. CTB-Bsp22 (n): CTB-Bsp22 replegada. CTB-Bsp22 (d): CTB-Bsp22 desnaturalizada. * $p < 0,05$ vs rBsp22, *** $p < 0,001$ vs PBS, CTB-Bsp22 (d) y CTB-Bsp22 (r). La línea punteada indica el menor límite de detección. ND: no detectable

decidimos estudiar la respuesta inmune humoral inducida por el candidato vacunal y de esta forma ver si CTB era capaz de actuar como adyuvante de mucosas mejorando la respuesta inmune del huésped. Dado que está reportado que CTB actúa como adyuvante mejorando tanto la respuesta humoral sistémica como la respuesta inmune humoral local en la mucosa al administrarlo por vía intranasal (197), evaluamos mediante la técnica de ELISA los niveles de anticuerpos específicos IgG e IgA contra Bsp22 en suero, como también los anticuerpos específicos IgA en lavados nasales.

II.A Determinación de anticuerpos IgG e IgA séricos

En la **Figura 25** se grafican los niveles de anticuerpos IgG e IgA contra Bsp22. Los niveles de IgG se midieron luego de cada inmunización (días 12, 24 y 36) mientras que los niveles de IgA inducidos solo se midieron luego de la tercera inmunización (día 36).

En la Figura 25 A se puede observar que los niveles de anticuerpos séricos IgG específicos aumentan luego de cada inmunización a excepción del tratamiento con PBS empleado

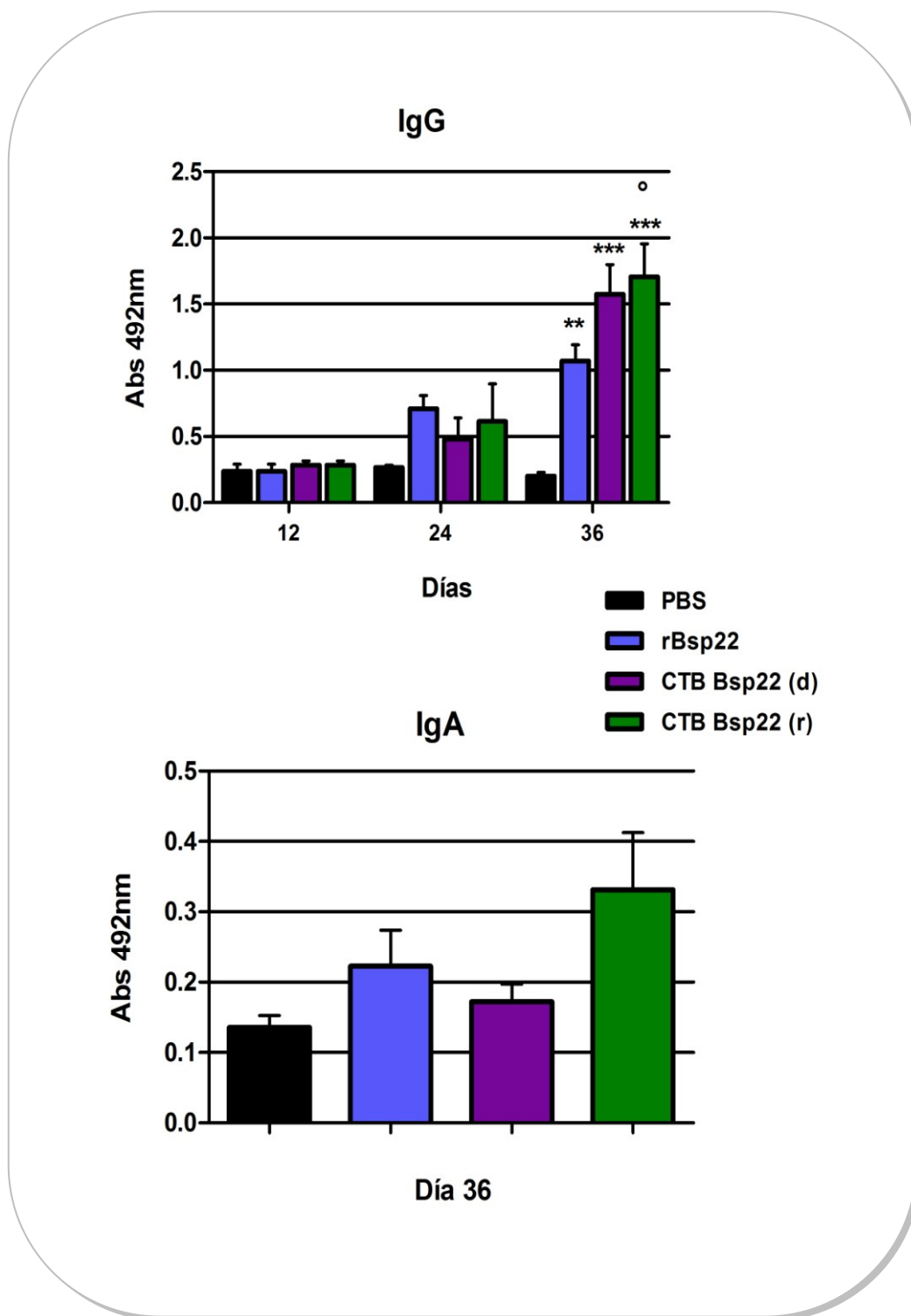


Figura 25. Respuesta humoral en suero de ratones inmunizados por vía intranasal con CTB-Bsp22. Inducción de anticuerpos anti-Bsp22 IgG (A) e IgA (B) en suero de ratones luego de ser inmunizados intranasalmente con CTB-Bsp22. En las figuras se muestran los niveles de anticuerpos IgG medidos luego de cada inmunización, y los de anticuerpos IgA en suero luego de la tercera inmunización (día 36). Para las mediciones de IgG e IgA se realizaron diluciones seriadas al medio pero partiendo de 1/20 para la primera y 1/10 para la segunda. Los valores graficados en el eje de las ordenadas corresponden al de la densidad óptica medida a 492 nm. El revelado se realizó con OPD. Cada muestra se evaluó por duplicado. Las barras representan el promedio \pm SEM. CTB-Bsp22 (r): CTB-Bsp22 replegada. CTB-Bsp22 (d): CTB-Bsp22 desnaturalizada. $^{\circ}$ $p < 0,05$ vs rBsp22, ** $p < 0,01$ vs PBS, *** $p < 0,0001$ vs PBS.

como control negativo. Al día 36, los ratones inmunizados con la proteína de fusión CTB-Bsp22, ya sea replegada (CTB-Bsp22 (r)) o desnaturalizada (CTB-Bsp22 (d)) inducen un mayor nivel de anticuerpos que los ratones inmunizados con rBsp22, indicando una respuesta inmune incrementada en los animales en donde se utilizó CTB como adyuvante. En el caso de los animales inmunizados con CTB-Bsp22 (r), esta diferencia resultó estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratones inmunizados con rBsp22 ($p < 0,05$). Por el contrario, la comparación entre ambos grupos de animales inmunizados con la proteína de fusión ya sea desnaturalizada o en confirmación nativa, no arrojó diferencias significativas entre ellos, indicando en este caso que la estructura conformacional del antígeno no influye en la generación de anticuerpos IgG séricos. Por otra parte, al medir los niveles de anticuerpos IgA específicos en suero, observamos que si bien hubo mayores niveles en el grupo de los animales inmunizados con CTB-Bsp22 (r) respecto del grupo CTB-Bsp22 (d), estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas (Figura 25 B).

II.B Determinación de niveles IgA específicos de Bsp22 en lavados nasales

Para evaluar la capacidad inmunogénica de CTB-Bsp22 en mucosas, se determinó el nivel de los anticuerpos específicos IgA contra Bsp22 en lavados nasales luego del sacrificio de los animales, al día 44. En la **Figura 26** se puede observar que los grupos de ratones inmunizados con las proteínas rBsp22 y CTB-Bsp22 (d) generaron el mismo nivel de respuesta IgA en lavados nasales. Los valores detectados fueron mayores a los observados en los animales tratados con PBS. Por otra parte, los ratones inmunizados con la proteína CTB-Bsp22 (r), mostraron valores significativamente mayores respecto a los grupos rBsp22 y CTB-Bsp22 (d). Este resultado era de esperar ya que el inmunógeno en esta conformación pentamérica puede unirse al gangliósido GM1 y ejercer su actividad adyuvante.

Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que la inmunización intranasal de ratones con el inmunógeno rBsp22 es capaz de generar una respuesta humoral en la mucosa nasal independientemente de si está fusionado a CTB. Más aún, la fusión del antígeno a CTB en su correcto plegamiento favorece la inducción de una respuesta aún mayor en la mucosa.

III. Capacidad protectora de CTB-LpdA

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos realizados con CTB-Bsp22, para los estudios con LpdA decidimos no realizar el tratamiento CTB-LpdA desnaturalizada ya que corroboramos que en su conformación monomérica CTB no es capaz de actuar como adyuvante de mucosas. Agregamos en cambio un tratamiento

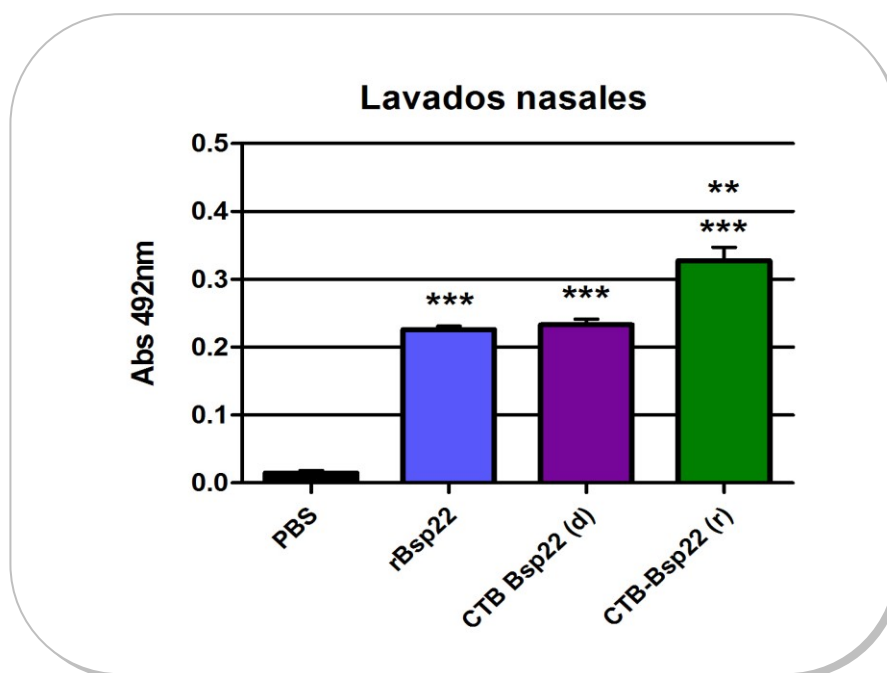


Figura 26. Respuesta humoral en lavados nasales de ratones inmunizados por vía intranasal con CTB-Bsp22. Inducción de anticuerpos anti-Bsp22 IgA en lavados nasales luego de ser inmunizados intranasalmente con CTB-Bsp22 y desafiados con BP106. Los niveles de anticuerpos IgA medidos corresponden a los del día del sacrificio. Las muestras fueron evaluadas sin dilución por triplicado. El revelado se realizó con OPD y los valores graficados en el eje de las ordenadas corresponden al de la densidad óptica medida a 492 nm. CTB-Bsp22 (r): CTB-Bsp22 replegada. CTB-Bsp22 (d): CTB-Bsp22 desnaturalizada *** $p < 0,05$ vs PBS, ** $p < 0,001$ vs rBsp22 y CTB-Bsp22 (d).

adicional: rLpdA mezclada con la proteína CTB pentamérica comercial en cantidades equimolares respecto de la proteína fusionada. De esta forma esperábamos evaluar el efecto de la fusión en la inmunogenicidad de la proteína en estudio.

En la **Figura 27** puede observarse que el recuento de UFC en pulmón fue similar en todos los grupos (alrededor de 10^7 UFC/pulmón) salvo para el control positivo en el que no se contabilizó ninguna UFC, por lo que rLpdA no fue capaz de proteger de la infección de *B. pertussis* BP106 en ninguna de las condiciones ensayadas.

IV. Análisis de la respuesta humoral inducida por CTB-LpdA

IV.A Determinación de anticuerpos específicos IgG séricos

En la **Figura 28** se muestran los resultados obtenidos al medir anticuerpos específicos IgG contra LpdA en suero.

Al igual que lo que ocurrió en el ensayo con la proteína CTB-Bsp22, los anticuerpos IgG específicos en suero aumentaron luego de cada inmunización para todos los grupos. En este

ensayo, los grupos de ratones inmunizados con rLpdA que utilizan CTB como adyuvante, ya sea

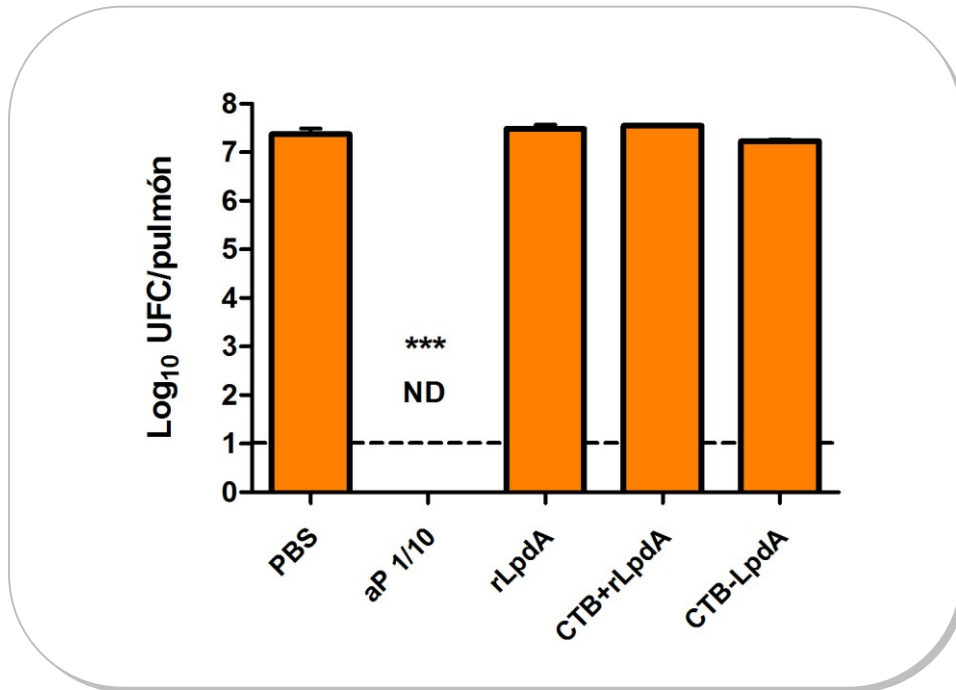


Figura 27. Evaluación de la protección contra pertussis conferida por la administración intranasal de CTB-LpdA. Las inmunizaciones fueron realizadas con 20 µg del inmunógeno a estudiar. Como cepa de desafío se empleó a la cepa BP106. Se grafica Log UFC/pulmón a los 8 días post desafío. Las barras representan el promedio ± SEM. ***p<0,0001 vs todos los grupos. La línea punteada indica el nivel límite de detección. ND, no detectable.

mezclada o fusionada al antígeno, inducen mayores niveles de

anticuerpos a partir de la segunda inmunización que los ratones inmunizados con rLpdA. Estos resultados permitieron evidenciar el efecto adyuvante de CTB sobre la proteína LpdA, siendo éste mayor cuando CTB se encuentra fusionada a la misma.

Al igual que en los ensayos realizados con CTB-Bsp22, se midieron los niveles de IgA específica en suero, aunque en todos los casos ensayados para esta proteína los niveles de esta inmunoglobulina fueron indetectables (datos no mostrados).

IV.B Determinación de niveles IgA específicos de LpdA en lavados nasales

En la **Figura 29** se presentan los resultados obtenidos al dosar los niveles de anti-LpdA IgA en los lavados nasales de los ratones inmunizados. Los grupos de ratones inmunizados con CTB-LpdA, rLpdA y CTB+rLpdA generaron niveles de anticuerpos IgA anti-LpdA mayores respecto al control negativo. Si bien el grupo de animales inmunizados con la proteína CTB-LpdA fue el que generó mayores niveles de IgA específica en los lavados nasales en comparación con los demás grupos, solo arrojó diferencias significativas con respecto al grupo que recibió como tratamiento PBS ($p < 0,05$). De esta manera, si bien los resultados no fueron estadísticamente significativos, se puede concluir, que la proteína rLpdA en concordancia con lo observado en el ensayo con la proteína CTB-Bsp22, fue capaz de generar una respuesta humoral en la mucosa

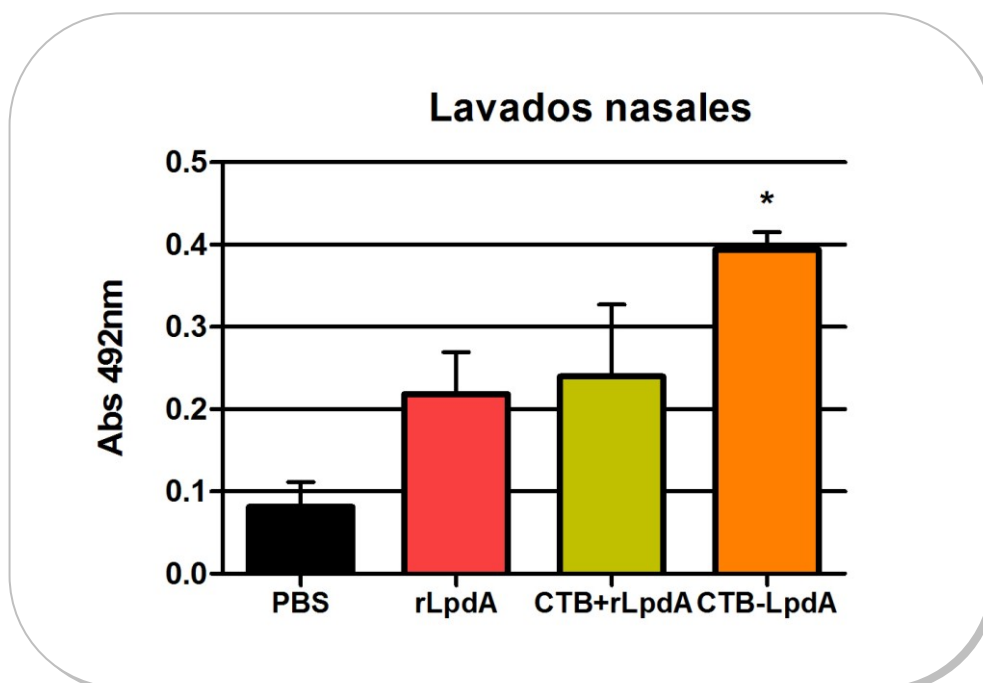


Figura 29. Respuesta humoral en lavados nasales de ratones inmunizados por vía intranasal con CTB-LpdA. Inducción de anticuerpos IgA anti-LpdA en lavados nasales luego de ser inmunizados intranasalmente con CTB-LpdA. En la figura se grafican los niveles de anticuerpos IgA medidos el día 44 los cuales son expresados en densidad óptica a 492 nm. Las muestras se evaluaron por triplicado. No se realizaron diluciones. * $p < 0,05$ vs PBS

nasal independientemente de si está fusionada o no a CTB. No obstante, la fusión del antígeno a CTB favorece la inducción de una respuesta más fuerte en la mucosa nasal.

2.3 Discusión

Teniendo en cuenta el rol potencial de la adaptación de *B. pertussis* en la resurgencia de la enfermedad, resulta de interés evaluar la capacidad inmunogénica de proteínas propias de la población bacteriana circulante. En este contexto y para este trabajo fueron seleccionadas dos proteínas, Bsp22 y LpdA, que son expresadas por la población bacteriana de *B. pertussis* que circula en la actualidad y no por cepas vacunales. Con el fin de inducir mejores respuestas, los candidatos vacunales seleccionados fueron fusionados genéticamente a un potente adyuvante de mucosas como lo es la subunidad B de la toxina colérica. Por último, se decidió emplear la vía de inmunización intranasal ya que es la vía de infección de *B. pertussis*.

Esta estrategia en principio resulta atractiva ya que el uso de vacunas recombinantes posee ventajas tales como alto rendimiento del proceso y la producción controlada de proteínas con alto grado de homogeneidad (117, 255). Además, con el uso de esta tecnología se reducirían los costos de producción de vacunas acelulares de pertussis ya que evita la obtención de biomasa de un microorganismo catalogado como fastidioso, como es el caso de *B. pertussis*. Además atacaría la problemática asociada al *shift* antigénico detectado para esta bacteria.

Las primeras etapas del trabajo fueron clonar, expresar y purificar las proteínas de fusión CTB-Bsp22 y CTB-LpdA. Afortunadamente para ambas proteínas estos objetivos fueron alcanzados de manera exitosa. Más aún, se pudo recuperar de los cuerpos de inclusión conformaciones de las proteínas en las que CTB se presenta activa (conformación pentamérica) en cuanto a su capacidad de unión a GM1.

Confirmadas todas las construcciones realizadas, procedimos con ellas a la evaluación de la **capacidad protectora** de las mismas cuando son administradas por vía intranasal. Evaluamos también los niveles de IgG e IgA en suero, para estudiar el efecto de CTB como potenciador de la **respuesta humoral sistémica**. También se dosaron los niveles de anticuerpos IgA específicos locales en la mucosa nasal para corroborar el efecto de CTB en la **respuesta humoral de la mucosa**.

Para evaluar la capacidad protectora de las proteínas fusionadas genéticamente a CTB, empleamos el modelo murino de desafío intranasal aceptado para evaluar las vacunas acelulares (181).

La selección de CTB se basó en estudios previos que probaron exitosamente la posibilidad de la utilización de la inmunización intranasal con una vacuna acelular de pertussis usando CTB

como adyuvante, en donde se mezclaron CTB recombinante con la toxina pertussis o hemaglutinina filamentosa tratada con formalina (128). Más aún, con una proteína quimérica compuesta por un fragmento divalente de la subunidad S₁ de la toxina pertussis fusionado genéticamente al fragmento A₂B de la toxina colérica se logró generar protección frente a pertussis luego de 3 inmunizaciones intranasales, demostrando una vez más el efecto potente de la toxina como adyuvante de mucosas (156).

Para la proteína rBsp22, se evaluó en este trabajo la capacidad protectora de la proteína fusionada a CTB monomérica (desnaturalizada) o pentamérica (replegada) de manera tal de dilucidar el efecto de la conformación de CTB en su rol como adyuvante. Interesantemente, rBsp22, empleada como tratamiento control, logró disminuir 1 log los recuentos de UFC en pulmón respecto al grupo control pero lamentablemente CTB-Bsp22, incluso en su conformación pentamérica no ofreció ningún nivel de protección. En el caso de rLpdA, se evaluó la capacidad protectora de esta proteína utilizando CTB como adyuvante co-administrado o fusionado genéticamente a la proteína, de manera tal de estudiar el efecto de la fusión genética de CTB al antígeno en la adyuvancia. En este caso, CTB, ya sea mezclada o fusionada genéticamente, tampoco mejoró la capacidad protectora de rLpdA. Debido a que ninguno de los candidatos vacunales fusionados a CTB protegió de manera significativa frente a una infección con el patógeno, no resultan adecuados para incluirlos como tales en futuras formulaciones vacunales. Resulta interesante sin embargo los resultados alcanzados con rBsp22 sola, ya que hasta el momento para *B. pertussis* no se habían obtenido resultados satisfactorios como los aquí alcanzados. Un estudio muy reciente en el modelo murino, publicado cuando esta tesis se encontraba en fase de redacción, mostró que la proteína rBsp22 induce niveles de anticuerpos IgG en suero luego de dos inmunizaciones intraperitoneales pero no protege frente a la infección con la cepa de referencia de *B. pertussis* 18323 (253). Nuestros resultados muestran que rBsp22 en tres dosis de 20 µg administrados por vía intranasal resulta ser protector al menos parcialmente y genera niveles de anticuerpos IgG e IGA en suero así como también IgA-S en lavados nasales.

El hecho de que rBsp22 sea más protectora que CTB-Bsp22 (r), quizás se deba a que la presencia de CTB en la proteína altere de alguna manera la exposición de algún epitope involucrado en la protección.

No existe información donde se haya evaluado la fusión de CTB a un antígeno de pertussis expresado por cepas circulantes. Si bien en nuestros experimentos la fusión de CTB al antígeno no ofreció protección frente a la infección con la cepa BP106 de *B. pertussis*, hay otros casos donde la fusión genética, e incluso la co-administración de CTB a antígenos de diversos patógenos luego de inmunizaciones intranasales protegen frente a un desafío con los

mismos. Tal es el caso de los patógenos virus Influenza A, virus de la Hepatitis B, *Schistosoma mansoni*, *Pneumocystis carinii*, *Streptococcus pneumoniae* (96, 127, 154, 201, 234), entre muchos otros.

En los ensayos de ELISA realizados para evaluar los niveles de anticuerpos IgG en suero, observamos que los dos candidatos vacunales indujeron una respuesta humoral que como era de esperar aumenta con el número de dosis administradas.

En el caso del candidato CTB-Bsp22, se observó que ya sea en su conformación monomérica o pentamérica el nivel de anticuerpos anti-Bsp22 en suero aumenta con respecto al grupo de ratones inmunizados con rBsp22 no fusionada. Luego de la tercera inmunización en el día 36, la diferencia respecto al grupo rBsp22 fue estadísticamente significativa para el grupo de CTB-Bsp22 (r), no así para el grupo CTB-Bsp22 (d). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre estos dos grupos.

En el caso del candidato CTB-LpdA, CTB también mejoró la respuesta IgG en suero, dando resultados estadísticamente significativos con respecto al grupo rLpdA, e incluso respecto al grupo CTB+LpdA al día 36, indicando que la fusión genética de CTB al inmunógeno resulta más eficiente que la mezcla de ambos en la generación de una potente respuesta humoral sistémica.

En la bibliografía está reportado que la inmunización de ratones con PT, FHA, PRN, fimbria, o ACT induce respuesta de anticuerpos en suero y confiere niveles variables de protección contra el desafío intranasal o intracerebral (178). En este Capítulo se observó que aunque se inducen anticuerpos específicos contra Bsp22 o LpdA, estas proteínas no tendrían un rol en la protección. No obstante, CTB fue capaz de actuar como adyuvante mejorando la respuesta humoral sistémica en ambos casos.

Resultados similares a los hallados en este Capítulo se observaron para *Schistosoma mansoni*, donde el antígeno Sm14 se fusionó genéticamente a CTB y se lo administró en ratones por vía intranasal en 3 inmunizaciones. En este caso, la proteína de fusión tampoco fue capaz de proteger frente a la infección con *S. mansoni*, pero sí generó una respuesta humoral específica IgG en suero y mucosa mayor a la de los grupos controles y al grupo Sm14 co-administrada a CTB (215). En un trabajo donde se fusionó la proteína A de superficie de *Streptococcus pneumoniae* a CTB, la misma generó niveles de IgG específica en suero mayores que el grupo de ratones no inmunizados, pero tampoco protegió frente a un desafío intraperitoneal con el patógeno (10). En todos estos casos es probable que la respuesta humoral sea importante pero no suficiente para conferir protección, como sería el caso de pertussis.

En cuanto a la respuesta IgA en suero, los mayores niveles de anticuerpos se encontraron en los animales inmunizados con CTB-Bsp22 (r), aunque este resultado tampoco resultó

estadísticamente significativo con respecto al resto de los grupos. La IgA sérica es principalmente monomérica y se la considera como una segunda línea de defensa, mediando la eliminación de agentes patógenos que han infringido la superficie de la mucosa. Además, facilita la citotoxicidad y fagocitosis mediada por células y dependiente de anticuerpos (268). Estudios en ratones mostraron que IgA exhibe actividad bactericida (110), pero que no es indispensable para eliminar a *B. pertussis* (266). En este Capítulo, los anticuerpos IgA en suero parecen no ser esenciales para la protección contra pertussis luego de la administración intranasal de los inmunógenos ya que en el caso de CTB-Bsp22 (n) los títulos alcanzados parecieran no ser suficientes para proteger contra la infección. Como ya se mencionó en la sección Resultados, en el experimento con CTB-LpdA los niveles de IgA no pudieron ser detectados.

Por último, al evaluar la respuesta humoral local en la mucosa nasal, en los experimentos realizados se encontraron mayores niveles de anticuerpos IgA específicos en los lavados nasales de los animales inmunizados con las proteínas de fusión. En el ensayo realizado con la proteína CTB-Bsp22, tanto el grupo rBsp22 como CTB-Bsp22 (d) mostraron niveles de anticuerpos similares. Este resultado sugiere firmemente que la inmunización de CTB-Bsp22 en su forma monomérica no permite que CTB ejerza su actividad inmuno-moduladora ya que no se observa un aumento de anticuerpos en los animales inmunizados con CTB-Bsp22 (d). En cambio, al administrar CTB-Bsp22 (r), el nivel de anticuerpos medidos aumenta significativamente con respecto a los grupos rBsp22 y CTB-Bsp22 (d) sugiriendo que se necesita del pentámero para inducir una respuesta humoral en la mucosa. En el caso de CTB-LpdA se observó una tendencia similar aunque no significativa estadísticamente. La administración de CTB-LpdA generó una respuesta levemente mayor que los grupos inmunizados con rLpdA o CTB+LpdA. Estos resultados pueden deberse a que la fusión de CTB al antígeno favorece la captación del mismo a través de la mucosa así como también su presentación a las APC del sistema inmune del huésped (120).

En general, la respuesta IgA en la mucosa representa el isotipo de anticuerpo predominante y funciona como primera línea de defensa contra patógenos que ingresan al organismo a través de la barrera mucosal. En un estudio reciente en ratones se encontró que luego de una sola dosis intranasal de una vacuna atenuada de *B. pertussis* llamada BPZE1, se generaba un nivel de protección y de respuesta inmune superior a largo plazo luego en comparación con las vacunas acelulares administradas por vía parenteral (72). Esto sugiere un papel importante para las respuestas inmunes mucosales en la protección contra infección por pertussis.

La diferencia fundamental con nuestros resultados es que en ese caso se emplea bacteria viva mientras que en este trabajo solo empleamos proteínas recombinantes fusionadas. De todas

maneras, aunque no se pudo observar poder protector, sí se evidenció en nuestros experimentos que la inmunización intranasal resulta ser una vía eficiente en la generación de una respuesta humoral, tanto a nivel sistémico como a nivel mucosal.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en este Capítulo, podemos concluir que rBsp22 resulta un inmunógeno interesante a ser ensayado en futuras formulaciones acelulares administrables por vía mucosal, pero ajustando las condiciones del ensayo. Ninguno de los inmunógenos evaluados en su capacidad protectora como proteínas de fusión, CTB-Bsp22 o CTB-LpdA resultó adecuado en su acción contra la infección por *B. pertussis*. También pudimos verificar que CTB actúa como adyuvante mejorando la respuesta humoral en suero y lavados nasales, y que para ejercer su adyuvancia de manera más efectiva es necesario que se encuentre en su conformación pentamérica y preferiblemente fusionada al antígeno. A pesar de mejorar notablemente la respuesta inmune sistémica y de mucosas generada por los antígenos, estas respuestas no contribuyeron a la eliminación bacteriana de los pulmones.

Estos resultados no descartan que en nuevos ensayos con estas proteínas pero en otras dosis o diferentes esquemas de inmunización o administradas junto a otros inmunógenos ya presentes en las formulaciones puedan mejorar la protección contra pertussis. Estas alternativas no fueron aquí ensayadas porque quedaban fuera de los objetivos específicos inicialmente planteados para el trabajo de tesis.

**CAPÍTULO
III**

***EVALUACIÓN DE CTB-FIM2
COMO CANDIDATO
VACUNAL.***

3.1 Introducción

En este capítulo presentaremos los resultados alcanzados al analizar la capacidad protectora de la proteína de fusión CTB-Fim2. Antes de ello haremos una breve reseña sobre las propiedades estructurales e inmunológicas más sobresalientes de las fimbrias de *B. pertussis*, de forma de dar contexto a nuestros hallazgos.

Las fimbrias de *B. pertussis* son estructuras proteicas poliméricas helicoidales de aproximadamente 100 nm de largo que se forman a partir del ensamblaje de monómeros. Estas estructuras que se extienden desde la membrana externa bacteriana están implicadas en la unión de la bacteria al tracto respiratorio (84). Como ya hemos mencionado en el Capítulo I, *B. pertussis* puede expresar dos fimbrias serológicamente distintas, la Fim2 y la Fim3.

Respecto de la capacidad inmunogénica de las fimbrias, existen datos que han llevado a la toma de la decisión de incluir ambos serotipos en las distintas formulaciones vacunales, tanto las celulares como las acelulares. Dentro de los datos que sustentaron tal incorporación se encuentran los reportados por Preston (210), quien observó que en la era pre-vacunal circulaban predominantemente las cepas que expresaban el serotipo 2. Sin embargo, después de la introducción de la vacunación masiva con vacunas de células enteras expresando solo el serotipo 2 (Fim2), las cepas que preveleían eran aquellas que expresaban el serotipo 3 (Fim3) (211). Este escenario se atribuyó a la falta de Fim3 en las formulaciones primarias de las vacunas celulares. Sobre la base de estos datos epidemiológicos, la OMS recomendó en 1979 que tanto la Fim2 como la Fim3 debían incluirse en las vacunas contra pertussis (261). Pese a esta recomendación se siguió observando la circulación predominante de cepas que expresan Fim3. Esta observación llevó a pensar que las nuevas vacunas de células enteras todavía contenían menos Fim3 y/o que Fim3 podría ser menos inmunogénica que Fim2 (209, 211). Reforzando la hipótesis cuantitativa, Carter (46) y Ashworth (14) mostraron que la cantidad de fimbria que expresan las cepas que llevan al serotipo 2 es superior al de las que expresan el serotipo 3. En las vacunas acelulares pentavalentes que contienen ambos serotipos de fimbria, esta diferencia cuantitativa entre las dos fimbrias se mantiene ya que la relación en peso reportada por los fabricantes es de alrededor de 1,5-2:1. Por lo tanto, el mayor contenido de Fim2 podría ser una característica común de ambos tipos de vacunas celulares y acelulares. Sin embargo, la hipótesis alternativa sobre la menor capacidad inmunogénica de Fim3 fue recientemente demostrada por nuestro grupo pudiendo entonces ser la suma de los dos

fenómenos la responsable de la selección en la actualidad de cepas expresando Fim3 (Castuma *et. al.*, manuscrito en preparación).

Más allá de estas diferencias, ambas proteínas son buenos inmunógenos cuando son administrados por vía sistémica. Además, las fimbrias resultan atractivas para usar como inmunógenos administrados por vía de mucosas ya que actúan como PAMPs (13, 189). Se han realizado estudios de inmunización y desafío en el modelo murino con la Fim2 purificada a partir de *B. pertussis* y se ha visto que la misma protege al administrarla por vía intraperitoneal, subcutánea u oral (131, 217, 263). Dado estos resultados y con el objetivo de incrementar los rendimientos en la obtención de Fim2, otros autores realizaron construcciones para lograr que *E. coli* lograra expresar la proteína. Este objetivo fue alcanzado con éxito pero lamentablemente, los ensayos realizados utilizando el modelo murino mostraron que la fimbria 2 recombinante administrada por vía intraperitoneal no es protectora (270).

En este contexto nos propusimos sobrellevar esta deficiencia de la proteína recombinante, fusionando la Fim2 recombinante a CTB. Los resultados alcanzados durante la construcción de esta proteína como así también en los estudios realizados en el modelo murino se presentan a continuación.

3.2 Resultados

3.2.1 Clonado, expresión y purificación de CTB-Fim2

Para obtener la proteína de fusion CTB-Fim2 primeramente clonamos la secuencia de ADN que codifica para la proteína Fim2. Para ello realizamos ensayos de PCR empleando *primers* que diseñamos de forma de incorporar los sitios *MluI* y *HindIII* en los extremos. El tamaño esperado del producto fue de 656 bp.

A diferencia de la estrategia utilizada para el clonado de los genes *bsp22* y *lpdA*, el amplicón *fim2* fue clonado en el vector pGEM-T. Luego de la ligación y transformación, las bacterias transformantes conteniendo el plásmido recombinante fueron seleccionadas en medio LB suplementado con X-Gal y ampicilina como colonias blancas y resistentes a dicho antibiótico. La presencia de la secuencia de ADN en el plásmido fue confirmada mediante la realización de ensayos *colony* PCR utilizando los *primers* de clonado. Los plásmidos que arrojaron un resultado positivo en las PCR fueron luego digeridos con las enzimas de restricción *MluI* y *HindIII* y el inserto liberado fue purificado con un kit comercial (Promega) y clonado en el

vector pAEctxB (**Figura 30**). Esta construcción final fue corroborada por *colony* PCR, digestión con enzimas de restricción y, posteriormente, por secuenciación.

La expresión de CTB-Fim2 se realizó de la misma manera que con las proteínas CTB-Bsp22 y CTB-LpdA. El plásmido pAEctxb-fim2 se transformó en bacterias BL21-SI y la expresión

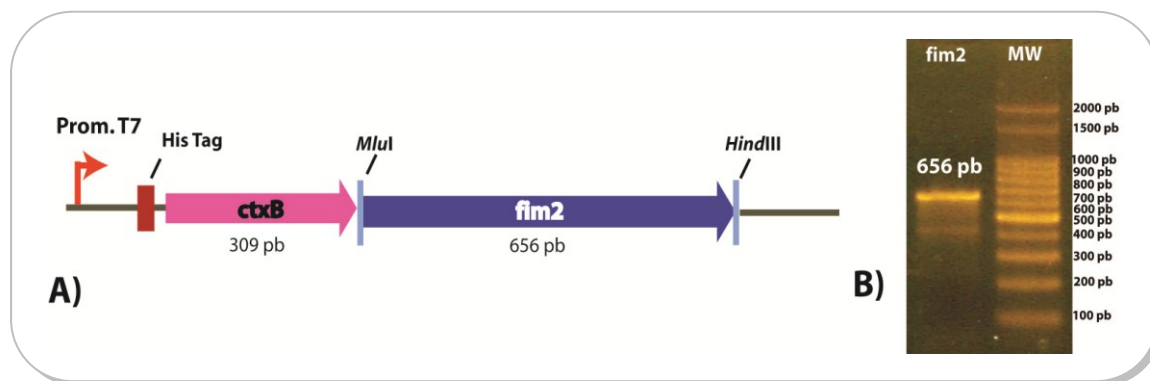


Figura 30. Esquema del vector pAEctxB-fim2. (A) Construcción pAEctxB-fim2. (B) Producto de PCR obtenido con los primers de clonado.

de la proteína recombinante fue ensayada en pequeña escala a 37 °C, 30 °C y 20 °C, utilizando como método de ruptura celular a la sonicación. En todos los casos ensayados se observó la sobreexpresión de CTB-Fim2 en extractos crudos de bacteria luego de 3 h de inducción con NaCl mediante corridas electroforéticas en geles desnaturizantes SDS-PAGE 10% p/v (**Figura 31**). En la Figura 31 A se muestra la sobreexpresión a 37 °C de una proteína cuyo peso molecular coincide con el esperado para la proteína recombinante de fusión (36 kDa). En estos ensayos se encontró que CTB-Fim2 se hallaba formando cuerpos de inclusión insolubles en todas las condiciones ensayadas, con lo cual se procedió a su purificación por IMAC en una columna cargada con Ni⁺² en condiciones desnaturizantes (Figura 31 B). Por último, para corroborar que CTB-Fim2 conservaba sus sitios antigénicos, se realizó un inmunoblot utilizando un suero policlonal anti-CTB, en donde la proteína quimérica fue reconocida por el anti-suero (Figura 31 C).

3.2.2 Recuperación de la conformación nativa

Con el objetivo de obtener a la proteína CTB-Fim2 en forma soluble, se modificaron las condiciones de expresión al igual que lo hicimos para las otras proteínas recombinantes descritas en el Capítulo II. Lamentablemente ninguna de las estrategias utilizadas arrojó un resultado satisfactorio por lo que se procedió a replegar la proteína mediante la técnica de diálisis. Las proteínas renaturalizadas con esta metodología luego fueron purificadas

empleando columnas cargadas con Ni^{+2} en condiciones no desnaturizantes. El correcto plegamiento de la proteína se corroboró mediante un SDS-PAGE en las mismas condiciones que en el Capítulo II (**Figura 32 A**). En este gel pudo apreciarse una

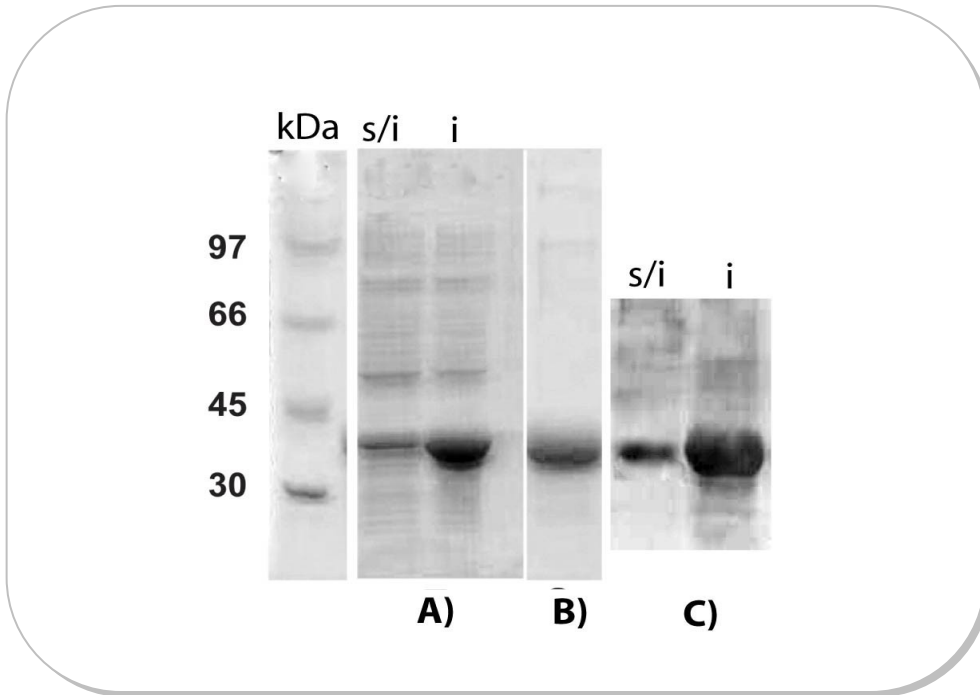


Figura 31. Expresión, purificación y análisis de la proteína CTB-Fim2 por inmunoblot. A) Corrida electroforética en geles SDS-PAGE 10% (p/v) de la preparación proteica obtenida luego de inducir la expresión de la proteína con NaCl 0,3M durante 3 h a 37 °C. B) Corrida electroforética en geles SDS-PAGE 10% p/v de la preparación proteica obtenida luego de la elución de la resina de Ni²⁺ con imidazol 250 mM C) Inmunoblot utilizando un anti-suero contra CTB (1/2500). s/i: extractos de bacteria crudos sin inducir, i: inducido

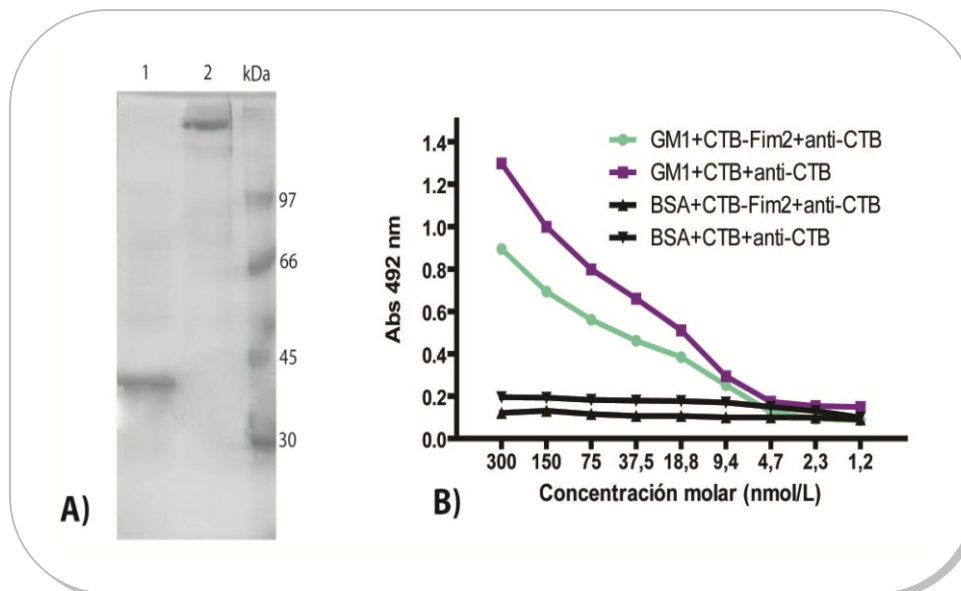


Figura 32. Análisis de la recuperación de la conformación nativa de CTB-Fim2 mediante corridas electroforéticas en geles SDS-PAGE y GM1 ELISA. A) Corrida electroforética en geles SDS-PAGE 10% (p/v) de CTB-Fim2 purificada por IMAC en condiciones nativas. La calle 1 corresponde a la muestra purificada incubada a 100 °C tratada con β-mercaptoetanol, mientras que en la calle 2 se muestra la muestra proteica no calentada (sin β-mercaptoetanol). B) Ensayo de unión a GM1 por ELISA de CTB-Fim2 replegada y CTB comercial. Las placas fueron sensibilizadas con GM1 o BSA. Se hicieron diluciones seriadas de las proteínas 1:2 a partir de ~300 nM de cada proteína (hasta 220 pM). El revelado se realizó con OPD y se midió la absorbancia a 492 nm

banda de 36 kDa correspondiente al monómero en la muestra tratada (calle 1) y una banda de peso molecular aparente de 180 kDa para la muestra no tratada (calle 2). Este PM de 180 kDa se correspondería a la forma pentámerica de la proteína, resultado que sugiere que el proceso de replegado fue exitoso.

Se realizó también un ensayo GM1-ELISA en donde se observó una disminución en la absorbancia de una manera dosis-dependiente tanto para el control positivo (CTB comercial) como para la muestra correspondiente a CTB-Fim2, indicando que la proteína de fusión replegada es capaz de unirse a GM1 (**Figura 32 B**). Todos estos resultados tomados en conjunto permiten considerar que la conformación de CTB-Fim2 en lo que respecta a CTB es la que corresponde a la forma nativa. Más aún, los resultados alcanzados muestran que la presencia de 5 moléculas de Fim2 no elimina la capacidad del pentámero CTB de unirse a su receptor celular GM1.

Una vez más, estos hallazgos muestran la viabilidad de construir proteínas de fusión de antígenos heterólogos a CTB.

3.2.3 Ensayos de inmunización y desafío

Una vez obtenida la proteína de fusión CTB-Fim2 purificada en una conformación nativa, se procedió a realizar los ensayos de inmunización y desafío en el modelo murino. En estos ensayos, además del grupo de animales inmunizados con CTB-Fim2, se incluyeron grupos de ratones inmunizados con Fim2 recombinante (rFim2), con rFim2 mezclada con CTB comercial (CTB+rFim2) o con Fimbria2 purificada a partir de un cultivo de *Bordetella pertussis*, a la cual llamaremos BpFim2. La inclusión de este último tratamiento tuvo como objetivo comparar la capacidad protectora de esta proteína con la de la Fim2 recombinante. BpFim2 y rFim2 purificadas fueron cedidas por el grupo de investigación del laboratorio VacSal que dirige la Dra Hozbor. Como control negativo de estos ensayos se utilizaron animales tratados con PBS y CTB comercial. Como control positivo incluimos un grupo de ratones inmunizados intraperitonealmente con una dosis de vacuna acelular comercial utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante.

El posible contenido de LPS contaminante se eliminó de alícuotas de las proteínas recombinantes utilizando un kit comercial (Thermo Scientific-Pierce).

En este experimento se utilizó nuevamente la vía intranasal como ruta de desafío y como principal vía de inmunización. No obstante, se agregaron algunos grupos de animales inmunizados por vía intraperitoneal con el objetivo de poder comparar los efectos de ambas rutas de inmunización en la protección y generación de respuesta inmune humoral. La dosis

de inmunógeno utilizada fue de 20 µg, aunque también se probaron grupos inmunizados con una dosis más alta de 50 µg. En los grupos de animales inmunizados intraperitonealmente se utilizó hidróxido de aluminio como adyuvante, el cual se utiliza actualmente en las vacunas acelulares de pertussis. En todos los casos, como cepa de desafío se empleó la cepa bacteriana Tohama I que solo expresa el serotipo 2. Esta cepa fue aislada en Japón en 1952 y su genoma ha sido completamente secuenciado (200). En la actualidad, esta cepa se emplea en la producción de las vacunas acelulares .

En la **Tabla XIII** se resumen los tratamientos evaluados, y el esquema de inmunización y desafío es el mismo que fue utilizado en el Capítulo II.

Tabla XII. Grupos de ratones inmunizados con sus respectivos inmunógenos y dosis utilizadas.

Tratamiento	Vía de inmunización	
	Intranasal	Intraperitoneal
PBS	50 µl	-
CTB	5 µg	-
aP 1/10	-	50 µl
rFim2	20 µg o 50 µg	20 µg o 50 µg
BpFim2	50 µg	-
CTB+rFim2	20 µg o 50 µg	-
CTB-Fim2	20 µg o 50 µg	50 µg

I. Capacidad protectora de CTB-Fim2

Para evaluar la efectividad de la inmunización intranasal (IN) o intraperitoneal (IP) con CTB-Fim2 en prevenir la infección pulmonar causada por *B. pertussis*, ratones Balb/c hembras fueron inmunizados 3 veces por vía IN o IP con 50 µl conteniendo 20 o 50 µg de proteína y desafiados con la cepa Tohama I. Los resultados alcanzados en estos experimentos se muestran en la **Figura 33**, en donde se vio que la inmunización con 20 µg de rFim2 por vía intranasal o por vía intraperitoneal no resulta protectora ya que los recuentos de las bacterias recuperadas de los pulmones (Log UFC/pulmón=4,8) son similares a los hallados en los grupos control PBS y CTB (Log UFC/pulmón= 4,9) (Figura 33 A). Resultados similares se observaron para el tratamiento rFim2 mezclada con CTB comercial (Log UFC/pulmón=4,3). La reducción en el recuento de colonias más importante se detectó en el grupo de ratones inmunizados intranasalmente con 20 µg de CTB-Fim2 (Log UFC/pulmón=2,9), mostrando una disminución de 2 logs en los recuentos de colonias de *B. pertussis* respecto de los hallados en los controles

PBS y CTB y en los grupos inmunizados con rFim2 por vía IN o IP ($p < 0,000,1$). Esta disminución en el número de colonias también es estadísticamente significativa en comparación con el grupo CTB+rFim2 ($p < 0,001$). Nuevamente, en los grupos inmunizados con la vacuna comercial

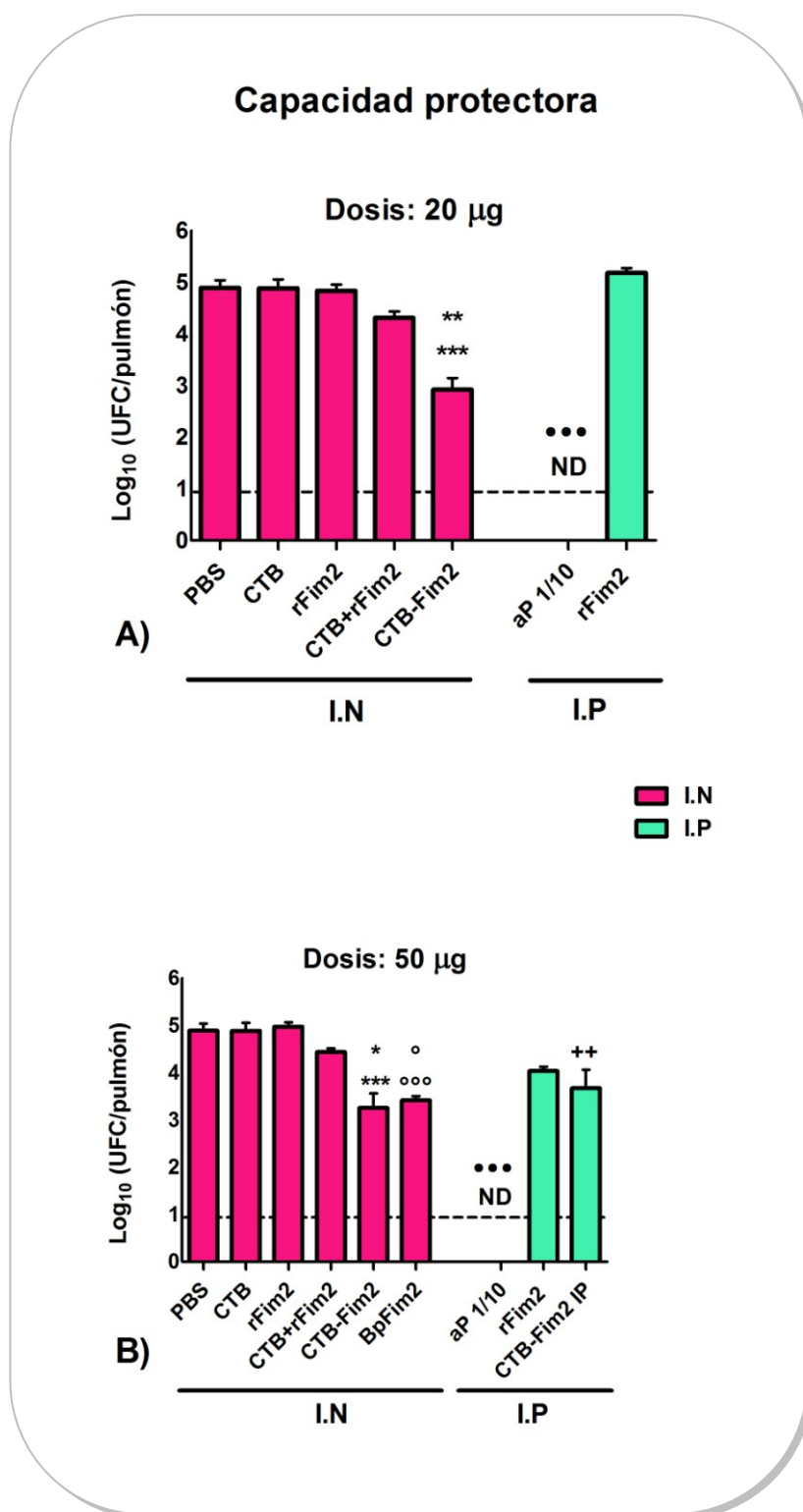


Figura 33. Evaluación de la protección contra pertussis conferida por la administración intranasal de CTB-Fim2. Las inmunizaciones fueron realizadas con A) 20 μg o B) 50 μg de inmunógeno por vía intranasal. Como cepa de desafío se empleó la cepa Tohama I. Las barras representan el promedio \pm SEM. * $p < 0,05$ vs CTB+rFim2 50 μg , ** $p < 0,001$ vs CTB+rFim2 20 μg , *** $p < 0,0001$ vs rFim2 20 μg IN, PBS y CTB, ++ $p < 0,001$ vs rFim IP 50 μg , PBS y CTB, ° $p < 0,05$ vs CTB+rFim2 50 μg , °°° $p < 0,0001$ vs rFim2 50 μg , PBS y CTB, ●●● $p < 0,001$ vs todos los grupos. La línea punteada indica el menor límite de detección.

no se detectaron UFC en placa. En los ensayos realizados con mayores cantidades de inmunógeno (50 µg) se tuvieron resultados similares a los obtenidos con 20 µg. Estos muestran que ni duplicando la dosis administrada, los tratamientos rFim2 IN o IP, o CTB+rFim2 resultan protectores frente al desafío con *B. pertussis*. Los únicos animales inoculados con inmunógenos recombinantes en donde se observaron una disminución significativa en el recuento de colonias respecto de los grupos PBS, CTB y rFim2 fueron aquellos inmunizados con CTB-Fim2 IN (Log UFC/pulmón=3,3 logs, $p<0,001$) o IP (Log UFC/pulmón= 3,7 logs, $p<0,01$). Como puede observarse, para el tratamiento CTB-Fim2 no se observaron diferencias significativas entre las distintas vías de inmunización utilizadas, aunque en el grupo inmunizado intranasalmente el recuento de colonias fue levemente menor.

En estos ensayos también pudimos detectar que BpFim2 en una dosis de 50 µg es capaz de proteger frente al desafío intranasal con *B. pertussis*, arrojando un valor de UFC en escala logarítmica de 3,4 ($p<0,0001$ respecto los grupos PBS, CTB y rFim). Estos valores son menores que los controles negativos y similares a los de los grupos CTB-Fim2 IN e IP.

Todos estos resultados nos permiten concluir que la proteína Fim2 aislada de *B. pertussis* funciona como buen inmunógeno pero en cambio la proteína recombinante rFim2 no posee actividad protectora en ninguna de las dosis ni vías de inmunización ensayadas. El agregado de CTB comercial a la preparación de rFim2 no revierte la mala capacidad protectora de la proteína recombinante. Solo se logran niveles adecuados de protección cuando rFim2 se fusiona a CTB, con lo cual podemos atribuir la capacidad protectora del inmunógeno a la fusión genética del antígeno al adyuvante de mucosas. La capacidad protectora de la proteína fusionada CTB-Fim2 fue evidenciada tanto cuando es administrada por vía sistémica como por vía mucosal.

II. Análisis de la respuesta humoral inducida por CTB-Fim2

II.A Determinación de anticuerpos IgG específicos en suero.

Para avanzar en el conocimiento de las propiedades inmunogénicas de la proteína CTB-Fim2, realizamos ensayos de ELISA para evaluar la respuesta inmune humoral inducida por esta proteína. Para ello obtuvimos sueros de los grupos de ratones inmunizados por vía sistémica o mucosal con CTB-Fim2 en dosis de 20 y 50 µg. Nos resultó interesante comparar la vía de inmunización intranasal con la intraperitoneal ya que es bien sabido que ésta última genera

una fuerte respuesta humoral sistémica frente a varios antígenos de pertussis (191, 243). Las muestras se tomaron en distintos días post inmunización y antes del desafío con la cepa *B. pertussis* Tohama I. En la **Figura 34** se muestran los resultados obtenidos con las muestras recolectadas al día 36 post inicio de los tratamientos, un día antes del desafío con *B. pertussis*. Como control se emplearon

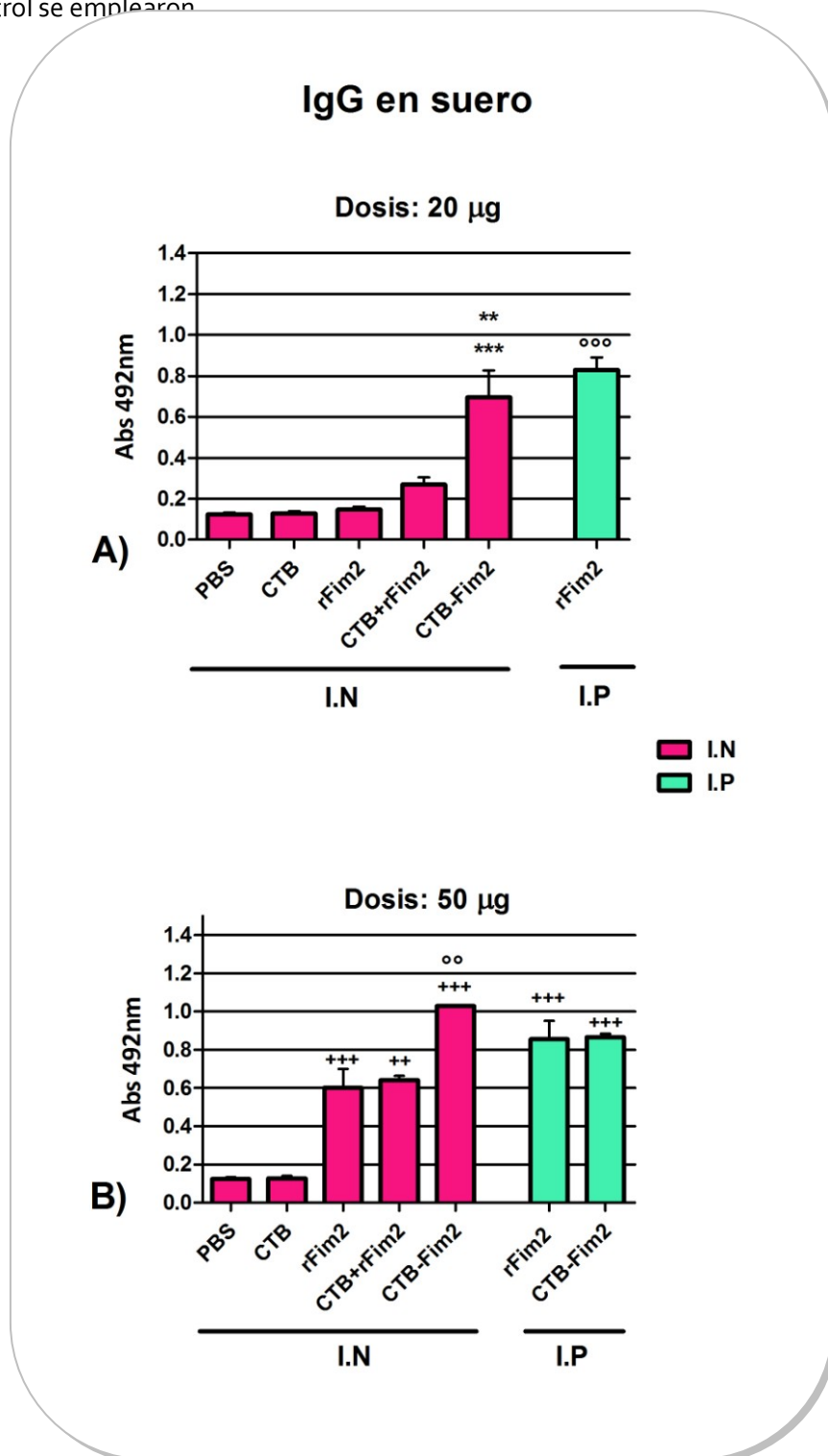


Figura 34. Evaluación de los niveles de IgG anti-Fim2 mediante ensayos de ELISA en sueros de ratones inmunizados con CTB-Fim2. Las placas fueron cubiertas con una solución de rFim2 (5 μ g/ml). Los resultados presentados se corresponden a los obtenidos en las muestras tomadas al día 36 post-inicio de tratamiento. Los mismos se presentaron como medidas de abs a 492 nm. Las barras representan el promedio \pm SEM. En el panel A se presentan los resultados obtenidos cuando la dosis de CTB-Fim2 fue de 20 μ g, mientras que en el panel B cuando fue de 50 μ g de CTB-Fim2. Con distinto color se indican las vías de inmunización empleadas. Las muestras fueron evaluadas por duplicado. **p

muestras obtenidas de ratones tratados con PBS, CTB y rFim2. También se incluyeron en los análisis muestras obtenidas de los ratones tratados con CTB+rFim2.

En el panel A se muestran los resultados alcanzados cuando la dosis fue de 20 µg y en el panel B cuando la dosis fue de 50 µg. Como puede observarse en la Figura 34 A, de todos los tratamientos ensayados por vía intranasal, el correspondiente a CTB-Fim2 presentó los niveles más altos de IgG anti-Fim2. En este caso, los niveles de IgG anti-Fim2 alcanzados fueron similares a los obtenidos por vía sistémica (intraperitoneal) para rFim2. Se esperaba que los niveles de anticuerpos inducidos por vía intraperitoneal fueran altos ya que esta vía genera una fuerte respuesta humoral IgG en suero. Interesantemente, la inmunización intranasal con 20 µg de CTB-Fim2 resultó en niveles significativamente mayores de anti-Fim2 IgG en suero que los grupos rFim2 IN ($p < 0,0001$) y CTB+rFim2 ($p < 0,001$). Todos estos resultados indicarían que la inmunización IN de rFim2 fusionada genéticamente a CTB mejora la respuesta IgG en suero de manera equiparable a la inmunización IP con el antígeno solo.

Cuando las dosis ensayadas fueron de 50 µg, los niveles de IgG específica en suero aumentan respecto de los hallados con la dosis de 20 µg en todos los tratamientos a excepción de los controles negativos (Figura 34 B). No se detectaron diferencias significativas entre los niveles séricos de IgG hallados en los animales inmunizados por vía sistémica o mucosal con CTB-Fim2, con lo cual ambas vías de inmunización resultaron igualmente eficaces en la generación de una respuesta de IgG en suero con este inmunógeno. Cuando se comparan los niveles de IgG hallados en los grupos rFim2 IP con los de CTB-Fim2 IP, los mismos resultan similares mostrando que CTB no sería requerida para mejorar la respuesta inmune humoral cuando la dosis que se emplea para la inmunización es de 50 µg.

II.B Determinación de anticuerpos IgG e IgA específicos en lavados broncoalveolares (BAL).

Puesto que una de las características distintivas de la inmunidad en mucosas es la producción de IgA secretora, la cual interviene en el control de diferentes infecciones bacterianas y

virales, decidimos evaluar la presencia de esta inmunoglobulina en los pulmones de los ratones inmunizados con CTB-Fim2. Para ello realizamos ensayos de ELISA utilizando como muestras a los lavados bronqueoalveolares (BAL) obtenidos de los ratones inmunizados y tratados según fue especificado en la sección anterior. Los resultados alcanzados se muestran en las Figuras 35 y 36. Como puede observarse en la **Figura 35**, la administración intranasal de 20 o 50 μg de rFim2 no indujo niveles significativamente apreciables de IgG en los BAL obtenidos. Sin embargo, cuando se administró rFim2 por vía sistémica, la proteína indujo un aumento en los títulos de anticuerpos, independientemente de la cantidad de inmunógeno dado y con una diferencia significativa en el caso de la dosis de 20 μg ($p < 0,05$) respecto los grupos rFim2 IN y controles. Estos resultados muestran una vez más, que la inmunización por vía sistémica de rFim es más efectiva que la intranasal en lo que se refiere a la generación de anticuerpos IgG, en este caso locales, cuando se administra el inmunógeno por sí solo. El mismo comportamiento se observó con el grupo CTB+rFim2 en ambas dosis ($p < 0,001$ para la dosis de 20 μg). Por su parte, la administración por vía intranasal de 20 o 50 μg de CTB-Fim2 IN generó niveles de IgG en BAL significativamente más altos que los hallados en los grupos de ratones inmunizados con rFim2 IN ($p < 0,0001$). Cuando la dosis empleada fue de 50 μg de CTB-Fim2 IN, los niveles de anticuerpos medidos fueron los más altos de todos los grupos y en este caso, hubo un aumento estadísticamente significativo en comparación con los grupos de animales inmunizados con 50 μg de rFim2 IP y CTB-Fim2 IP ($p < 0,05$). Estos resultados en conjunto indican por un lado que la utilización de CTB como adyuvante, ya sea mezclado o fusionado genéticamente al antígeno, aumenta la producción de anticuerpos específicos IgG locales en BAL. Por otro lado, cuando se usa CTB genéticamente fusionada al antígeno como adyuvante, la vía intranasal resulta más efectiva que la intraperitoneal en la generación de respuesta humoral local.

Al evaluar los niveles de anticuerpos IgA específicos en los BAL, detectamos que de los grupos inmunizados intranasalmente, solo el correspondiente a CTB-Fim2 en las dos dosis ensayadas indujo niveles de anticuerpos altos (Figura 36 A). La administración de los inmunógenos por vía sistémica no indujo niveles altos de IgA, ni aún cuando se empleó la dosis de 50 μg . Los niveles más altos de anticuerpos se encontraron en los animales inmunizados por vía IN con 50 μg de CTB-Fim2 (Figura 36 B), dando diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y los grupos rFim2 IN, rFim2 IP, CTB-Fim2 IP ($p < 0,001$) y CTB+rFim2 ($p < 0,05$). Estos resultados demuestran que la construcción CTB-Fim2 es un buen inmunógeno para inducir anticuerpos IgA y que además la ruta intranasal es más eficaz que la vía intraperitoneal en la generación de este tipo de respuesta humoral.

Todos estos resultados estarían acordes con los obtenidos con CTB-Fim2 en los ensayos de protección, lo cual sugeriría un posible rol protector de los anticuerpos locales específicos IgG e IgA.

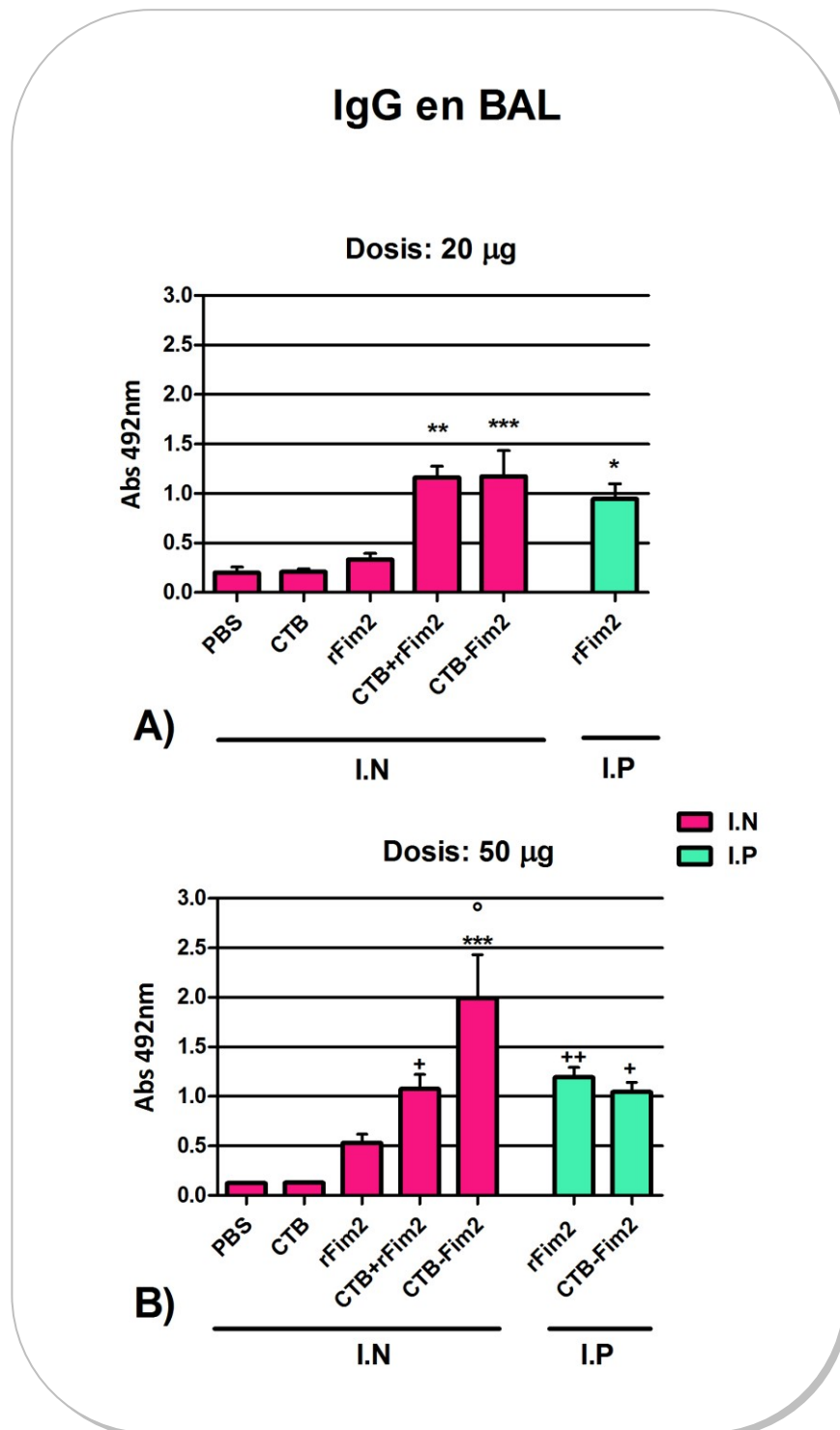
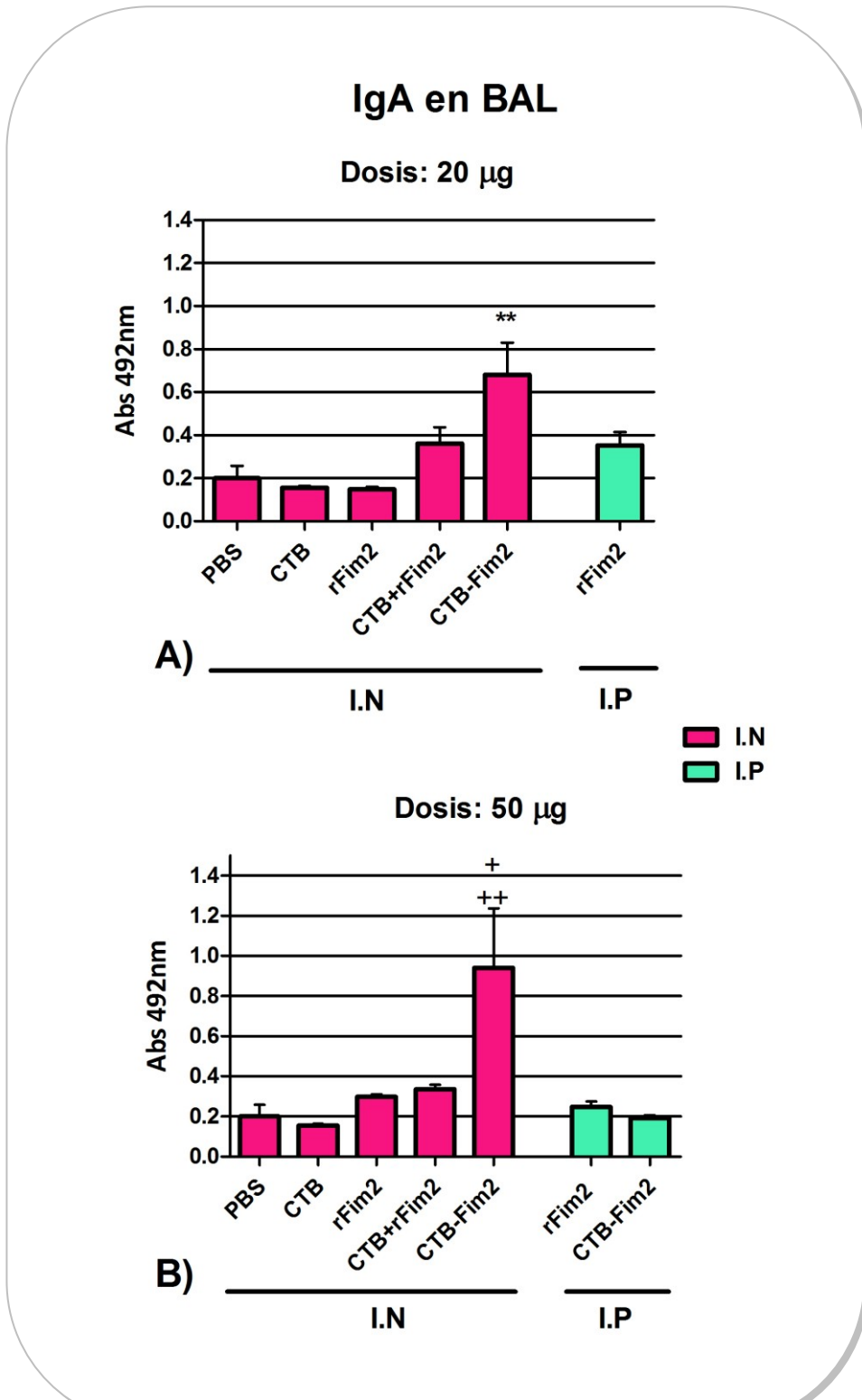
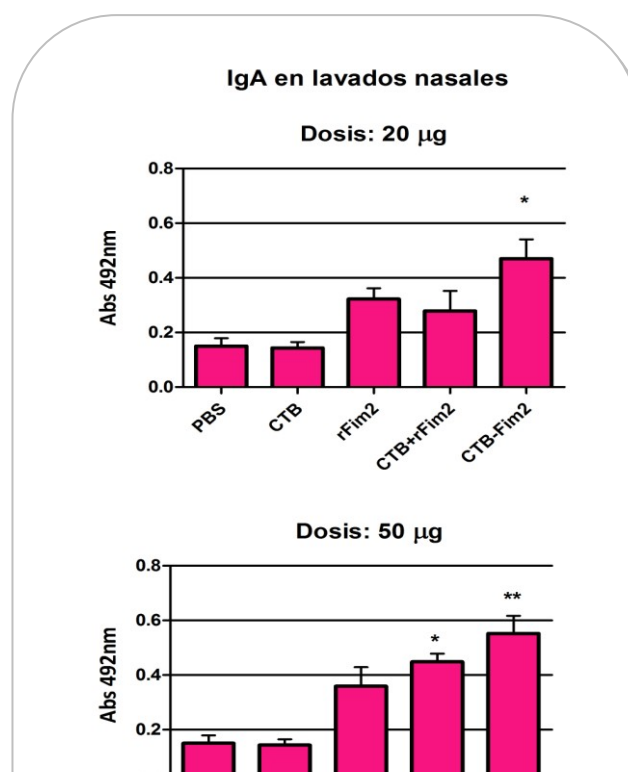


Figura 35. Evaluación de los niveles de IgG anti-Fim2 mediante ensayos de ELISA en lavados broncoalveolares de ratones inmunizados con CTB-Fim2. Las placas fueron cubiertas con una solución de rFim2 (5 µg/ml). Los resultados presentados se corresponden a los obtenidos en las muestras tomadas al día 44 post-inicio de tratamiento (día del sacrificio). Los mismos se presentan como medidas de abs a 492 nm. Las barras



II.C Determinación de anticuerpos IgA específicos en lavados nasales.

Evaluamos luego la respuesta humoral IgA contra Fim2 en el tracto respiratorio inducida por CTB-Fim2. Para ello evaluamos la presencia de esta inmunoglobulina en lavados nasales de ratones inmunizados con CTB-Fim2. En esta oportunidad las medidas se realizaron sobre muestras tomadas de los animales inmunizados por vía intranasal. Los resultados alcanzados se muestran en la **Figura 37**. Si bien para ambas dosis de CTB-Fim2 empleadas los niveles de IgA secretora fueron superiores a los obtenidos en los otros grupos, no se pudieron detectar diferencias significativas entre tratamientos aunque sí con los controles negativos. Al igual que los anticuerpos anti-Fim2 IgA presentes en los pulmones, estos anticuerpos secretados a la cavidad nasal podrían tener algún rol en la protección contra la infección con *Bordetella pertussis*.



II.D Análisis de isotipos de IgG en suero.

La evaluación de los perfiles de las subclases de IgG en suero luego de la vacunación y la infección natural brinda información sobre los mecanismos inmunológicos, aún no completamente comprendidos, que ofrecen protección contra la tos convulsa. En este punto es importante recordar que la producción de anticuerpos IgG2a está relacionada predominantemente con una respuesta inmune del tipo Th₁, mientras que una respuesta Th₂ está asociada a la producción de anticuerpos IgG1. En base a ello evaluamos los subtipos de IgG sérica, G1 y G2a específicos para Fim2 al día 36 post-inicio de tratamiento (**Figura 38**).

En acuerdo con los valores de IgG totales encontrados en suero (Figura 35), se detectaron niveles significativamente más altos de anticuerpos anti-Fim2 en los grupos de ratones inmunizados con CTB-Fim2 IN para la dosis de 20 µg (**Tabla XV**). Un comportamiento similar se detectó con la dosis de 50 µg, donde los niveles más altos de anticuerpos se

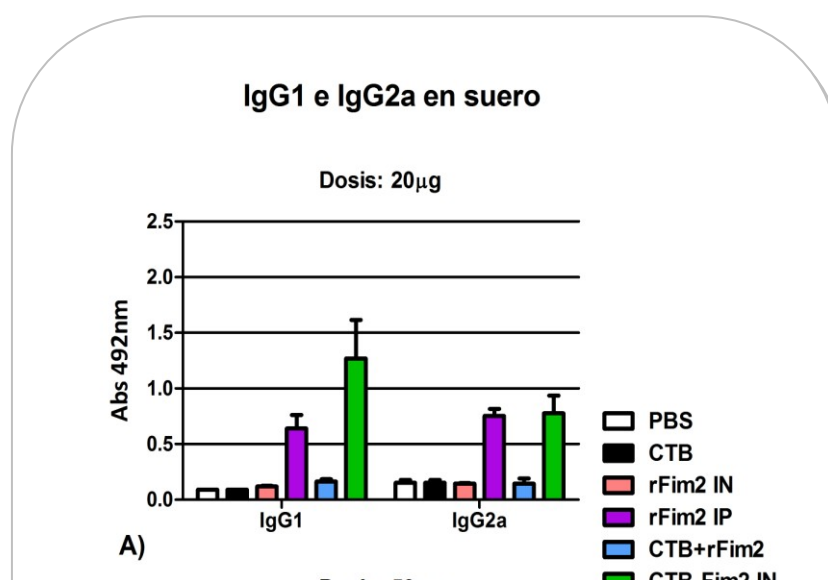


Figura 38. Determinación de isotipos de anticuerpos anti-Fim2 IgG1 e IgG2a.

Comparación de los niveles de anti-Fim2 IgG1 e IgG2a en suero inducidos por A) 20 µg y B) 50 µg de CTB-Fim2 administrada IN. En la figura se muestran los niveles de anticuerpos medidos al día 36. Los datos determinados por ELISA se expresan como la media de la absorbancia a

Tabla XIII. Análisis de doble varianza (ANOVA) para comparar isotipos de IgG en suero.

Dosis	Grupo		vs PBS y CTB	vs rFim2 IN	vs rFim2 IP	vs CTB+rFim2	vs CTB-Fim2 IN	vs CTB-Fim2 IP
20 µg	rFim2 IP	IgG1	*	ns	-	ns	-	-
		IgG2a	Ns	*	-	ns	ns	-
	CTB-Fim2	IgG1	**	***	*	***	-	-
		IgG2a	***	**	ns	*	-	-
50 µg	rFim2 IN	IgG1	Ns	-	-	ns	*	**
		IgG2a	**	-	ns	ns	**	**
	rFim2 IP	IgG1	***	***	-	***	-	-
		IgG2a	**	ns	-	*	*	-
	CTB-Fim2 IN	IgG1	*	*	ns	ns	-	ns
		IgG2a	***	**	*	***	-	ns
	CTB-Fim2 IP	IgG1	**	**	ns	**	ns	-
		IgG2a	***	**	*	***	ns	-

*p<0,05

**p< 0,001

***p<0,0001

ns: no significativo

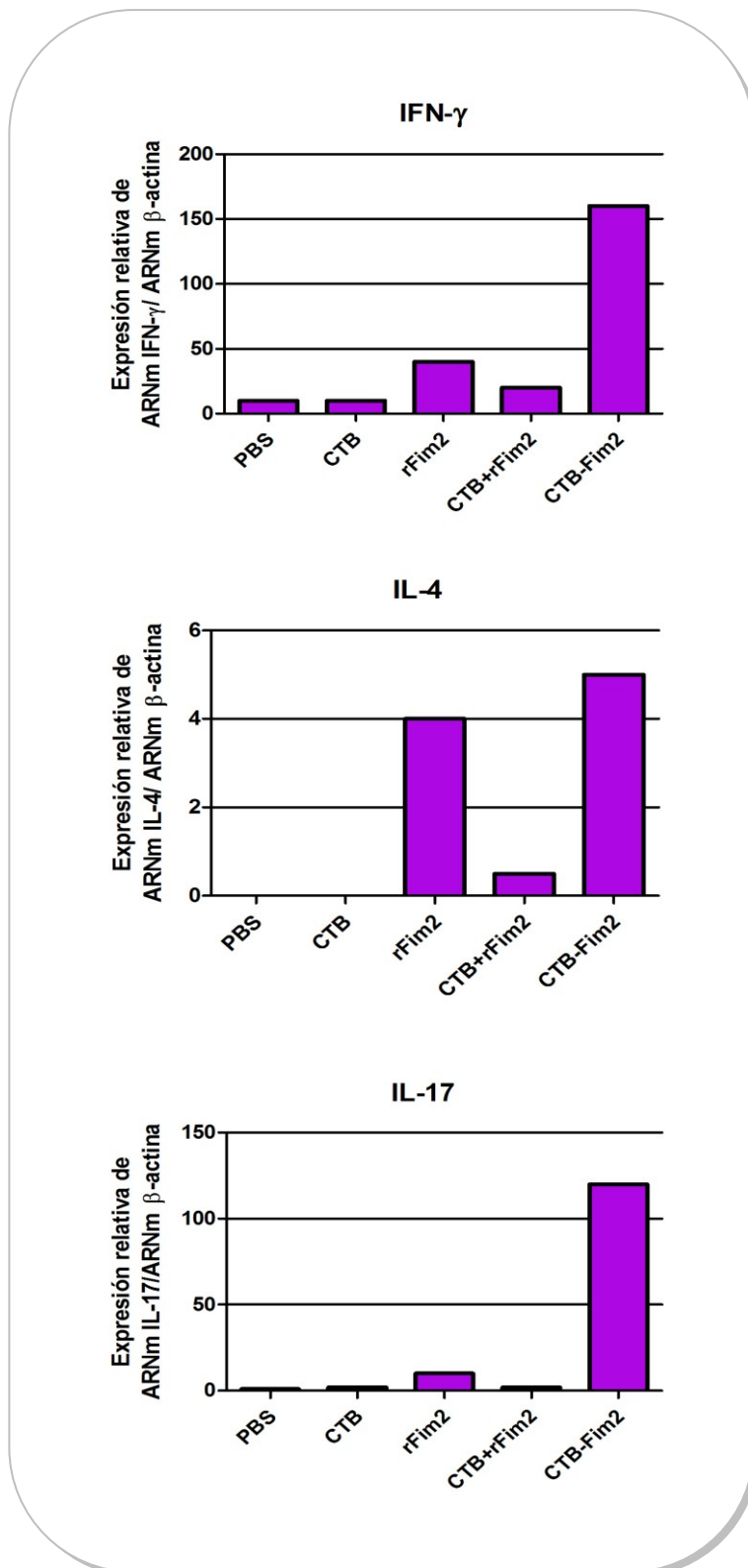
Luego del análisis de ANOVA se realizó el test de Bonferroni

encontraron nuevamente en los grupos inmunizados por vía IN con CTB-Fim2, y por vía IP con rFim2 y CTB-Fim2. Teniendo en cuenta que las diferencias entre los niveles de IgG1 e IgG2a detectados para el tratamiento CTB-Fim2 no fueron significativas podemos concluir que la respuesta provocada por esta proteína de fusión podría ser del tipo mixto Th1/Th2.

III. Análisis de la expresión de citoquinas en pulmón.

Existen varios reportes que muestran que la infección con *B. pertussis* tanto en humanos como en ratones induce una respuesta inmune de tipo Th1 (19, 167, 278). Estudios de inmunidad celular mostraron que las células Th1 secretoras de IFN- γ están asociadas con la recuperación de niños de la tos convulsa (167, 223). En ratones, el IFN- γ es requerido para controlar la infección por la bacteria en el tracto respiratorio (18, 164). En cuanto a la respuesta Th17, recientemente Ross y colaboradores demostraron que las vacunas aP que utilizan aluminio como adyuvante inducen respuestas Th2 y Th17, en donde la IL-17 cumplía un rol esencial en el control de la enfermedad, mientras que la IL-4 resultaría no sería primordial (222).

En este contexto decidimos evaluar el tipo de respuesta inmune inducida por nuestro candidato vacunal, CTB-Fim2. Para ello, mediante ensayos de qPCR evaluamos los niveles de los ARNm que codifican para las citoquinas IFN- γ (marcador de respuesta Th1), IL-4 (marcador de respuesta Th2), e IL-17 (marcador de respuesta Th17). Específicamente cuantificamos los niveles de citoquinas en los pulmones de los animales inmunizados con 20 μ g de inmunógeno por vía intranasal. Como se realizaron pooles de ARN por grupo, los valores obtenidos no presentan desvío estándar (**Figura 39**). Los resultados alcanzados muestran que el grupo de ratones inmunizados con rFim2 presentó bajos niveles de ARNm de IFN- γ e IL-17, pero niveles altos del de IL-4, indicando una respuesta inmune mayormente del tipo Th2 para este inmunógeno. El grupo de animales inmunizados con CTB+rFim2 expresó bajos niveles de todas las citoquinas. Por último, CTB-Fim2 indujo niveles altos de todas las citoquinas analizadas, indicando que la respuesta que induce es del tipo mixta Th, Th2, y Th17.



Aumento 150X.

Figura 39. Análisis de expresión de ARNm de citoquinas en pulmón por qPCR. Expresión relativa de ARN mensajero en pulmón de las citoquinas A) IFN- γ , B) IL-4 e C) IL-17. Se mezclaron los cortes de pulmón de todos los ratones de un mismo grupo en trizol y se extrajo el ARN total. Cada barra representa el valor medido para cada grupo de animales. Solo se analizaron los grupos de ratones inmunizados intranasalmente con 20 μ g de inmunógeno. Los resultados son representativos de dos experimentos distintos.

IV. Hallazgos histológicos.

Finalmente, realizamos un examen histológico de cortes de pulmones luego del sacrificio de los ratones tratados con CTB y CTB-Fim2 IN (ambas dosis). Los resultados alcanzados se muestran en la **Figura 40**. Como era de esperar en los animales no infectados se observó una histología normal en pulmón (datos no mostrados). En los animales infectados en cambio se detectaron distintos grados de inflamación en pulmón, la cual se ve representada por bronquiolitis, vasculitis, hipertrofia de las células de la mucosa bronquiolar, y alveolitis. La inflamación encontrada en los pulmones del grupo CTB fue leve (Figura 40 A), moderada en los animales inmunizados con 20 µg de rFim2 (Figura 40 B) y severa en los grupos inmunizados previamente por vía intranasal con 50 y 20 µg de CTB-Fim2 (Figuras 40 C y D, respectivamente), donde se observaron áreas extensas de los pulmones ocupadas por exudado celular y algún grado de consolidación. De esta manera, estos resultados muestran que en los tratamientos en donde se observaron niveles adecuados de protección la inflamación pulmonar fue mayor.

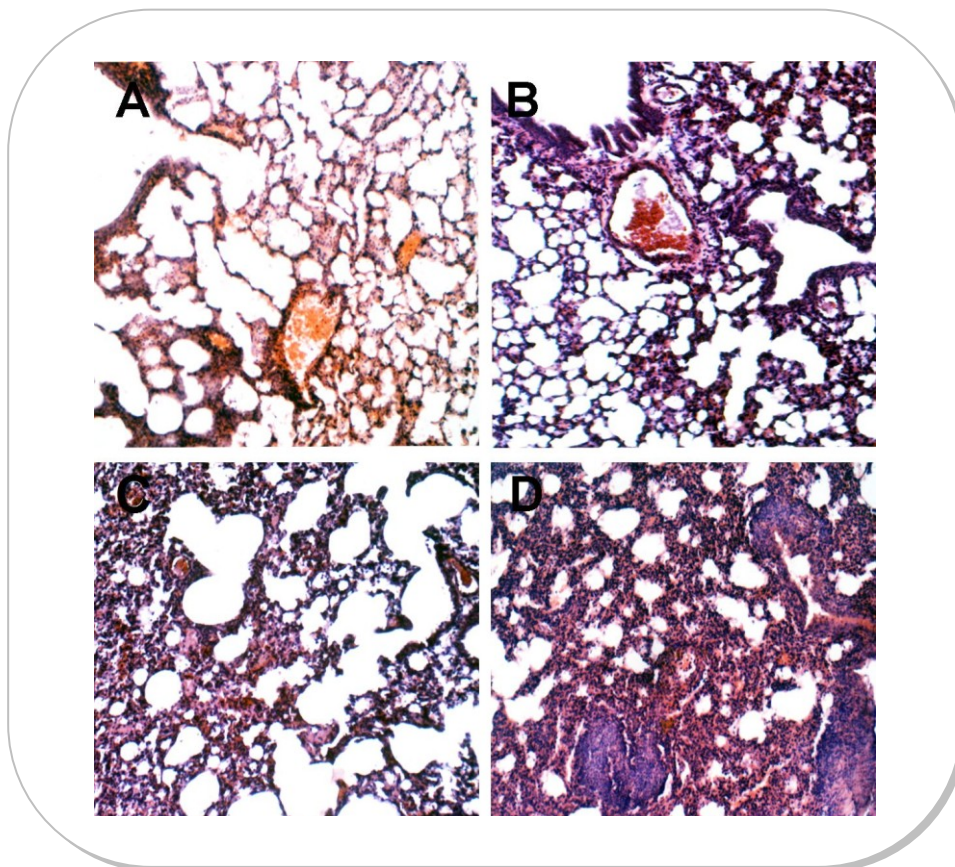


Figura 40. Secciones representativas de pulmones de ratones BALB/c luego del desafío con *B. pertussis*. A) Inflamación pulmonar leve en ratones inmunizados con CTB. B) Inflamación pulmonar moderada en ratones inmunizados IN con 20 µg de rFim2. C) Inflamación pulmonar severa en ratones inmunizados IN con 50 µg de CTB-Fim2. D) Inflamación pulmonar severa con exudados de células y neumonía en ratones inmunizados IN con 20 µg de CTB-Fim2. Solo se muestran imágenes representativas de dos experimentos. La tinción se realizó con hematoxilina-eosina.

3.3 Discusión

En este Capítulo presentamos los resultados obtenidos con la proteína de fusión construida a partir de las proteínas CTB y Fim2. La selección de Fim2 respondió al hecho de que se trata de un factor de virulencia de *B. pertussis* bien conocido por sus propiedades inmunogénicas y protectoras al ser administrado por vía sistémica (131, 217). Si bien en estudios previos se vio que la Fim2 purificada a partir de un cultivo de *B. pertussis* confiere protección contra la infección en el modelo murino al administrarla por vía intraperitoneal (131, 217), animales inmunizados por esta vía con Fim2 recombinante no fueron protegidos frente al desafío con la bacteria (270). Las bases moleculares de esta diferencia no han sido establecidas, pero podría deberse a diferencias en la estructura de las fimbrias obtenidas por distintos métodos. Por otro lado, la capacidad protectora de la rFim2 o BpFim2 administrada por vía intranasal no ha sido reportada previamente.

Teniendo en cuenta las propiedades de CTB y considerando la vía mucosal como la más próxima a la infección, trabajamos en la construcción y caracterización de una proteína de fusión CTB-Fim2 para ser administrada por vía intranasal, estrategia que resultó exitosa en generar una respuesta humoral más potente en ratones en el Capítulo anterior. Empleando técnicas de ingeniería genética sencillas logramos obtener exitosamente a CTB-Fim2 en una conformación pentamérica, la cual parece ser importante en relación a su capacidad adyuvante (197). El empleo de esta proteína en el modelo de protección en ratones nos permitió detectar una reducción significativa en el número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones inmunizados, reducción que se logró al emplear 20 o 50 µg de CTB-Fim2 ya sea administrada por vía mucosal como por vía sistémica. Esta reducción en el número de bacterias recuperadas fue significativa cuando se la comparó con aquellas obtenidas en los animales tratados con rFim2, CTB+rFim2, o los controles negativos PBS y CTB. La capacidad protectora de CTB-Fim2 podría deberse, al menos en parte, tanto al aumento de la captura del antígeno acoplado a través de la barrera de la mucosa (120), como a una entrega más eficiente del antígeno a las APCs (229). La inmunización intranasal con CTB-Fim2 resultó ser más efectiva que la intraperitoneal, lo cual era esperable por ser CTB adyuvante de mucosas. En las condiciones ensayadas y en acuerdo con otros autores (270), rFim2 no fue capaz de reducir la carga bacteriana en los pulmones al administrarla tanto por vía IP como IN en ambas dosis. Interesantemente, BpFim2 funcionó como inmunogeno protector cuando fue administrado por vía mucosal reforzando así la importancia en la protección no solo de este inmunógeno, sino de la vía mucosal. Esta es la primera vez en la

que se demuestra la capacidad protectora de la Fim2 administrada por vía intranasal, tanto recombinante (pero fusionada a CTB) como purificada a partir de *B. pertussis*.

La inmunización mucosal con 20 µg de rFim2 prácticamente no tuvo efecto en la generación de anti-Fim2 IgG en suero. Se necesitó aumentar la dosis a 50 µg para inducir una respuesta inmune. La inmunización sistémica con rFim2 también provocó el aumento en el título de anticuerpos. Esto era de esperarse ya que está reportado que la aplicación parenteral de antígenos de *B. pertussis* inducen niveles altos de IgG en suero (140). Más importante fueron los hallazgos sobre los niveles de anti-Fim2 IgG sérica inducidos por CTB-Fim2 IN que fueron similares a aquellos generados por rFim2 y CTB-Fim2 vía IP. Estos resultados indicarían que la administración mucosal del antígeno fusionado a CTB es igual de efectiva que la vía IP en generar una fuerte respuesta humoral IgG en suero. Como los grupos inmunizados con ambas dosis de rFim2 IP no fueron protegidos frente al desafío con el patógeno, podría decirse que los anticuerpos IgG anti-Fim2 en suero, si bien pueden llegar a contribuir a la protección, no son esenciales.

Por otra parte, un efecto similar se observó al medir anti-Fim2 IgG en los lavados bronqueoalveolares. Solo los grupos inmunizados vía IP o aquellos que utilizaron CTB como adyuvante indujeron una respuesta humoral IgG en los pulmones. En este último caso, al aumentar la dosis de CTB-Fim2 a 50 µg se observa un mayor aumento de niveles de anticuerpos IgG en pulmones, aun mayor que en el grupo CTB+rFim2. Esto indica que tanto CTB como la administración IN de la proteína son necesarios para inducir una fuerte respuesta humoral IgG en el pulmón. Nuevamente, estos anticuerpos no serían imprescindibles para la protección ya que el grupo de animales inmunizados con rFim2 IP generaron niveles similares de anti-Fim2 en comparación con los grupos CTB-Fim2 IN.

Al evaluar la presencia de anti-Fim2 IgA en BAL en los animales luego de su sacrificio, observamos que solo las muestras de los ratones inmunizados con CTB-Fim2 IN presentaban niveles altos de estos anticuerpos independientemente de la dosis empleada. Este resultado no se observó en ninguno de los otros tratamientos realizados, lo cual sugiere que la presencia de anti-Fim2 IgA en pulmón, más que los anticuerpos IgG en suero y BAL, tendría un rol en la protección generada por CTB-Fim2. De hecho, nuestros resultados muestran que la fusión de CTB a rFim2 así como también la inmunización IN fueron críticas para la inducción de IgA-S en BAL. Un resultado similar se observó en los lavados nasales. Si bien no se midieron anticuerpos específicos en los grupos inmunizados por vía sistémica, es sabido que estos anticuerpos son importantes para la protección frente a *B. pertussis* (110, 116). Todos estos resultados son consistentes con trabajos publicados anteriormente que muestran que la administración de inmunógenos por vía parenteral es menos efectiva que la ruta mucosal en

inducir una respuesta inmune en la mucosa (122) y que esta respuesta puede ser importante para la protección. Por ejemplo, se ha observado que la inmunización intranasal y transcutánea con un antígeno de *Chlamydia muridarum* indujeron altos niveles de IgG específica en suero y BAL, pero solo la inmunización IN generó IgA específica en BAL utilizando CTB como adyuvante (237). Parecería que CTB induce a las células B a aumentar la producción de IgA-S (226) y al cambio de isotipo a IgA a través de TGF- β 1(138).

En relación al tipo de respuesta inmune inducida por CTB-Fim2, pudimos observar que cuando la proteína es administrada por vía mucosal se registra un aumento comparable en las cantidades de IgG1 e IgG2a, lo cual sugiere un aumento de la respuesta T-*helper* hacia un perfil mixto Th1/Th2. La información disponible acerca de la distribución de las subclases de IgG contra las vacunas contra pertussis muestra que la subclase predominante luego de la vacunación y la infección natural es IgG1, aunque también encontraron niveles relativamente altos de IgG2 (111, 276). Pareciera entonces que en este ensayo, CTB fusionada a Fim2 induce el aumento de IgG2a en suero luego de la vacunación, dando como resultado niveles similares de IgG1 e IgG2a. Esta observación es consistente con otras en donde se vio que la utilización de CTB como adyuvante genera este tipo de respuestas mixtas (79, 126). En cambio, los inmunógenos rFim2 IN e IP generaron niveles levemente más altos de IgG1, orientando la respuesta a una respuesta Th2.

Este hecho fue corroborado al medir la expresión de citoquinas en pulmón, donde se vio que los ratones inmunizados con 20 μ g de rFim2 IN generaron niveles altos de los ARNm de IL-4 pero bajos de IFN- γ e IL-17. Interesantemente, los ratones inmunizados con 20 μ g de CTB-Fim2 expresaron niveles altos de los ARNm correspondientes a las citoquinas IFN- γ , IL-4 e IL-17 en comparación a los hallados en el resto de los tratamientos estudiados. Esto indicaría una respuesta mixta Th1, Th2 y Th17. Este hecho es beneficioso ya que para la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio se necesita tanto de una respuesta celular como humoral (116). El IFN- γ se requiere para el control de la infección por *B. pertussis* en el tracto respiratorio, ya que ratones que carecen de esta citoquina o su receptor desarrollan una infección diseminada y letal (18, 164). La IL-4 se secreta como producto de una respuesta Th2. Las células Th2 ayudan a las células B a secretar anticuerpos IgE, IgG1 e IgG3, los cuales neutralizan toxinas y previenen la adherencia de la bacteria al tracto respiratorio (116). Por otra parte, estudios recientes en humanos sugieren que las células Th17 son producidas en respuesta a la infección con *B. pertussis* (70) y estudios en ratones mostraron que el posible rol de IL-17 en la inmunidad protectora frente a *B. pertussis* es favorecer la destrucción bacteriana por macrófagos. Esta respuesta es dependiente de la señalización por el TLR4 e IL-1 (115). Las células Th17 son consideradas importantes para la respuesta inmune del huésped contra

patógenos extracelulares en las vías respiratorias (16, 161), pero también están asociadas con inflamación crónica y autoinmunidad. La producción de células Th17 por parte de las vacunas aP requiere de la activación de la señalización de IL-1R en las células del sistema inmune innato y la protección fue asociada con el reclutamiento de células a los pulmones luego del desafío con *B. pertussis* y con la activación de la eliminación de la bacteria por parte de neutrófilos y macrófagos (222). La IL-17 induce la producción de citoquinas y contribuye al reclutamiento de neutrófilos y a la activación de células del sistema inmune innato (148, 273).

Entonces, las respuestas Th1/Th17 generadas por CTB-Fim2 administrada intranasalmente podrían ser las responsables de la protección conferida por este inmunógeno.

Finalmente, el hecho de que se observó más lesión pulmonar en los animales más protegidos podría explicar que precisamente la respuesta inmune generada por aquellos inmunógenos que ofrecieron mayores niveles de protección es la responsable tanto de la reducción de la carga bacteriana, así como del mayor grado de inflamación presente en los pulmones. Esta observación se ha encontrado en otro estudio (251).

En conclusión, los resultados presentados aquí demuestran que CTB es un potente adyuvante de la mucosa que convierte a rFim2 en un inmunógeno protector, estimulando tanto la respuesta sistémica como mucosal.

**CAPÍTULO
IV**

CONCLUSIONES

4.1 Conclusiones

Pertussis es una enfermedad infecciosa aguda de las vías respiratorias causada principalmente por *Bordetella pertussis*. Si bien la morbilidad y mortalidad debida a esta enfermedad han disminuido significativamente a partir del uso masivo de vacunas desde 1940, esta enfermedad no solo no se ha podido erradicar, sino que en la actualidad es considerada reemergente (185). Para su prevención, en un comienzo se utilizaron vacunas celulares que a pesar de ser efectivas, fueron cuestionadas en términos de bioseguridad. Los reportes sobre reacciones adversas asociadas a la vacunación con la vacuna celular focalizaron las investigaciones hacia el diseño y desarrollo de nuevas formulaciones que a diferencia de las anteriores estarían formadas por componentes bacterianos purificados y no por la bacteria entera. La situación de resurgencia de la enfermedad valorizó a las vacunas acelulares ya que son las únicas recomendadas para ser aplicadas en adolescentes y adultos por su baja toxicidad luego de varias aplicaciones (169).

Si bien las vacunas acelulares se utilizan mundialmente y son consideradas efectivas, la inmunidad conferida por éstas parecería no ser tan duradera comparada con la inducida por la infección natural o por las vacunas celulares (235).

Aunque se cuente con estas valiosas herramientas de prevención, todavía se registran muchos casos de enfermedad: por año se estima que ocurren 16 millones de casos en todo el mundo de los cuales 195.000 resultan ser fatales. En Argentina y en otros países, la enfermedad ha evolucionado en forma de brotes epidémicos cada 3-5 años y se ha registrado un aumento significativo de casos de pertussis en niños, adolescentes y adultos (124). Varias son las causas que se adjudican a la resurgencia, la mayoría de ellas están asociadas a deficiencias en las vacunas, así como también a la existencia de polimorfismos en cepas de *B. pertussis*, generando la evasión de la respuesta inmune inducida por la vacunación (185).

Para afrontar el problema de la resurgencia de la enfermedad, una de las estrategias mundialmente aceptada consistió en mejorar las coberturas vacunales y en incorporar más dosis de refuerzo. La incorporación de estos refuerzos responde al objetivo de disminuir no solo carga de la enfermedad sino también las principales fuentes de infección para los más vulnerables, los lactantes menores de 6 meses. Esta estrategia representa un desafío que debe superar problemas económicos y de logística. Este contexto sin dudas ha profundizado la necesidad de desarrollar nuevas vacunas acelulares, menos reactogénicas que confieran inmunidad por más largo plazo y contra los distintos genotipos bacterianos que circulan en la actualidad en la población, de forma de evitar la inclusión de refuerzos.

Teniendo en cuenta este marco, y considerando que luego de la infección con *B. pertussis* el individuo infectado adquiere inmunidad protectora por más largo plazo, este trabajo de tesis contempló la búsqueda de nuevas formulaciones vacunales de aplicación mucosal mediante la inmunización intranasal y el empleo de un adyuvante de mucosas para mejorar las estrategias vacunales anti-pertussis. Todas las vacunas actuales de pertussis se administran por vía parenteral. En este sentido, se escogió la vía intranasal como ruta de inmunización, ya que es la vía de infección de *B. pertussis* y de esta manera permitiría direccionar los mecanismos efectores de la respuesta inmune del huésped al sitio de ingreso del microorganismo. Existe una vasta literatura que demuestra que la inmunización intranasal no solo induce la formación de anticuerpos en las superficies superiores e inferiores de las vías respiratorias (121, 196, 248), sino que también genera una inmunidad sistémica que resulta fundamental en el control de las infecciones invasivas. La vacunación por vía intranasal resulta también atractiva por ser indolora, más económica y de fácil aplicación al no utilizar jeringas (137).

Existen varios desarrollos de vacunas mucosales contra diferentes patógenos, en donde varias de ellas cuentan con resultados promisorios en animales y en ensayos clínicos (196). Además, existen dos vacunas nasales aprobadas, ambas contra influenza (FluMist trivalente y tetravalente), las cuales mostraron una fuerte inmunogenicidad y protección (www.fda.gov).

En lo que respecta a pertussis, la vía mucosal se ha ensayado con vacunas atenuadas que arrojaron resultados prometedores ya que inducen respuestas Th1 más duraderas, imitando la infección natural (162). En algunos casos la protección observada con estas cepas en ratones luego de una sola dosis intranasal fue mayor que para la vacuna aP (177). La vía mucosal también se ha empleado con formulaciones basadas en proteínas recombinantes fusionadas a la toxina colérica empleada como adyuvante: se han probado como candidatos a la PTx fusionada a las subunidades A2 y B de la CT, y al fragmento N-terminal de la FHA co-administrado con CT o CTB. En ambos casos los candidatos vacunales protegieron frente a una infección con *B. pertussis* y generaron una respuesta inmune humoral sistémica y de mucosas (4, 156).

Teniendo en cuenta estos resultados alentadores, y considerando que un inmunógeno por sí solo difícilmente genere protección a través de la inmunización por vía mucosal, decidimos emplear la estrategia de proteínas recombinantes fusionadas genéticamente a la subunidad B de la toxina colérica, por ser éste un demostrado y potente adyuvante principalmente de mucosas, pero también de la vía sistémica (229). Además, se ha utilizado exitosamente en la vacuna humana contra el cólera (197).

Para la selección de los candidatos vacunales, buscamos aquellos que podrían hacer frente, al menos en parte, a dos de las causas que han llevado a la resurgencia de la enfermedad: el

polimorfismo observado en cepas circulantes del *B. pertussis*, y calidad y duración de la inmunidad de las actuales vacunas acelulares. Teniendo en cuenta que un único candidato probablemente no pueda suplir los dos requisitos, seleccionamos por un lado proteínas propias de la población bacteriana circulante, y por el otro a una proteína conservada pero con demostrada capacidad protectora. En particular elegimos a las proteínas Bsp22 (componente del SSTT) y LpdA (dihidrolipoamida deshidrogenasa) propias de la población bacteriana circulante y a la fimbria serotipo 2 (Fim2). El hecho de que Bsp22 y LpdA resultaron ser inmunogénicas en otros patógenos contribuyó a la selección de las mismas (125, 174). Por su parte, Fim2 fue seleccionada ya que es uno de los inmunógenos incluidos en algunas de las formulaciones acelulares de aplicación parenteral.

La primera etapa del trabajo consistió en la construcción genética de las proteínas fusionadas a CTB, ya que existe evidencia que así es como ejercería un efecto adyuvante más eficaz (197). El clonado en el vector pAE-ctxB de las 3 secuencias que codifican para los inmunógenos seleccionados resultó ser exitoso. Más aún, pudimos establecer condiciones experimentales en las cuales *E. coli* las expresa con adecuados rendimientos como para realizar los experimentos *in vitro* e *in vivo* propuestos. A partir de las construcciones obtenidas, logramos purificar las tres proteínas recombinantes en su conformación pentamérica luego de la realización de la técnica de replegado por dilución y por diálisis. Estos resultados posicionan al vector pAE-ctxB y la expresión de proteínas recombinantes en un sistema procariota como herramientas útiles y económicas a la hora de la búsqueda y producción de proteínas recombinantes como candidatos vacunales a escala de laboratorio.

Como nuestro objetivo primordial fue evaluar la capacidad protectora de cada uno de los candidatos vacunales seleccionados, realizamos experimentos *in vivo* empleando el modelo de desafío intranasal en ratones. De todos los candidatos y condiciones ensayadas, pudimos detectar que solo la proteína recombinante Fim2 fusionada a CTB es capaz de proteger frente a la infección con *B. pertussis* cuando es administrada por vía mucosal. Estos resultados fueron llamativos ya que en trabajos anteriores se había demostrado que la proteína recombinante Fim2 utilizada en dosis similares pero administrada por vía sistémica no presentó capacidad protectora en este modelo (270). Más interesante aún fue que la proteína recombinante fusionada a CTB también se comportó como protectora cuando fue administrada sistémicamente. Estos resultados muestran por primera vez que la Fim2 recombinante administrada por vía intranasal o sistémica protege frente a una infección subletal con *B. pertussis* en dosis de 20 y 50 µg, utilizando CTB como adyuvante. La vía intranasal también resultó ser adecuada para la Fim2 purificada a partir de *B. pertussis* ya que en nuestros ensayos fue capaz de generar niveles de protección adecuados contra la infección por la

bacteria. Hasta aquí comprobamos cómo el cambio en la elección de la ruta de inmunización y del adyuvante utilizado pueden lograr que un inmunógeno recombinante que de por sí no es protector, lo sea.

Al utilizar la vía intranasal de inmunización con las proteínas fusionadas CTB-rBsp22 y CTB-rLpdA, no obtuvimos resultados satisfactorios para la protección. Esto quizás sea consecuencia del bajo poder inmunogénico de las mismas o simplemente las condiciones ensayadas no fueron las adecuadas. De hecho la proteína recombinante rBsp22 mostró una tendencia de reducción en el recuento de colonias en placa, lo cual alienta a seguir estudiando este inmunógeno administrado por vía mucosal.

Respecto de la respuesta humoral sistémica inducida por los candidatos vacunales estudiados, los ensayos de ELISA realizados mostraron que la fusión genética del inmunógeno a CTB aumenta los niveles séricos de anticuerpos específicos IgG. Más aún, si bien es sabido que la administración intranasal de un inmunógeno por sí solo por lo general no resulta efectiva en la inducción de una fuerte respuesta humoral sistémica (8), la administración intranasal del candidato vacunal fusionado a CTB fue igual de efectiva que la vía intraperitoneal en la generación de anticuerpos IgG específicos en suero.

A nivel de mucosas y específicamente en los lavados nasales, pudimos detectar que los niveles de anticuerpos específicos IgA fueron mayores en los animales que habían sido tratados con los candidatos vacunales fusionados a CTB.

Para CTB-Fim2 administrada por vía intranasal también pudimos detectar en los lavados bronquealveolares de los animales una respuesta IgG e IgA en la mucosa mayor respecto los demás grupos. Todos estos datos sugieren que anticuerpos locales IgA en el tracto respiratorio, así como también los anticuerpos IgG e IgA en pulmón, posiblemente jueguen un rol en la protección inducida por CTB-Fim2. De todas maneras, hay que tener en cuenta que la producción de anticuerpos no es indispensable para inducir una respuesta protectora efectiva (116).

En lo que respecta a IgG, la distribución de isotipos de IgG en BAL se asemeja a la distribución que hay en suero. Esto ha llevado a la hipótesis de que en las vías aéreas distales se deriva gran parte de la IgG sistémica que llega a los alveolos por difusión pasiva (248). IgG exhibe su función inmunológica a través de una serie de mecanismos, de los cuales el más importante es la opsonización de patógenos al unirse a los receptores Fc y de las células mieloides, como los macrófagos alveolares y neutrófilos. La activación de los receptores FcγRI y FcγRIII también aumenta la habilidad de los fagocitos de aniquilar los patógenos en fagolisosomas (22). Particularmente en pertussis, se ha descrito que anticuerpos IgG opsonizan a la bacteria induciendo la formación de fagolisosomas en neutrófilos y favoreciendo su aniquilación en un

proceso dependiente de la activación de FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIb (219). A diferencia de lo que ocurre con IgG, la composición de IgA en la mucosa no se correlaciona con la IgA sérica (23). Esto explicaría por qué en los ensayos con CTB-LpdA y CTB-Fim2 no medimos niveles de IgA detectables en suero pero sí en lavados nasales y pulmón. Por otro lado, IgA-S se encuentra en conformación dimérica, ensamblada a un fragmento del receptor polimérico de inmunoglobulina, mientras que la IgA sérica es monomérica. IgA-S difiere también en sus funciones inmunológicas respecto a las IgA e IgG monomérica. Mientras que la IgA monomérica tiene las mismas habilidades que la IgG de activar fagocitos y la cascada del complemento, la IgA-S posee funciones no inflamatorias al unirse e inmovilizar patógenos o neutralizar toxinas bacterianas, pero no activa al complemento. Esto previene la adherencia de patógenos al epitelio y la promoción de una respuesta innata por las células epiteliales, que como mencionamos en el Capítulo I, también ayuda a la respuesta inmune del huésped frente a *B. pertussis* (36).

En este trabajo vimos que se requiere tanto de la inmunización intranasal como de la fusión genética de CTB al antígeno para inducir una fuerte respuesta inmune mucosal, la cual pudo haber tenido un papel importante en la protección inducida por CTB-Fim2, a través de los mecanismos explicados anteriormente.

El hecho de que CTB-Fim2 administrada por vía intraperitoneal haya generado protección sin haber inducido niveles apreciables de IgG e IgA en BAL seguramente se deba a que como mencionamos en el Capítulo I, la respuesta humoral por sí sola no es suficiente para generar una protección efectiva. En este caso entonces, CTB gatilla otro tipo de respuesta implicada en la protección inducida por ese inmunógeno, como se describe a continuación.

La distribución de isotipos de IgG en suero luego de la vacunación da una idea del tipo de respuesta inmune generada por una vacuna. Al querer estudiar la calidad de respuesta inmune inducida por nuestro candidato vacunal, medimos los anticuerpos anti-Fim2 IgG1 e IgG2a en suero y encontramos que no solo el grupo de animales inmunizados intranasalmente con CTB-Fim2 fueron los que indujeron mayores niveles de anticuerpos, sino que los niveles de IgG1 eran similares a los niveles de IgG2a, indicando una respuesta mixta Th1/Th2. La información previa sobre la distribución de las subclases de IgG contra antígenos de pertussis es escasa. Tres estudios previos investigaron la distribución de isotipos de IgG luego de la infección y vacunación con pertussis (86, 111, 276). En el más reciente se concluyó que la vacuna de pertussis utilizada para la primera inmunización es determinante en la distribución de las subclases de IgG previo a la infección o a una nueva inmunización (111). Tanto en niños sanos vacunados con aP, como en niños infectados, IgG1 fue el isotipo de IgG predominante mientras que los anticuerpos IgG2 e IgG3 contribuyeron escasamente a la respuesta. Además

encontraron niveles altos de IgG₄ luego de 5 inmunizaciones con aP, lo cual se correlaciona con un aumento de respuestas IgE específicas, que lleva a la polarización de células T a células Th₂. Estos resultados avalan el conocimiento existente en donde la respuesta frente a antígenos de pertussis, como ocurre en las vacunas aP, es de tipo Th₂. Debido a que las vacunas wP contienen menor concentración de antígenos purificados y mayores cantidades de componentes como el LPS, inducen una respuesta inmune predominantemente del tipo Th₁. En esta tesis vimos que la fusión genética de CTB a la Fim₂ indujo la producción tanto de anticuerpos IgG₁ como IgG_{2a}, generando tanto una respuesta mixta Th₂ y Th₁. Para corroborar que CTB-Fim₂ genera esta respuesta mixta se midieron los niveles relativos de los ARNm que codifican para las citoquinas IFN- γ , IL-4 e IL-17. Los resultados alcanzados mostraron que solo el grupo inmunizado intranasalmente con CTB-Fim₂ fue capaz de generar los niveles más altos de ARNm de todas las citoquinas evaluadas. Esto confirmaría no solo que la respuesta inducida por CTB-Fim₂ es mixta celular/humoral (Th₁/Th₂), sino que además provoca una respuesta de tipo Th₁₇. En el Capítulo I de este trabajo de tesis hemos desarrollado con mayor profundidad el aspecto de la duración de la inmunidad conferida por vacunas y en particular la pérdida más rápida de la inmunidad adquirida luego de la vacunación con las vacunas acelulares. Esta pérdida de inmunidad conferida por las vacunas aP puede ser el reflejo del adyuvante utilizado: actualmente, las vacunas se administran con aluminio como adyuvante. Si bien el aluminio ha probado ser seguro para su utilización en humanos, favorece la inducción de células Th₂ y la producción de anticuerpos. Ya hemos mencionado que las vacunas wP o la infección natural, las cuales generan altos niveles de protección, promueven respuestas Th₁ y Th₁₇, mientras que las vacunas aP inducen respuestas Th₂ y Th₁₇ en ratones (116). Por lo tanto, la falla de las vacunas aP que utilizan hidróxido de aluminio como adyuvante en inducir respuestas Th₁ (y por ende la secreción de IFN- γ), puede ser una explicación para el aumento de la incidencia de pertussis en las poblaciones que utilizan vacunas aP. Esto concuerda con nuestros resultados en donde rFim₂ administrada por vía intraperitoneal junto con aluminio como adyuvante, o por vía intranasal no haya resultado protectora. De hecho, rFim₂ indujo niveles más altos de anticuerpos IgG₁ que de IgG_{2a}, marcando la polarización de la respuesta hacia el tipo Th₂. En el caso de la rFim₂ entregada por ruta mucosal, esto se comprobó por la expresión de IL-4 en pulmón. Según vimos en el Capítulo III, la utilización en este trabajo de CTB como adyuvante alternativo y el hecho de que CTB-Fim₂ genere no solo respuestas Th₂ y Th₁₇ sino también una respuesta Th₁, pudo haber sido la causa de la generación de una respuesta protectora contra la infección por *B. pertussis* en comparación con la administración de rFim₂ IP con aluminio. En un estudio previo también se ha logrado balancear los niveles de IgG₁ e IgG_{2a}

como consecuencia de la utilización de adyuvantes alternativos (g₁), mientras que en otro trabajo, la capacidad protectora de una vacuna aP comercial se vio aumentada al cambiar el aluminio por CpG como adyuvante (222)(inductor de respuesta Th₁).

Mediante un estudio histopatológico en pulmón de los grupos inmunizados con CTB y CTB-Fim2 en ambas dosis para evaluar el daño tisular, vimos que los ratones inmunizados con CTB-Fim2 fueron los que presentaron mayor daño histológico, indicando una correlación directa entre protección e inflamación pulmonar. En un estudio previo se evaluó la patología pulmonar en ratones infectados con *B. pertussis* luego de la vacunación, y se vio que el daño tisular aumentaba con la vacunación. Más aún, los parámetros de hipersensibilidad inmediata como por ejemplo, niveles de IgE e infiltración de eosinófilos, aumentaban conforme el nivel de protección (251). Por lo tanto, un mayor daño histopatológico sería una consecuencia de una respuesta inmune más potente generada por el inmunógeno.

Podemos concluir que la inmunización intranasal resultó una ruta efectiva en la entrega de antígenos al sistema inmune, y la selección de CTB como adyuvante fue exitosa en generar una respuesta inmune humoral sistémica y mucosal, pero también una respuesta celular Th₁, Th₂ y Th₁₇. La respuesta humoral indujo niveles de IgG e IgA en pulmón, así como también anticuerpos IgA en el tracto respiratorio, los cuales contribuyeron a la generación de una respuesta inmune protectora. La respuesta celular indujo la producción de células Th₁ y Th₁₇, con la consecuente producción de IFN- γ e IL-17, citoquinas fundamentales para la eliminación eficiente de *B. pertussis*. Estos resultados fueron evidenciados en la histología del pulmón donde una mayor patología pulmonar presente en los animales protegidos, podrían indicar una respuesta inmune más potente inducida por el candidato vacunal.

En suma, en este trabajo de tesis doctoral demostramos la factibilidad de obtener proteínas recombinantes de *B. pertussis* fusionadas a CTB para ser administradas por vía intranasal. Si bien CTB-Bsp22 y CTB-LpdA no resultaron protectoras frente a un desafío con la bacteria, CTB actuó como adyuvante sistémico y de mucosas mejorando la respuesta inmune humoral de los antígenos en suero y en lavados nasales. La proteína CTB-Fim2 fue capaz de inducir una respuesta protectora contra *B. pertussis* al generar no solo respuestas Th₂ y Th₁₇, sino también Th₁, necesaria para una eliminación efectiva de la bacteria en el tracto respiratorio. Concluimos que esta respuesta Th₁ es una consecuencia directa de la utilización de CTB como adyuvante. Todos estos resultados muestran a CTB-Fim2 un antígeno promisorio a ser incluido en futuras formulaciones vacunales.

**CAPÍTULO
V**

***MATERIALES Y
MÉTODOS***

5.1 Cepas bacterianas utilizadas

5.1.1 Cepas de *Bordetella pertussis*

Para los ensayos de protección realizados en animales se utilizaron la cepa vacunal Tohama I y el aislamiento clínico BP106 conteniendo plásmidos que confieren a cada una de ellas una resistencia a antibiótico: gentamicina (Gm) y kanamicina (Km), respectivamente. Para la obtención de estas cepas recombinantes se emplearon los vectores replicativos y estables en *Bordetella*: pBBR1MCSGm y pBBR1MCS Km (146). Estos vectores fueron cedidos gentilmente por Kovach.

La cepa virulenta BP106 corresponde a un aspirado nasofaríngeo obtenido de un paciente menor de 6 meses hospitalizado por pertussis en el Hospital de Niños de La Plata.

La cepa Bp Tohama I ha sido aislada en Japón de un paciente infectado y su genoma ha sido completamente secuenciado (200). Esta cepa se utiliza para la producción de vacunas acelulares.

5.1.2 Cepas de *Escherichia coli*

Para la selección de clones positivos provenientes del clonado de productos de PCR en pGEM-T y de los ORFs de interés en el vector de expresión pAE-CTB se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α (Invitrogen), genótipo: [*F*- *f80lacZDM15 D(lacZYAargF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk -, mk +) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ*].

Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (SI) (Life Technologies), genótipo: [*F*- *ompT hsdSB (rB -mB -) gal dcm endA1 proUp::T7RNAP::malQ-LacZ, tets*]. Esta cepa tiene el gen que codifica para la T7 RNA polimerasa integrado en el cromosoma de la bacteria, el cual está bajo el control del promotor inducible osmóticamente proU. De esta forma, la expresión de la proteína recombinante ocurre luego de la adición de NaCl al medio de cultivo.

5.2 Medios de cultivo utilizados

❖ Luria-Bertani (LB)

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Cloruro de sodio	10 g/L

❖ **LB sin sal (LBss)**

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L

❖ **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
KH ₂ PO ₄	0.50 g/L
KCl	0.20 g/L
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0.10 g/L
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	0.02 g/L
Tris HCl	1.52 g/L

Se lleva a 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.

❖ **Complemento (20 mL 10X)**

L- Cisteína	800 mg
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	200 mg
Ácido ascórbico	400 mg
Ácido nicotínico	80 mg
HCl _(c)	2 mL

Los stocks bacterianos de *B. pertussis* se conservaron como una suspensión en el medio sintético de SS a -20 °C en presencia de glicerol 50 % v/v. A partir de estos stocks las cepas/aislamientos de *B. pertussis* utilizados se cultivaron a 37 °C durante 72 h en placas de Petri conteniendo el medio Bordet Gengou suplementado con sangre desfibrinada de carnero

al 10% v/v (BGAS). Transcurridas las 72 horas del primer cultivo se efectuó un subcultivo en el mismo medio durante 24 horas.

Para cultivar las cepas recombinantes se adicionaron a las placas de BGAS los antibióticos correspondientes en las siguientes concentraciones finales: gentamicina 10 µg/mL y kanamicina 25 µg/mL.

5.3 Vectores utilizados

El vector de expresión utilizado en este trabajo fue el pAEctxB (3.1 kb) (**Figura 41**). En la generación de dicho vector, el gen que codifica la proteína CTB, *ctxB*, fue modificado para asegurar que los codones empleados fuesen compatibles con los utilizados con mayor frecuencia por *E. coli*, *L. casei* y *S. typhimurium* (11). El ORF manipulado genéticamente, fue luego clonado en el vector de expresión pAE (214) e incluye dos sitios consecutivos *Mlu*I y *Hind*III. El vector resultante permite expresar bajo el control de un promotor T7 proteínas fusionadas al C-terminal de CTB. A su vez, las proteínas expresadas tienen 6 residuos de histidinas en el extremo N-terminal, lo que facilita su purificación por cromatografía de afinidad por ión metálico inmovilizado (IMAC, por las siglas en inglés). Este trabajo se hizo en el marco de una colaboración con el Dr. Paulo Lee Ho, del Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto Butantan, San Pablo, Brasil.

El plásmido pGEM-T (Promega) (3 kb) fue utilizado para el subclonado de productos de PCR.

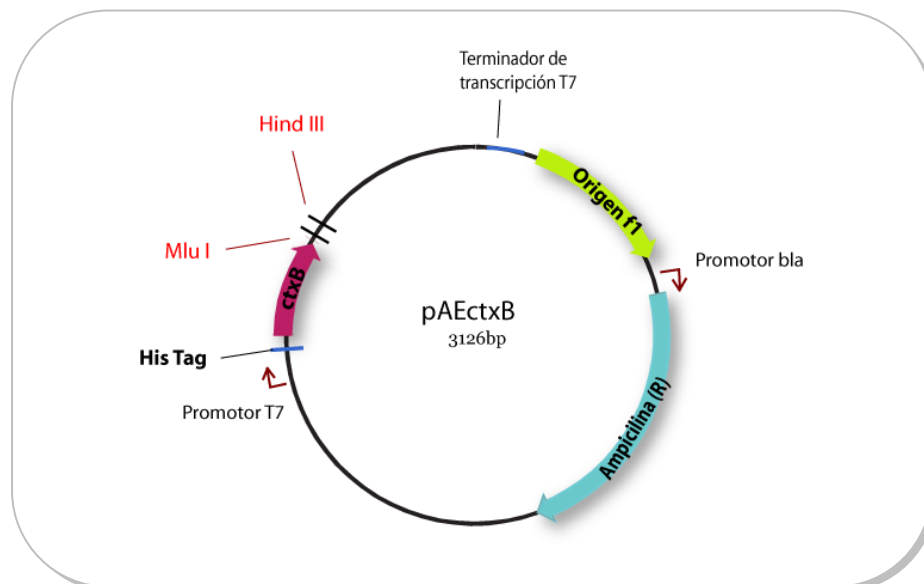


Figura 39. Estructura del plásmido de expresión pAEctxB. Se indican los promotores T7 y bla que permiten la expresión de las proteínas heterólogas fusionada a CTB y de la β-lactamasa (resistencia al antibiótico ampicilina), respectivamente. Además, se indican los sitios de clonado *Mlu*I y *Hind*III empleados para clonar los distintos ORF de *Bordetella pertussis*.

5.4 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 μ l utilizando el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). La mezcla de reacción fue la siguiente: *buffer* de reacción 1x, MgCl₂ 1 mM, dNTPs 0.25 mM, *primers* 0.5 μ M y 0.05 unidades de Taq polimerasa (PB-L Productos Biológicos).

Todos los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1%.

5.5 Amplificación de los genes de *Bordetella pertussis* por PCR

Para amplificar los ORFs correspondientes a los genes que codifican para las proteínas Bsp22 (618 pb), LpdA (1791 pb) y Fim2 (633 pb) se diseñaron *primers* con el *software* Primer Premier, los cuales contienen en sus extremos las secuencias correspondientes a las enzimas de restricción *Mlu*I y *Hind*III. Las secuencias de los *primers* se muestran en la **Tabla XV**.

Tabla XIV. Secuencia de los *primers* utilizados para amplificar

de	B.	Nombre	Secuencia	Bases	los genes <i>pertussis</i>
		Bsp22 <i>Mlu</i> I	TGGTTCACGCGTATGAGCATTGATC	25	
		Bsp22 <i>Hind</i> III	CTGATAAGCTTTAGCGCATGTTGCTGGTGA	31	
		lpdA <i>Mlu</i> I	TGGTTCACGCGTATGAGCAATATCGT	26	
		lpdA <i>Hind</i> III	CTGATAAGCTTTACTTCTTGCGC	24	
		Fim2 <i>Mlu</i> I	TGGTTCACGCGTATGTTACCCATGCAAATCCC	32	
		Fim2 <i>Hind</i> III	CTGATAAGCTTCTAGGGGTAGACCACGG	28	

Se muestran las secuencias de los *primers* utilizados para amplificar los genes de *Bordetella pertussis* por PCR. Se resaltan las secuencias correspondientes a los sitios de restricción de las enzimas *Mlu*I y *Hind*III.

Las condiciones del ciclado varían según el tamaño del amplicón y son las siguientes: desnaturalización inicial 2' a 94 °C; 35 ciclos consistentes en 20" a 94 °C, 20" a 50 °C, 50" a 72 °C (1' 45" para amplificar LpdA) y un paso de extensión final a 72 °C durante 3 min. Como molde se utilizó el genoma purificado de la cepa BP Tohama I.

5.6 Subclonado de los productos de PCR en el vector pGEM-T

Entre 100-300 ng del producto de PCR del gen *fim2* fueron incubados a 16 °C por 16 horas con 50 ng del vector pGEM-T, 1 μ L de T₄ DNA ligasa 400 U/mL (Promega) en presencia de *buffer* de reacción en un volumen total de 20 μ L. La confirmación del clonado en el vector pGEM-T se realizó primero por *colony* PCR, y luego por PCR y digestión de los clones positivos

utilizando los *primers* T7 *promoter* y *terminator*, y las enzimas de restricción *MluI* y *HindIII*, respectivamente.

5.7 Transformación de bacterias competentes.

La preparación de las bacterias electrocompetentes se realizó de acuerdo a un protocolo descrito previamente (227). Se descongelaron las bacterias y se mantuvieron en hielo por 1 min. A 50 μ l de bacterias se le agregaron 4 μ l de la reacción de ligación, se mezcló por pipeteo y se procedió a la electroporación mediante el equipo Gene Pulser™ (Bio-Rad).

Luego de la electroporación, se agregó 1 mL de medio LB a las bacterias, se incubaron a 37 °C con una agitación de 200 rpm durante 1 h, y se plaqueó en medio agar LB conteniendo ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche.

5.8 Colony PCR

Con escarbadiantes estériles se tocaron colonias de las transformaciones y cada una se resuspendió en 10 μ l de agua bidestilada. La suspensión fue luego hervida durante 5 min. Posteriormente, cada tubo se centrifugó a 14.000 x g durante 5 min. Un microlitro de cada sobrenadante fue empleado como molde para reacciones de PCR.

5.9 Purificación de ADN plasmídico

5.9.1 Purificación rápida para chequeo de clones recombinantes

Se partió de 1,5 mL de cultivo de bacterias crecido durante toda la noche en medio LB/ampicilina (100 μ g/mL) a 37 °C. Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 10.000 x g por 1 minuto y los *pellets* se resuspendieron en 300 μ L de solución I (NaOH 5N, SDS 10%, buffer TE pH 7.4). Luego se agregaron 150 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se resuspendieron los *pellets* por vórtex. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C y se transfirieron 400 μ L del sobrenadante a un nuevo eppendorf de 1.5 mL que contenía 1 mL de etanol 100% previamente enfriado a -20 °C. Se resuspendieron nuevamente las muestras por vórtex y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavaron los *pellets* con etanol 70%. Finalmente se centrifugó una última vez para remover el etanol y se resuspendieron los *pellets* en 25 μ L de agua.

Para verificar la presencia y orientación del inserto en la estrategia de clonado, se realizó una PCR con los *primers* de clonado utilizando como molde 1 µL de una dilución 1/100 del ADN plasmídico purificado y además se digirieron 4 µl del mismo con las enzimas de restricción *MluI* y *HindIII*.

5.9.2 Preparación de ADN plasmídico de alta calidad

Se utilizó una modificación de método de Sambrook (228). Luego de la extracción orgánica con cloroformo:isoamílico, se trasvasó la fase acuosa a un nuevo eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 10 µL de sílica. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 min. Se lavó el *pellet* con la solución New Wash Clean Gene (Promega) y se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 min. Se repitió nuevamente este paso. Se resuspendió el *pellet* en 20-30 µL de agua, se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 min y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo eppendorf.

5.10 Clonado de los genes en el vector de expresión pAE-ctxB

El amplicón correspondiente al gen *fim2* fue aislado de la construcción en pGEM-T por digestión con las enzimas de restricción *MluI* y *HindIII*, mientras que los amplicones de los genes *bsp22* y *lpdA* fueron digeridos directamente con estas enzimas. Los 3 amplicones fueron clonados en el extremo 3' del gen *ctxB* en el vector pAE-ctxB, el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, generando los plásmidos pAEctxB-*bsp22*, pAEctxB-*lpdA* y pAEctxB-*fim2*.

Para la reacción de ligado molecular del inserto al plásmido pAE-ctxB, se utilizaron 50 ng de vector y diferentes cantidades de inserto para las relaciones molares de inserto: vector (1:1, 3:1 y 5:1). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µL, en presencia de *buffer* de ligación y 0,1 U de T₄ ADN ligasa (Invitrogen). La reacción se incubó a 23-26 °C durante una hora. Además se realizó un control de ligación con vector y sin inserto para verificar la eficiencia de la digestión y estimar el número de colonias transformantes debidas al aporte de vector sin digerir.

La confirmación del clonado en el vector pAE-ctxB se realizó de la misma manera que en la sección 5.8.

5.11 Secuenciación de ADN

Tres clones de las construcciones pAEctxB-bsp22, pAEctxB-lpdA, y pAEctxB-fim2 fueron secuenciados por secuenciación automática de ADN por la empresa Macro Gene utilizando los *primers* T7 promoter y T7 terminator.

5.12 Expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 (SI)

El vector de expresión pAE-ctxB permitió la expresión de proteínas recombinantes con una cola adicional de 6 histidinas en el extremo N-terminal, la cual facilita la purificación de las proteínas por IMAC (cargada con Ni²⁺). La expresión está bajo el control del promotor del fago T7.

Las bacterias *E. coli* BL21 (SI) contienen el gen de la T7 RNA polimerasa bajo el control de *proU*, y la expresión fue hecha por adición de NaCl (28).

La expresión de las proteínas CTB-Bsp22, CTB-LpdA y CTB-Fim2 en esta cepa se realizó primero en pequeña escala. Bacterias competentes BL21(SI) fueron transformadas con las construcciones de manera análoga a la realizada con la cepa DH5 α .

Colonias resistentes a ampicilina se inocularon en 1 mL de medio líquido LBss con ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 16 horas bajo agitación de 200 rpm. El cultivo crecido durante la noche se diluyó en medio fresco en una proporción de 1:50 (volumen final de 5 mL) y crecido a 37 °C con agitación. Cuando la absorbancia a 600 nm (A₆₀₀) llegó a 0,8, 1 mL de cada cultivo se alicuotó para el análisis de inducción de la expresión de las proteínas recombinantes por SDS-PAGE, y luego se añadió NaCl a una concentración final de 300 mM. Los cultivos se incubaron durante 3 horas más y finalmente se tomó una nueva alícuota de 1 mL para su posterior análisis.

Las muestras que partían de 1 mL de cultivo, fueron centrifugadas 30 segundos a 14.000 x g y congeladas a -20 °C para su posterior análisis por SDS-PAGE. La resuspensión de los *pellets* se hizo en 100 μ l de agua (con vortex) y 100 μ l de *sample buffer* 2X (Tris-Cl 100mM, pH 6.8, SDS 4%, bromofenol blue 0.2% y glicerol 20%) con 2,5% de β -mercaptoetanol. Luego, las muestras fueron calentadas a 100 °C durante 15 minutos, centrifugadas a 14.000 x g durante 1 minuto, y sembradas en un SDS-PAGE 10%.

El clon que mostró el mejor nivel de expresión fue seleccionado para la expresión de las proteínas en una escala más grande.

El mismo protocolo descrito anteriormente se utilizó para la expresión de las proteínas en escala de 300 mL. Después de la inducción, el cultivo se centrifugó a 3.800 x g por 15 minutos,

y la masa bacteriana obtenida se resuspendió en *buffer* de lisis celular (Tris-HCl 20 mM pH 8,0 y NaCl 100 mM) y 25 μ L de una solución 10 mg/mL de lisozima (Sigma).

La ruptura celular se realizó por sonicación (3 pulsos de 15 segundos a 80 % de amplitud) en un sonicador Branson sonifier 150, y el lisado se centrifugó a 14.000 x g por 15 minutos. Se recogió la fracción insoluble y los cuerpos de inclusión (CI) fueron lavados dos veces con solución de lavado de CI (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, urea 2 M y β -mercaptoetanol 10 mM) y finalmente centrifugados a 14.000 x g durante 15 minutos.

5.13 Renaturalización de las proteínas recombinantes

Después de lavar la fracción insoluble, los CI fueron disueltos en 10 mL de solución de solubilización de CI (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, urea 8 M y β -mercaptoetanol 10 mM). Los CI se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se sometió la muestra al proceso de renaturalización para recuperar la conformación activa de las proteínas recombinantes.

5.13.1 Renaturalización por dilución por goteo

Mediante esta técnica se renaturalizó la proteína CTB-Bsp22. La muestra que contenía los CI solubilizados se goteó lentamente en 2 L de *buffer* de renaturalización (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM), y posteriormente se agitó durante toda la noche a 10 °C. El volumen total fue adsorbido en una columna de 2 ml de Ni-NTA (Invitrogen) previamente cargada con Ni⁺² y equilibrada con 8 mL de solución de unión a la columna.

5.13.2 Renaturalización por diálisis

Las muestras de los CI solubilizados de las proteínas CTB-LpdA y CTB-Fim2 se diluyeron a 30 mL finales y fueron dializadas contra 2 L de *buffer* de renaturalización. La muestra dializada fue luego adsorbida en una columna de Ni-NTA.

5.14 Purificación de las proteínas recombinantes

Luego de que las proteínas renaturalizadas fueron adsorbidas a la columna de purificación, se realizaron dos lavados de 8 mL con *buffer* de renaturalización que contenía 10, 20, 40 y 60 mM de imidazol. Después de los lavados, las proteínas fueron eluidas con el mismo *buffer*, pero conteniendo imidazol 250 mM. La presencia de las proteínas recombinantes se detectó por SDS-PAGE 10% (p/v). Las fracciones de las proteínas purificadas se dializaron contra 2 L de *buffer* de diálisis (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 20 mM y glicina 0,1% m/v). Las proteínas purificadas se mantuvieron a 4 °C y se les agregó el inhibidor de proteasas fluoruro de

fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma) 1 mM para inhibir cualquier actividad de proteasas que pudieran estar presentes en la muestra.

La identidad de la proteína fue confirmada mediante espectrometría de masa del tipo MALDI-TOF.

5.15 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las corridas electroforéticas se realizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de acuerdo a la metodología descrita por Sambrook (228). El gel de *stacking* se preparó en una concentración de 5 % de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) en buffer Tris-HCl 1M a pH 6.8 y SDS 10 % p/v, mientras que el gel de *resolving* se preparó en una concentración de 10 % de poliacrilamida (acrilamida : bisacrilamida 29:1), con Tris-HCl 1M a pH 8.8 y SDS 10 % p/v. Las corridas se realizaron en el equipo Miniprotean III (BioRad) durante aproximadamente 60 minutos a 200 volts utilizando como *buffer* de corrida Tris-HCl 0.025 M pH 8.3, glicina 0.25 M y SDS 0.1 % p/v. Una vez finalizada la corrida, los geles se tiñeron con Coomassie Blue R-250.

5.16 SDS-PAGE de muestras sin tratamiento térmico y reductor

La capacidad de las proteínas CTB-Bsp22, CTB-LpdA y CTB-Fim2 de formar pentámeros fue analizada por SDS-PAGE 10% (p/v). Para ello, las muestras no fueron calentadas a 100 °C, y el *sample buffer* no contenía β -mercaptoetanol. La movilidad electroforética de estas muestras fue comparada con aquella observada para las mismas proteínas calentadas y en presencia de β -mercaptoetanol.

5.17 Tinción de proteínas con Coomassie Blue R-250

Luego de la corrida electroforética, los geles se incubaron en solución de tinción (0.25% Coomassie Blue R-250 disuelto en agua bidestilada/metanol/ácido acético 45:45:10) por al menos 1 hora. Para la visualización de las bandas, el gel se destiñó primero en una solución 50% agua bidestilada, 40% etanol y 10% ácido acético, y luego en una solución 83% agua destilada, 10% etanol y 7% ácido acético.

5.18 Cuantificación de las proteínas recombinantes

La concentración de las proteínas purificadas y renaturalizadas se estimó con el kit Quant-iT™ Protein Assay (Invitrogen) según instrucciones del fabricante.

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

5.19.1 Digestión trípica en gel.

Las bandas teñidas fueron cortadas del gel y transferidas a distintos pocillos de placas multi-well. Los spots fueron lavados alternadamente con 100 μ l de agua bidestilada y acetonitrilo (2 veces de 10 minutos con agitación moderada) para eliminar el colorante Coomassie Blue. Luego los restos sulfhídricos fueron reducidos y alquilados. Se incubaron las bandas con 20 μ l de una solución de DTT 5 mM en bicarbonato de amonio 25 mM (30 minutos a 60 °C), luego se lavaron con acetonitrilo y se incubaron con 20 μ l de iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 25 mM en oscuridad, durante 15 minutos y temperatura ambiente. Se realizó un nuevo lavado con bicarbonato de amonio 25 mM y seguidamente las bandas fueron deshidratadas con 3 lavados con acetonitrilo. Cuando las muestras estuvieron completamente blancas, deshidratadas y libres de acetonitrilo, éstas fueron rehidratadas con 15-20 μ l de bicarbonato de amonio 25 mM conteniendo tripsina (20 μ g/mL, Promega). Las bandas fueron incubadas durante 45 minutos a 4 °C y una vez transcurrido este tiempo se verificó que estuvieran perfectamente hidratadas, se las cubrió con una solución 25 mM de bicarbonato de amonio y se efectuó la digestión a 37 °C, durante toda la noche. Luego los digestos fueron recuperados para su posterior análisis mediante espectrometría de masa.

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

Para realizar el análisis por espectrometría de masa se utilizó la matriz α -ciano-4 hidroxí - ácido cinámico, en una concentración 0.2 g/l preparada en una solución 50 % acetonitrilo / 0.25 % TFA. La muestra junto con la matriz en una relación 1:1 se colocó en el soporte MTP Anchor Chip™ 600/384 TF y se dejó 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 100 Hz, 100 shots por disparo, voltaje de aceleración 20 kV, detección de masa 800-3500 Da, señal deflectada por debajo de 850 Da, ganancia del detector 1650 V, ganancia electrónica 100 mV. Los espectros fueron analizados utilizando el software Flex Analysis (Bruker Daltonics) y calibrados internamente utilizando los picos conocidos de autólisis de la tripsina.

5.19.3. Identificación de proteínas y herramientas bioinformáticas.

La búsqueda e identificación de los péptidos fue realizada 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. Solo fueron consideradas las identificaciones cuyo score fue mayor al score umbral definido por MASCOT como estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

5.20 Western Blot

Luego de la corrida electroforética, se realizó la transferencia desde el gel a una membrana de nylon (Hybond™-P, Amersham Biosciences) mediante electroelución semiseca. Para ello se utilizó el equipo Trans-Blot® SD (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la membrana y el gel fueron equilibrados en el buffer de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM y 20% metanol) por 15 min. Luego, se colocaron 2 papeles de filtro embebidos en el *buffer* de transferencia sobre el ánodo. Sobre éstos se colocó la membrana, el gel, otros 2 papeles de filtro y el cátodo (tapa). La transferencia se realizó por 30 min a 15 V. La eficacia de la transferencia fue evaluada por tinción de la membrana con rojo Ponceau S (0,2% en 3% ácido tricloroacético y 3% ácido sulfosalicílico). La eficiencia de la transferencia se evaluó mediante la tinción del gel con Coomassie Blue. La membrana fue bloqueada toda la noche con una solución 5% leche descremada y 0,1% tween 20 (PBST-leche) a 4 °C y lavada 3 veces con una solución PBS-tween 20 0,1% (PBST) durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se realizó una incubación por 1 h a 37 °C, con una dilución apropiada del anticuerpo primario en PBS. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron nuevos lavados de la membrana y se incubó con una dilución 1/4000 del anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). Luego de 1 h a 37°C, se repitieron los lavados de la membrana. Finalmente se incubó la membrana con el reactivo cromogénico, diaminometilbencidina (DAB) o con el reactivo quimioluminiscente Luminol (ECL) y se hizo la captura de imágenes con el dispositivo EC3™ 500 Imaging System (UVP).

5.21 GM1-ELISA

Todas las soluciones en este ensayo se realizaron en PBS y se utilizaron placas de 96 wells (Maxisorp, Nunc). El *coating* se realizó durante toda la noche a 4 °C con 0.5 µg por well (100

μL) del gangliósido GM₁ (G-7641, Sigma). Como control negativo se utilizó BSA en la misma concentración (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El bloqueo se realizó con 300 μL de PBST-leche durante 1 h a 37 °C y luego se realizaron 5 lavados con PBST (todos los lavados se realizaron de esta manera). Luego, los *wells* se incubaron con 100 μL de diluciones seriadas al $\frac{1}{2}$ de la proteína recombinante que van desde ~ 300 nM a 146 pM durante 2 h a 37 °C, y luego fueron lavados. Posteriormente las placas fueron incubadas con una dilución 1/2500 en PBST-leche 5% (p/v) de un suero policlonal anti-CTB cedido por el grupo del Dr. Paulo Lee Ho y se lavaron. Después, se incubaron con un anticuerpo anti-mouse conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) diluído 1/4000 durante 1 h a 37 °C. Luego de la última ronda de lavados, se agregaron 100 μL de una solución de o-fenilenediamina (OPD) (10 mg OPD, 10 μL H₂O₂, 10 mL de *buffer* citrato).

5.22 Remoción de LPS y ensayo de lisado de *Limulus* amebocyto (LAL test)

El LPS fue removido de alícuotas de las proteínas recombinantes utilizando las columnas Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel columns (Thermo Scientific-Pierce, USA).

Para detectar y cuantificar las endotoxinas lipopolisacáridas (LPS) contaminantes, se utilizó el ensayo de LAL en las muestras proteicas usando el kit QCL-1000 (Bio-Whittaker, Maryland), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.23 Ensayos de inmunización y desafío con las proteínas recombinantes

Grupos de ratones Balb/c hembras de 3 a 4 semanas de edad (8 para cada tratamiento) fueron inmunizados 3 veces con intervalos de 12 días. Las inmunizaciones se realizaron mediante inoculación intranasal o intraperitoneal. En este último caso, se utilizó hidróxido de aluminio (Biol SAIC) en una concentración final de 1 mg/ml como adyuvante. Los tratamientos se detallaron en los Capítulos II y III. A los 12 días de la tercera inmunización, los grupos de ratones inmunizados con las proteínas CTB-Bsp22 y CTB-LpdA fueron desafiados por vía intranasal con la cepa BP106, correspondiente a un aislamiento clínico. Por otra parte, los ratones inmunizados con CTB-Fim2 fueron desafiados de igual manera con la cepa vacunal Tohama I (50 μl conteniendo 5×10^7 - 1×10^8 bacterias).

Como control positivo de protección se utilizó un grupo de ratones inmunizados intraperitonealmente con una dosis de vacuna acelular comercial (BOOSTRIX) igual a 1/10 de la dosis utilizada en humanos (aP 1/10) y desafiados intranasalmente con una suspensión bacteriana de la cepa Tohama I, mientras que como controles negativos de protección se

utilizaron grupos de ratones sin inmunizar (inoculados intranasalmente con PBS) o inmunizados con 5 µg de CTB.

Para la infección se utilizó una suspensión bacteriana realizada a partir de un crecimiento de 24 horas en BGAS. Para preparar el inóculo se utilizó la relación $DO_{650} = 1 = 3 \times 10^9$ bacterias/mL. Para verificar el número de bacterias presentes en el inóculo, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión bacteriana, se plaquearon en BGAS y luego de 3-4 días de incubación a 37 °C se efectuó el recuento de bacterias viables.

Los ratones infectados fueron sacrificados mediante dislocación cervical 8 días post-desafío. Un pulmón entero fue utilizado para cuantificar carga bacteriana. Se extrajeron los pulmones en esterilidad y se homogeneizaron (Pro Scientific INC 200) en PBS. Luego se realizaron diluciones seriadas 1/10 de los homogenatos de pulmón, se plaquearon en medio BGAS y se realizó recuento de las UFC después de 3-4 días de incubación a 37 °C. Una mitad del otro pulmón se utilizó para medir niveles de expresión relativos de citoquinas y la otra mitad se fijó en paraformaldehído y procesado para histología de manera habitual.

Se recolectó sangre 11 días luego de cada inmunización para detectar la presencia de anticuerpos. A su vez, se colectaron lavados nasales y broncopulmonares luego del sacrificio de los animales. A partir de las muestras obtenidas se evaluó la presencia de anticuerpos específicos mediante la técnica de ELISA.

Para la obtención de suero, la sangre fue incubada durante 1h a temperatura ambiente y luego toda la noche a 4 °C. Posteriormente, la sangre fue centrifugada a 3.000 x g durante 15 min y el sobrenadante fue cuidadosamente colectado y transferido a un nuevo *eppendorf* para ser guardado a -20 °C hasta su uso.

5.24 Obtención de muestras de lavados nasales y broncopulmonares

Los animales fueron sacrificados y se les realizó una traqueotomía. Los lavados nasales se obtuvieron mediante la inyección de 500 µL de PBS conteniendo el inhibidor de proteasas aprotinina (Sigma), en una concentración final de 20 µg/mL, con la ayuda de una pipeta pasteur (diámetro interno 0,5 mm). El fluido saliente se recolectó por las fosas nasales del animal. Una vez obtenidas todas las muestras, las mismas se centrifugaron durante 10 min a 3.000 x g, a 4 °C, con el objetivo de remover los restos celulares presentes. Por último, se colectaron los sobrenadantes obtenidos y se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Las muestras broncopulmonares se obtuvieron a partir de los homogenatos de pulmón, los cuales fueron centrifugados como se describió anteriormente. A las muestras obtenidas se les agregó aprotinina.

5.25 ELISA

Placas de 96 *wells* fueron incubadas a 4 °C toda la noche con 5 µg/mL de las proteínas Bsp22, LpdA, o Fim2 en *buffer* carbonato (Na₂CO₃ 0,05 M, pH 9,6) en un volumen final de 50 µL/*well*. Luego las placas fueron bloqueadas con 300 µL/*well* de PBST-leche 5% (p/v) durante 1 h a 37 °C y en seguida lavadas 5 veces con PBST.

Rápidamente se adicionaron a las placas diluciones seriadas de los sueros (a partir de 1/20) en PBS en un volumen final de 50 µL y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Luego de los lavados, se agregó una dilución 1/4000 del anticuerpo anti-IgG (Santa Cruz Biotechnology) o anti-IgA (Southern Biotech) conjugado a HRP y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Luego de los lavados, las placas se revelaron con OPD como se describió en el apartado 5.21.

De modo similar se detectó la presencia de anticuerpos IgA específicos en lavados nasales y broncopulmonares, donde las muestras se incubaron sin diluir.

Cada muestra se evaluó por duplicado y el promedio de las réplicas de cada muestra incógnita se expresó como la diferencia entre el valor de densidad óptica (DO) obtenido frente al valor del DO del control sin suero (control negativo).

5.26 Extracción de ARN y análisis de transcripción reversa

El ARN total se aisló de un cuarto de pulmón por homogeneización mecánica y Trizol (Invitrogen), según lo recomendado por el fabricante. Se realizó un pool de tejido por cada grupo de animales de los ensayos de inmunización y desafío. El ARN se resuspendió en 100 µl de agua libre de nucleasa (Epicenter) y se cuantificaron con un espectrofotómetro (espectrofotómetro Nanodrop ND-1000). El tratamiento con DNasa fue llevado a cabo con el RNase-free DNase Kit (Qiagen). EL ADNc fue sintetizado usando 500 ng de ARN, random hexámeros y transcriptasa reversa SuperScript III, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis por PCR se usaron las mismas condiciones de ciclado y la misma mix descrita en el inciso 5.4. Los *primers* empleados se listan en la **Tabla XVI**.

5.27 Cuantificación de citoquinas por real time PCR (qPCR)

El análisis por PCR en tiempo Real (qPCR) fue realizado con el instrumento Line-Gene FQD-48A (Bioer). Se usó para todas las reacciones la TAQurate green real-time PCR MasterMix (Epicentre Biotechnologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Inmediatamente después de la amplificación se realizaron las curvas de *melting* usando un incremento de temperatura de 0,3 °C/s desde los 70 °C hasta los 89 °C con continua

adquisición de fluorescencia. Las curvas de calibración para la cuantificación absoluta fueron generadas a partir de los amplicones purificados, luego de la confirmación de su secuencia. La concentración de los stocks de los estándares, expresadas como el número de copias del amplicón por unidad de volumen, fue calculada a partir de su absorbancia a 260 nm. Las soluciones stock fueron diluidas seriadamente de a 10 veces, para obtener concentraciones de los estándares de 10^7 a 10^4 copias/ μ l. A partir de los valores de ciclo umbral Ct (del inglés *cycle threshold*) de cada muestra y haciendo uso de la curva de calibración se calcularon las concentraciones de las muestras a cuantificar. La concentración del transcripto de interés se dividió por la del transcripto *housekeeping* (actina) para obtener los valores de expresión normalizados.

Se utilizó la siguiente condición de ciclado: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 65 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 15 segundos a 55 °C y 15 segundos a 72 °C, y finalmente una extensión final de 2 minutos a 72 °C. Finalizada la qPCR, el tamaño del amplicón fue confirmado por electroforesis en gel de agarosa. En la **Tabla XVI** se listan tanto los primers usados para cuantificar ADNc de las citoquinas IFN- γ , IL-4 e IL-17, y para normalizar ADNc total (β -Actina).

Tabla XVI. Primers empleados en qPCR

Nombre	Secuencia	Producto (PB)
IFN- γ Fwd	CTTGGATATCTGGAGGAAGTGGC	234
IFN- γ Rev	GCGCTGGACCTGTGGGTTGTTGA	
IL-4 Fwd	CATCGGCATTTTGAACGAGGTCA	240
IL-4 Rev	CTTATCGATGAATCCAGGCATCG	
IL-17 Fwd	ACCGCAATGAAGACCCTGAT	83
IL-17 Rev	TCCCTCCGCATTGACACA	
β -actina Fwd	AACCCCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGACC	412
β -actina Rev	GGTGATGACCTGGCCGTCAGGCAGCTCGTA	

5.28 Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como media \pm DS. El estadístico utilizado fue análisis de una-vía de varianza (ANOVA) seguido del procedimiento de múltiple comparación de Bonferroni. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

***REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

1. **Abe, A., K. Nagamatsu, and M. Watanabe.** 2008. The Bordetella type III secretion system: its application to vaccine development. *Microbiol Immunol* **52**:128-33.
2. **Abraham, E., and A. Robinson.** 1991. Oral immunization with bacterial polysaccharide and adjuvant enhances antigen-specific pulmonary secretory antibody response and resistance to pneumonia. *Vaccine* **9**:757-64.
3. **Advani, A., L. Gustafsson, C. Ahren, F. R. Mooi, and H. O. Hallander.** 2011. Appearance of Fim3 and ptxP3-Bordetella pertussis strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine* **29**:3438-42.
4. **Alonso, S., N. Reveneau, K. Pethe, and C. Locht.** 2002. Eighty-kilodalton N-terminal moiety of Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: adherence, immunogenicity, and protective role. *Infect Immun* **70**:4142-7.
5. **Alonso, S., E. Willery, G. Renault-Mongenie, and C. Locht.** 2005. Production of nontypeable Haemophilus influenzae HtrA by recombinant Bordetella pertussis with the use of filamentous hemagglutinin as a carrier. *Infect Immun* **73**:4295-301.
6. **Alvarez Hayes, J., E. Erben, Y. Lamberti, M. Ayala, F. Maschi, C. Carbone, B. Gatti, G. Parisi, and M. E. Rodriguez.** 2011. Identification of a new protective antigen of Bordetella pertussis. *Vaccine* **29**:8731-9.
7. **Andreasen, C., and N. H. Carbonetti.** 2009. Role of neutrophils in response to Bordetella pertussis infection in mice. *Infect Immun* **77**:1182-8.
8. **Anjuere, F., A. George-Chandy, F. Audant, D. Rousseau, J. Holmgren, and C. Czerkinsky.** 2003. Transcutaneous Immunization with Cholera Toxin B Subunit Adjuvant Suppresses IgE Antibody Responses Via Selective Induction of Th1 Immune Responses. *J. Immunol* **170**:1586-1592.
9. **Areas, A. P., M. L. Oliveira, E. N. Miyaji, L. C. Leite, K. A. Aires, W. O. Dias, and P. L. Ho.** 2004. Expression and characterization of cholera toxin B-pneumococcal surface adhesin A fusion protein in Escherichia coli: ability of CTB-PsaA to induce humoral immune response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **321**:192-6.
10. **Areas, A. P., M. L. Oliveira, E. N. Miyaji, L. C. Leite, and P. L. Ho.** 2005. Intradermal immunization of mice with cholera toxin B-pneumococcal surface protein A fusion protein is protective against intraperitoneal challenge with Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* **73**:3810-3.
11. **Areas, A. P., M. L. Oliveira, C. R. Ramos, M. E. Sbrogio-Almeida, I. Raw, and P. L. Ho.** 2002. Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6XHis-tagged protein in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* **25**:481-7.
12. **Asensio, C. J., M. E. Gaillard, G. Moreno, D. Bottero, E. Zurita, M. Rumbo, P. van der Ley, A. van der Ark, and D. Hozbor.** 2011. Outer membrane vesicles obtained from Bordetella pertussis Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine* **29**:1649-56.
13. **Ashkar, A. A., K. L. Mossman, B. K. Coombes, C. L. Gyles, and R. Mackenzie.** 2008. FimH adhesin of type 1 fimbriae is a potent inducer of innate antimicrobial responses which requires TLR4 and type 1 interferon signalling. *PLoS Pathog* **4**:e1000233.
14. **Ashworth, L. A., A. B. Dowsett, L. I. Irons, and A. Robinson.** 1985. The location of surface antigens of Bordetella pertussis by immuno-electron microscopy. *Dev Biol Stand* **61**:143-51.
15. **Asokanathan, C., M. Corbel, and D. Xing.** 2013. A CpG-containing oligodeoxynucleotide adjuvant for acellular pertussis vaccine improves the protective response against Bordetella pertussis. *Hum Vaccin Immunother* **9**.
16. **Aujla, S. J., P. J. Dubin, and J. K. Kolls.** 2007. Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Exp Lung Res* **33**:507-18.
17. **Banus, H. A., R. J. Vandebriel, H. de Ruiter, J. A. Dormans, N. J. Nagelkerke, F. R. Mooi, B. Hoebee, H. J. van Kranen, and T. G. Kimman.** 2006. Host genetics of Bordetella pertussis infection in mice: significance of Toll-like receptor 4 in genetic susceptibility and pathobiology. *Infect Immun* **74**:2596-605.
18. **Barbic, J., M. F. Leef, D. L. Burns, and R. D. Shahin.** 1997. Role of gamma interferon in natural clearance of Bordetella pertussis infection. *Infect Immun* **65**:4904-8.
19. **Barnard, A., B. P. Mahon, J. Watkins, K. Redhead, and K. H. Mills.** 1996. Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to Bordetella pertussis: variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0. *Immunology* **87**:372-80.
20. **Baron, S., E. Njamkepo, E. Grimprel, P. Begue, J. C. Desenclos, J. Drucker, and N. Guiso.** 1998. Epidemiology of pertussis in French hospitals in 1993 and 1994: thirty years after a routine use of vaccination. *Pediatr Infect Dis J* **17**:412-8.
21. **Basile, L., D. Bottero, D. Flores, M. Gaillard, S. Fiori, S. Zurita, C. Castuma, and D. Hozbor.** 2012. Genotipificación de aislamientos clínicos de Bordetella pertussis circulantes en nuestro país en los últimos 10 años, VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC Ciudad de Buenos Aires.
22. **Baumman, U., R. Schmitt, and J. E. Gessner.** 2003. New insights into the pathophysiology and in vivo function of IgG Fc receptors through gene deletion studies. *Arch Immunol. Ther. Exp* **51**:399-406.

23. **Bellant, J., B. Zeligs, and J. Mendez-Inocencio.** 2004. Immunologic studies of specific mucosal and systemic immune responses in Mexican school children after booster aerosol or subcutaneous immunization with measles vaccine. *Vaccine* **22**:1214-1220.
24. **Bergfors, E., B. Trollfors, J. Taranger, T. Lagergard, V. Sundh, and G. Zackrisson.** 1999. Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *Int J Infect Dis* **3**:140-6.
25. **Bergquist, C., E. L. Johansson, T. Lagergard, J. Holmgren, and A. Rudin.** 1997. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun* **65**:2676-84.
26. **Berstad, A. K., J. Holst, L. O. Froholm, I. L. Haugen, E. Wedege, F. Oftung, and B. Haneberg.** 2000. A nasal whole-cell pertussis vaccine induces specific systemic and cross-reactive mucosal antibody responses in human volunteers. *J Med Microbiol* **49**:157-63.
27. **Berstad, A. K., F. Oftung, G. E. Korsvold, I. L. Haugen, L. O. Froholm, J. Holst, and B. Haneberg.** 2000. Induction of antigen-specific T cell responses in human volunteers after intranasal immunization with a whole-cell pertussis vaccine. *Vaccine* **18**:2323-30.
28. **Bhandari, P., and J. Gowrishankar.** 1997. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J Bacteriol* **179**:4403-6.
29. **Bordet, J., and O. Gengou.** 1906. Le microbe de la coqueluche. *Annales de l'Institut Pasteur* **20**:731-741.
30. **Bottero, D., D. Gaillard, L. Basile, and D. Hozbor.** 2013. Presented at the Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental
31. **Bottero, D., M. E. Gaillard, L. A. Basile, M. Fritz, and D. F. Hozbor.** 2012. Genotypic and phenotypic characterization of *Bordetella pertussis* strains used in different vaccine formulations in Latin America. *J Appl Microbiol* **112**:1266-76.
32. **Bottero, D., M. E. Gaillard, M. Fingerhann, G. Weltman, J. Fernandez, F. Sisti, A. Graieb, R. Roberts, O. Rico, G. Rios, M. Regueira, N. Binsztein, and D. Hozbor.** 2007. Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin Vaccine Immunol* **14**:1490-8.
33. **Bottero, D., M. M. Griffith, C. Lara, D. Flores, L. Pinciola, M. E. Gaillard, M. Mazzeo, M. I. Zamboni, M. J. Spoletti, E. Anchart, D. Ruggeri, C. Sorhouet, S. Fiori, M. Galas, M. L. Tondella, and D. F. Hozbor.** 2012. *Bordetella holmesii* in children suspected of pertussis in Argentina. *Epidemiol Infect* **141**:714-7.
34. **Bouchez, V., D. Brun, T. Cantinelli, G. Dore, E. Njamkepo, and N. Guiso.** 2009. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine* **27**:6034-41.
35. **Boursaux-Eude, C., S. Thiberge, G. Carletti, and N. Guiso.** 1999. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection: II. Sequence variation and protection induced by a tricomponent acellular vaccine. *Vaccine* **17**:2651-60.
36. **Brandtzaeg, P.** 2003. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**:3-5.
37. **Braun, M. C., J. He, C. Y. Wu, and B. L. Kelsall.** 1999. Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta1 and beta2 chain expression. *J Exp Med* **189**:541-52.
38. **Brooks, D. A., and R. Clover.** 2006. Pertussis infection in the United States: role for vaccination of adolescents and adults. *J Am Board Fam Med* **19**:603-11.
39. **Byrne, P., P. McGuirk, S. Todryk, and K. H. Mills.** 2004. Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with *Bordetella pertussis* associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *Eur J Immunol* **34**:2579-88.
40. **Canthaboo, C., D. Xing, X. Q. Wei, and M. J. Corbel.** 2002. Investigation of role of nitric oxide in protection from *Bordetella pertussis* respiratory challenge. *Infect Immun* **70**:679-84.
41. **Carbonetti, N. H.** 2007. Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection and disease. *Curr Opin Pharmacol* **7**:272-8.
42. **Carbonetti, N. H., G. V. Artamonova, C. Andreasen, and N. Bushar.** 2005. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin provide a one-two punch for establishment of *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect Immun* **73**:2698-703.
43. **Carbonetti, N. H., G. V. Artamonova, R. M. Mays, and Z. E. Worthington.** 2003. Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **71**:6358-66.
44. **Carbonetti, N. H., G. V. Artamonova, N. Van Rooijen, and V. I. Ayala.** 2007. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect Immun* **75**:1713-20.
45. **Caroff, M., R. Chaby, D. Karibian, J. Perry, C. Deprun, and L. Szabo.** 1990. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. *J Bacteriol* **172**:1121-8.
46. **Carter, E. J., and N. W. Preston.** 1984. Association between *Bordetella pertussis* agglutinin 2 and fimbriae. *J Med Microbiol* **18**:87-94.

47. **Cassone, A., C. M. Ausiello, F. Urbani, R. Lande, M. Giuliano, A. La Sala, A. Piscitelli, and S. Salmaso.** 1997. Cell-mediated and antibody responses to Bordetella pertussis antigens in children vaccinated with acellular or whole-cell pertussis vaccines. The Progetto Pertosse-CMI Working Group. *Arch Pediatr Adolesc Med* **151**:283-9.
48. **Cong, Y., C. T. Weaver, and C. O. Elson.** 1997. The mucosal adjuvant activity of cholera toxin involves enhancement of costimulatory activity by selective up-regulation of B7.2 expression. *J Immunol* **159**:5301-8.
49. **Corbel, M. J., R. G. Das, D. Lei, D. K. Xing, Y. Horiuchi, and R. Dobbelaer.** 2008. WHO Working Group on revision of the Manual of Laboratory Methods for Testing DTP Vaccines-Report of two meetings held on 20-21 July 2006 and 28-30 March 2007, Geneva, Switzerland. *Vaccine* **26**:1913-21.
50. **Cotter, P. A., and A. M. Jones.** 2003. Phosphorelay control of virulence gene expression in Bordetella. *Trends Microbiol* **11**:367-73.
51. **Crowcroft, N. S., C. Stein, P. Duclos, and M. Birmingham.** 2003. How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect Dis* **3**:413-8.
52. **Chen, G., M. S. Severo, O. S. Sakhon, A. Choy, M. J. Herron, R. F. Felsheim, H. Wiryawan, J. Liao, J. L. Johns, U. G. Munderloh, F. S. Sutterwala, M. Kotsyfakis, and J. H. Pedra.** 2012. Anaplasma phagocytophilum dihydrolipoamide dehydrogenase 1 affects host-derived immunopathology during microbial colonization. *Infect Immun* **80**:3194-205.
53. **Cherry, H.** 2004. Pertussis and other Bordetella infections, p. 1588-1608. *In* J. D. C. Feigin, G. J. Demmler, and S. Kaplan (ed.), *Textbook of pediatric infectious diseases*, 5th ed., Philadelphia.
54. **Cherry, J. D.** 2005. The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of Bordetella pertussis infection. *Pediatrics* **115**:1422-7.
55. **Cherry, J. D.** 2012. Why do pertussis vaccines fail? *Pediatrics* **129**:968-70.
56. **Cherry, J. D., J. Gornbein, U. Heininger, and K. Stehr.** 1998. A search for serologic correlates of immunity to Bordetella pertussis cough illnesses. *Vaccine* **16**:1901-6.
57. **Cherry, J. D., U. Heininger, P. D. Christenson, T. Eckhardt, S. Laussucq, J. G. Hackell, J. R. Mezzatesta, and K. Stehr.** 1995. Surrogate serologic tests for the prediction of pertussis vaccine efficacy. *Ann N Y Acad Sci* **754**:359-63.
58. **de Greeff, S. C., F. R. Mooi, J. F. Schellekens, and H. E. de Melker.** 2008. Impact of acellular pertussis preschool booster vaccination on disease burden of pertussis in The Netherlands. *Pediatr Infect Dis J* **27**:218-23.
59. **De Magistris, M. T., M. Romano, A. Bartoloni, R. Rappuoli, and A. Tagliabue.** 1989. Human T cell clones define S1 subunit as the most immunogenic moiety of pertussis toxin and determine its epitope map. *J Exp Med* **169**:1519-32.
60. **de Melker, H. E., M. A. Conyn-van Spaendonck, H. C. Rumke, J. K. van Wijngaarden, F. R. Mooi, and J. F. Schellekens.** 1997. Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg Infect Dis* **3**:175-8.
61. **di Tommaso, A., M. T. de Magistris, M. Bugnoli, I. Marsili, R. Rappuoli, and S. Abrignani.** 1994. Formaldehyde treatment of proteins can constrain presentation to T cells by limiting antigen processing. *Infect Immun* **62**:1830-4.
62. **Dunne, A., P. J. Ross, E. Pospisilova, J. Masin, A. Meaney, C. E. Sutton, Y. Iwakura, J. Tschopp, P. Sebo, and K. H. Mills.** 2010. Inflammation activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against Bordetella pertussis. *J Immunol* **185**:1711-9.
63. **Edwards, K. D., Michael.** 2008. Pertussis Vaccines. *In* M. Stanley A. Plotkin, Walter A. Orenstein, MD and Paul A. Offit, MD (ed.), *Vaccines*.
64. **Edwards, K. M., B. D. Meade, M. D. Decker, G. F. Reed, M. B. Rennels, M. C. Steinhoff, E. L. Anderson, J. A. Englund, M. E. Pichichero, and M. A. Deloria.** 1995. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. *Pediatrics* **96**:548-57.
65. **Elahi, S., J. Holmstrom, and V. Gerdt.** 2007. The benefits of using diverse animal models for studying pertussis. *Trends Microbiol* **15**:462-8.
66. **Elder, K. D., and E. T. Harvill.** 2004. Strain-dependent role of BrkA during Bordetella pertussis infection of the murine respiratory tract. *Infect Immun* **72**:5919-24.
67. **Eriksson, K., M. Fredriksson, I. Nordstrom, and J. Holmgren.** 2003. Cholera Toxin B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development. *Infect Immun* **71**:1740-1747.
68. **Errea, A., G. Moreno, F. Sisti, J. Fernandez, M. Rumbo, and D. F. Hozbor.** 2010. Mucosal innate response stimulation induced by lipopolysaccharide protects against Bordetella pertussis colonization. *Med Microbiol Immunol* **199**:103-8.
69. **Exposito Raya, N., M. Mestre Luaces, R. Silva Rodriguez, C. Nazabal Galvez, M. Pena Rivero, N. Martinez de la Puente, M. Font Batista, and G. Guillen Nieto.** 1999. Preformulation study of the vaccine candidate P64k against Neisseria meningitidis. *Biotechnol Appl Biochem* **29 (Pt 2)**:113-7.

70. Fedele, G., F. Spensieri, R. Palazzo, M. Nasso, G. Y. Cheung, J. G. Coote, and C. M. Ausiello. 2010. Bordetella pertussis commits human dendritic cells to promote a Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK-pathways. *PLoS One* **5**:e8734.
71. Fennelly, N. K., F. Sisti, S. C. Higgins, P. J. Ross, H. van der Heide, F. R. Mooi, A. Boyd, and K. H. Mills. 2008. Bordetella pertussis expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect Immun* **76**:1257-66.
72. Feunou, P. F., H. Kammoun, A. S. Debrie, N. Mielcarek, and C. Locht. 2010. Long-term immunity against pertussis induced by a single nasal administration of live attenuated B. pertussis BPZE1. *Vaccine* **28**:7047-53.
73. Fine, P. E., and J. A. Clarkson. 1987. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev Infect Dis* **9**:866-83.
74. Fingermann, M., J. Fernandez, F. Sisti, M. E. Rodriguez, B. Gatti, D. Bottero, A. Graieb, M. E. Gaillard, S. G. Ayala, F. R. Mooi, H. Lopardo, and D. Hozbor. 2006. Differences of circulating Bordetella pertussis population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine* **24**:3513-21.
75. Flach, C. F., S. Lange, E. Jennische, I. Lonroth, and J. Holmgren. 2005. Cholera toxin induces a transient depletion of CD8+ intraepithelial lymphocytes in the rat small intestine as detected by microarray and immunohistochemistry. *Infect Immun* **73**:5595-602.
76. Flores, D., C. Lara, E. Zurita, C. Sorhouet, A. Fioriti, S. Fiori, D. Bottero, P. Barbero, M. Bettiol, B. Gatti, L. Pianciola, M. Mazzeo, M. Zamboni, E. Anchart, A. Graieb, S. González Ayala, M. Galas, and D. Hozbor. 2010. Epidemiology Of Pertussis In Argentina During The 2006-2010 Period: Trends By Age Group And Status Of Vaccination. Possible Source Of Infection Ninth International Bordetella Symposium, Baltimore, EEUU.
77. Forsyth, K. D., M. Campins-Marti, J. Caro, J. D. Cherry, D. Greenberg, N. Guiso, U. Heininger, J. Schellekens, T. Tan, C. H. von Konig, and S. Plotkin. 2004. New pertussis vaccination strategies beyond infancy: recommendations by the global pertussis initiative. *Clin Infect Dis* **39**:1802-9.
78. Friedman, R. L., K. Nordensson, L. Wilson, E. T. Akporiaye, and D. E. Yocum. 1992. Uptake and intracellular survival of Bordetella pertussis in human macrophages. *Infect Immun* **60**:4578-85.
79. Fromantin, C., B. Jamot, J. Cohen, L. Piroth, P. Pothier, and E. Kohli. 2001. Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally in mice, with or without the mucosal adjuvants cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin, induce a Th1/Th2-like immune response. *J Virol* **75**:11010-6.
80. Gagliardi, M. C., F. Sallusto, M. Marinaro, A. Langenkamp, A. Lanzavecchia, and M. T. De Magistris. 2000. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur J Immunol* **30**:2394-403.
81. Gaillard, M. E., D. Bottero, C. E. Castuma, L. A. Basile, and D. Hozbor. 2011. Laboratory adaptation of Bordetella pertussis is associated with the loss of type three secretion system functionality. *Infect Immun* **79**:3677-82.
82. Garlapati, S., N. F. Eng, T. G. Kiros, J. Kindrachuk, G. K. Mutwiri, R. E. Hancock, S. A. Halperin, A. A. Potter, L. A. Babiuk, and V. Gerdt. 2011. Immunization with PCEP microparticles containing pertussis toxoid, CpG ODN and a synthetic innate defense regulator peptide induces protective immunity against pertussis. *Vaccine* **29**:6540-8.
83. George-Chandy, A., K. Eriksson, M. Lebens, I. Nordstrom, E. Schon, and J. Holmgren. 2001. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells. *Infect Immun* **69**:5716-25.
84. Geuijen, C. A., R. J. Willems, and F. R. Mooi. 1996. The major fimbrial subunit of Bordetella pertussis binds to sulfated sugars. *Infect Immun* **64**:2657-65.
85. Geurtsen, J., R. J. Vandebriel, E. R. Gremmer, B. Kuipers, J. Tommassen, and P. van der Ley. 2007. Consequences of the expression of lipopolysaccharide-modifying enzymes for the efficacy and reactogenicity of whole-cell pertussis vaccines. *Microbes Infect* **9**:1096-103.
86. Giammanco, A., S. Taormina, A. Chiarini, G. Dardanoni, P. Stefanelli, S. Salmaso, and P. Mastrantonio. 2003. Analogous IgG subclass response to pertussis toxin in vaccinated children, healthy or affected by whooping cough. *Vaccine* **21**:1924-31.
87. Godfroid, F., P. Denoel, and J. Poolman. 2005. Are vaccination programs and isolate polymorphism linked to pertussis re-emergence? *Expert Rev Vaccines* **4**:757-78.
88. Gong, Z., X. Long, L. Pan, Y. Le, Q. Liu, S. Wang, J. Guo, B. Xiao, M. Zhou, and D. Mei. 2009. Cloning, expression, purification and characterization of the cholera toxin B subunit and triple glutamic acid decarboxylase epitopes fusion protein in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* **66**:191-7.
89. Gonzalez, S., A. Alvarez, E. Caballero, L. Vina, G. Guillen, and R. Silva. 2000. P64k meningococcal protein as immunological carrier for weak immunogens. *Scand J Immunol* **52**:113-6.
90. Gowrishankar, J., and D. Manna. 1996. How is osmotic regulation of transcription of the Escherichia coli proU operon achieved? A review and a model. *Genetica* **97**:363-78.

91. **Gracia, A., M. Polewiczka, S. A. Halperinc, R. E. W. Hancockd, A. A. Pottera, L. A. Babiukb, and V. Gerdtza.** 2011. Antibody responses in adult and neonatal BALB/c mice to immunization with novel Bordetella pertussis vaccine formulations. *Vaccine* **29**:1595-1604.
92. **Grandi, G.** 2003. Rational antibacterial vaccine design through genomic technologies. *Int J Parasitol* **33**:615-20.
93. **Guillen, G., A. Alvarez, R. Silva, V. Morera, S. Gonzalez, A. Musacchio, V. Besada, E. Coizeau, E. Caballero, C. Nazabal, T. Carmenate, L. J. Gonzalez, R. Estrada, Y. Tambara, G. Padron, and L. Herrera.** 1998. Expression in Escherichia coli of the IpdA gene, protein sequence analysis and immunological characterization of the P64k protein from Neisseria meningitidis. *Biotechnol Appl Biochem* **27 (Pt 3)**:189-96.
94. **Guiso, N., C. Capiou, G. Carletti, J. Poolman, and P. Hauser.** 1999. Intranasal murine model of Bordetella pertussis infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* **17**:2366-76.
95. **Guiso, N., C. H. Wirsing von Konig, K. Forsyth, T. Tan, and S. A. Plotkin.** 2011. 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* **29**:1115-21.
96. **Guo, L., M. Zheng, Y. Ding, D. Li, Z. Yang, H. Wang, Q. Chen, Z. Sui, F. Fang, and Z. Chen.** 2010. Protection against multiple influenza A virus subtypes by intranasal administration of recombinant nucleoprotein. *Arch Virol* **155**:1765-75.
97. **Gupta, R. K., D. N. Taylor, D. A. Bryla, J. B. Robbins, and S. C. Szu.** 1998. Phase 1 evaluation of Vibrio cholerae O1, serotype Inaba, polysaccharide-cholera toxin conjugates in adult volunteers. *Infect Immun* **66**:3095-9.
98. **Guris, D., P. M. Strebel, B. Bardenheier, M. Brennan, R. Tachdjian, E. Finch, M. Wharton, and J. R. Livengood.** 1999. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis* **28**:1230-7.
99. **Gustafsson, L., H. O. Hallander, P. Olin, E. Reizenstein, and J. Storsaeter.** 1996. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med* **334**:349-55.
100. **Gustafsson, L., L. Hessel, J. Storsaeter, and P. Olin.** 2006. Long-term follow-up of Swedish children vaccinated with acellular pertussis vaccines at 3, 5, and 12 months of age indicates the need for a booster dose at 5 to 7 years of age. *Pediatrics* **118**:978-84.
101. **Gzyl, A., E. Augustynowicz, G. Gniadek, D. Rabczenko, G. Dulny, and J. Slusarczyk.** 2004. 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* **22**:2122-8.
102. **Hafler, J. P., and A. Pohl-Koppe.** 1998. The cellular immune response to Bordetella pertussis in two children with whooping cough. *Eur J Med Res* **3**:523-6.
103. **Hale, C., I. R. Humphreys, T. Hussell, F. Bowie, S. Clare, D. Pickard, A. Preston, G. Del Giudice, and G. Dougan.** 2004. Mucosal immunisation of murine neonates using whole cell and acellular Pertussis vaccines. *Vaccine* **22**:3595-602.
104. **Halperin, S. A.** 2007. The control of pertussis--2007 and beyond. *N Engl J Med* **356**:110-3.
105. **Halperin, S. A., S. A. Heifetz, and A. Kasina.** 1988. Experimental respiratory infection with Bordetella pertussis in mice: comparison of two methods. *Clin Invest Med* **11**:297-303.
106. **Hallstrom, T., M. Morgelin, D. Barthel, M. Raguse, A. Kunert, R. Hoffmann, C. Skerka, and P. F. Zipfel.** 2012. Dihydroliipoamide dehydrogenase of Pseudomonas aeruginosa is a surface-exposed immune evasion protein that binds three members of the factor H family and plasminogen. *J Immunol* **189**:4939-50.
107. **Hazenbos, W. L., C. A. Geuijen, B. M. van den Berg, F. R. Mooi, and R. van Furth.** 1995. Bordetella pertussis fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. *J Infect Dis* **171**:924-9.
108. **He, Q., and J. Mertsola.** 2008. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol* **3**:329-39.
109. **Hegerle, N., A. S. Paris, D. Brun, G. Dore, E. Njamkepo, S. Guillot, and N. Guiso.** 2012. Evolution of French Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis isolates: increase of Bordetellae not expressing pertactin. *Clin Microbiol Infect* **18**:E340-6.
110. **Hellwig, S. M., A. B. van Spriell, J. F. Schellekens, F. R. Mooi, and J. G. van de Winkel.** 2001. Immunoglobulin A-mediated protection against Bordetella pertussis infection. *Infect Immun* **69**:4846-50.
111. **Hendrikx, L. H., R. M. Schure, K. Ozturk, L. G. de Rond, S. C. de Greeff, E. A. Sanders, G. A. Berbers, and A. M. Buisman.** 2011. Different IgG-subclass distributions after whole-cell and acellular pertussis infant primary vaccinations in healthy and pertussis infected children. *Vaccine* **29**:6874-80.
112. **Herbert, M., A. Kraiss, A. K. Hilpert, S. Schlor, and J. Reidl.** 2003. Aerobic growth deficient Haemophilus influenzae mutants are non-virulent: implications on metabolism. *Int J Med Microbiol* **293**:145-52.

113. **Hervouet, C., C. Luci, N. Cuburu, M. Cremel, S. Bekri, L. Vimeux, C. Maranon, C. Czerkinsky, A. Hosmalin, and F. Anjuere.** 2010. Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in the mouse female genital tract. *Vaccine* **28**:5582-90.
114. **Hewlett, E. L., and K. M. Edwards.** 2005. Clinical practice. Pertussis--not just for kids. *N Engl J Med* **352**:1215-22.
115. **Higgins, S. C., A. G. Jarnicki, E. C. Lavelle, and K. H. Mills.** 2006. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* **177**:7980-9.
116. **Higgs, R., S. C. Higgins, P. J. Ross, and K. H. Mills.** 2012. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol* **5**:485-500.
117. **Hijnen, M., P. G. van Gageldonk, G. A. Berbers, T. van Woerkom, and F. R. Mooi.** 2005. The *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin retains its immunological properties after overproduction in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **41**:106-12.
118. **Hoe, N., K. Nakashima, D. Grigsby, X. Pan, S. J. Dou, S. Naidich, M. Garcia, E. Kahn, D. Bergmire-Sweat, and J. M. Musser.** 1999. Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains. *Emerg Infect Dis* **5**:254-63.
119. **Holmes, W.** 1940. Bacillary and rickettsial infections, acute and chronic; a text-book, black death to white plague.
120. **Holmgren, J., J. Adamsson, F. Anjuere, J. Clemens, C. Czerkinsky, K. Eriksson, C. F. Flach, A. George-Chandy, A. M. Harandi, M. Lebens, T. Lehner, M. Lindblad, E. Nygren, S. Raghavan, J. Sanchez, M. Stanford, J. B. Sun, A. M. Svennerholm, and S. Tengvall.** 2005. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett* **97**:181-8.
121. **Holmgren, J., and C. Czerkinsky.** 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine* **11**:S45-S53.
122. **Holmgren, J., C. Czerkinsky, K. Eriksson, and A. Mharandi.** 2003. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* **21 Suppl 2**:S89-95.
123. **Holmgren, J., I. Lonroth, and L. Svennerholm.** 1973. Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure from studies with GM1 ganglioside and related glycolipids. *Infect Immun* **8**:208-14.
124. **Hozbor, D., F. Mooi, D. Flores, G. Weltman, D. Bottero, S. Fossati, C. Lara, M. E. Gaillard, L. Pianciola, E. Zurita, A. Fioriti, D. Archuby, M. Galas, N. Binsztein, M. Regueira, C. Castuma, M. Fingermann, and A. Graieb.** 2009. Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect* **59**:225-31.
125. **Hudson, P., T. S. Gorton, L. Papazisi, K. Cecchini, S. Frasca, Jr., and S. J. Geary.** 2006. Identification of a virulence-associated determinant, dihydrolipoamide dehydrogenase (lpd), in *Mycoplasma gallisepticum* through in vivo screening of transposon mutants. *Infect Immun* **74**:931-9.
126. **Imaoka, K., C. J. Miller, M. Kubota, M. B. McChesney, B. Lohman, M. Yamamoto, K. Fujihashi, K. Someya, M. Honda, J. R. McGhee, and H. Kiyono.** 1998. Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J Immunol* **161**:5952-8.
127. **Isaka, M., Y. Yasuda, M. Mizokami, S. Kozuka, T. Taniguchi, K. Matano, J. Maeyama, K. Mizuno, K. Morokuma, K. Ohkuma, N. Goto, and K. Tochikubo.** 2001. Mucosal immunization against hepatitis B virus by intranasal co-administration of recombinant hepatitis B surface antigen and recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* **19**:1460-6.
128. **Isaka, M., Y. Yasuda, T. Taniguchi, S. Kozuka, K. Matano, J. Maeyama, K. Morokuma, K. Ohkuma, N. Goto, and K. Tochikubo.** 2003. Mucosal and systemic antibody responses against an acellular pertussis vaccine in mice after intranasal co-administration with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* **21**:1165-73.
129. **Jabbal-Gill, I., A. N. Fisher, R. Rappuoli, S. S. Davis, and L. Illum.** 1998. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice. *Vaccine* **16**:2039-46.
130. **Jani, D., N. K. Singh, S. Bhattacharya, L. S. Meena, Y. Singh, S. N. Upadhyay, A. K. Sharma, and A. K. Tyagi.** 2004. Studies on the immunogenic potential of plant-expressed cholera toxin B subunit. *Plant Cell Rep* **22**:471-7.
131. **Jones, D. H., B. W. McBride, C. Thornton, D. T. O'Hagan, A. Robinson, and G. H. Farrar.** 1996. Orally administered microencapsulated *Bordetella pertussis* fimbriae protect mice from *B. pertussis* respiratory infection. *Infect Immun* **64**:489-94.
132. **Judelsohn, R. G., and M. B. Koslap-Petraco.** 2007. Public health perspectives on the rising incidence of pertussis. *Public Health Nurs* **24**:421-8.
133. **Juretzko, P., T. Fabian-Marx, B. Haastert, G. Giani, R. von Kries, and C. H. Wirsing von Konig.** 2001. Pertussis in Germany: regional differences in management and vaccination status of hospitalized cases. *Epidemiol Infect* **127**:63-71.
134. **Kallonen, T., and Q. He.** 2009. *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. *Expert Rev Vaccines* **8**:863-75.

135. **Kaslow, H. R., and D. L. Burns.** 1992. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J* **6**:2684-90.
136. **Kendrick, P. L., G. Eldering, M. K. Dixon, and J. Misner.** 1947. Mouse Protection Tests in the Study of Pertussis Vaccine: A Comparative Series Using the Intracerebral Route for Challenge. *Am J Public Health Nations Health* **37**:803-10.
137. **Kersten, G., and H. Hirschberg.** 2007. Needle-free vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **4**:459-74.
138. **Kim, P. H., L. Eckmann, W. J. Lee, W. Han, and M. F. Kagnoff.** 1998. Cholera toxin and cholera toxin B subunit induce IgA switching through the action of TGF-beta 1. *J Immunol* **160**:1198-203.
139. **Kim, T. G., A. Gruber, and W. H. Langridge.** 2004. HIV-1 gp120 V3 cholera toxin B subunit fusion gene expression in transgenic potato. *Protein Expr Purif* **37**:196-202.
140. **Kimura, A., K. T. Mountzouros, D. A. Relman, S. Falkow, and J. L. Cowell.** 1990. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect Immun* **58**:7-16.
141. **King, A. J., G. Berbers, H. F. van Oirschot, P. Hoogerhout, K. Knipping, and F. R. Mooi.** 2001. Role of the polymorphic region 1 of the Bordetella pertussis protein pertactin in immunity. *Microbiology* **147**:2885-95.
142. **King, A. J., T. van Gorkom, H. G. van der Heide, A. Advani, and S. van der Lee.** 2010. Changes in the genomic content of circulating Bordetella pertussis strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? *BMC Genomics* **11**:64.
143. **Kirimanjeswara, G. S., L. M. Agosto, M. J. Kennett, O. N. Bjornstad, and E. T. Harvill.** 2005. Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of Bordetella pertussis. *J Clin Invest* **115**:3594-601.
144. **Kirimanjeswara, G. S., P. B. Mann, and E. T. Harvill.** 2003. Role of antibodies in immunity to Bordetella infections. *Infect Immun* **71**:1719-24.
145. **Klimpel, G. R., M. Asuncion, J. Haithcoat, and D. W. Niesel.** 1995. Cholera toxin and Salmonella typhimurium induce different cytokine profiles in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* **63**:1134-7.
146. **Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd, and K. M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-6.
147. **Kowalik, F., A. P. Barbosa, V. R. Fernandes, P. R. Carvalho, M. L. Avila-Aguero, D. Y. Goh, A. Goh, J. G. de Miguel, F. Moraga, J. Roca, M. Campins, M. Huang, J. Quian, N. Riley, D. Beck, and T. Verstraeten.** 2007. Prospective multinational study of pertussis infection in hospitalized infants and their household contacts. *Pediatr Infect Dis J* **26**:238-42.
148. **Kramer, J. M., and S. L. Gaffen.** 2007. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol* **78**:1083-93.
149. **Laloi, P., C. L. Munro, K. R. Jones, and F. L. Macrina.** 1996. Immunologic characteristics of a Streptococcus mutans glucosyltransferase B sucrose-binding site peptide-cholera toxin B-subunit chimeric protein. *Infect Immun* **64**:28-36.
150. **Lamberti, Y., M. L. Perez Vidakovics, L. W. van der Pol, and M. E. Rodriguez.** 2008. Cholesterol-rich domains are involved in Bordetella pertussis phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog* **44**:501-11.
151. **Lamberti, Y. A., J. A. Hayes, M. L. Perez Vidakovics, E. T. Harvill, and M. E. Rodriguez.** 2010. Intracellular trafficking of Bordetella pertussis in human macrophages. *Infect Immun* **78**:907-13.
152. **Larsson, C., J. Holmgren, G. Lindahl, and C. Bergquist.** 2004. Intranasal immunization of mice with group B streptococcal protein rib and cholera toxin B subunit confers protection against lethal infection. *Infect Immun* **72**:1184-7.
153. **Lawson, L. B., E. B. Norton, and J. D. Clements.** 2011. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Curr Opin Immunol* **23**:414-20.
154. **Lebens, M., J. B. Sun, H. Sadeghi, M. Backstrom, I. Olsson, N. Mielcarek, B. L. Li, A. Capron, C. Czerkinsky, and J. Holmgren.** 2003. A mucosally administered recombinant fusion protein vaccine against schistosomiasis protecting against immunopathology and infection. *Vaccine* **21**:514-20.
155. **Ledermann D, W.** 2004. Breve historia de la Bordetella pertussis, una elusiva damisela. *Revista chilena de infectología*:241-246.
156. **Lee, S. F., S. A. Halperin, D. F. Salloum, A. MacMillan, and A. Morris.** 2003. Mucosal immunization with a genetically engineered pertussis toxin S1 fragment-cholera toxin subunit B chimeric protein. *Infect Immun* **71**:2272-5.
157. **Lencer, W. I., and B. Tsai.** 2003. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem Sci* **28**:639-45.
158. **Levine, M. M., J. B. Kaper, R. E. Black, and M. L. Clements.** 1983. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev* **47**:510-50.
159. **Li de la Sierra, I., L. Pernot, T. Prange, P. Saludjian, M. Schiltz, R. Fourme, and G. Padron.** 1997. Molecular structure of the lipoamide dehydrogenase domain of a surface antigen from Neisseria meningitidis. *J Mol Biol* **269**:129-41.

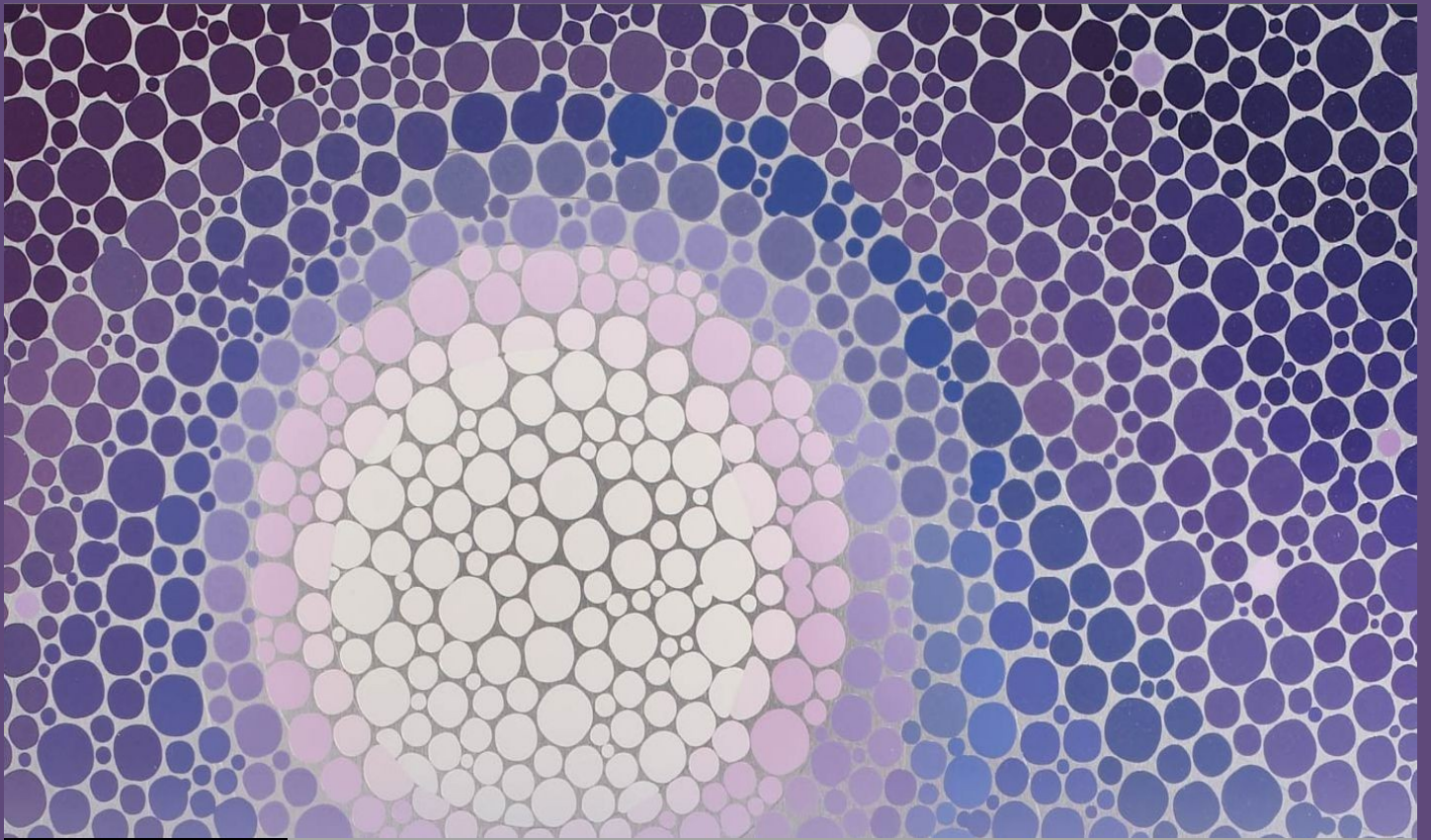
160. Liljeqvist, S., S. Stahl, C. Andreoni, H. Binz, M. Uhlen, and M. Murby. 1997. Fusions to the cholera toxin B subunit: influence on pentamerization and GM1 binding. *J Immunol Methods* **210**:125-35.
161. Linden, A., M. Laan, and G. P. Anderson. 2005. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J* **25**:159-72.
162. Locht, C., R. Antoine, D. Raze, N. Mielcarek, D. Hot, Y. Lemoine, and F. Mascart. 2004. Bordetella pertussis from functional genomics to intranasal vaccination. *Int J Med Microbiol* **293**:583-8.
163. Mahon, B. P., and K. H. Mills. 1999. Interferon-gamma mediated immune effector mechanisms against Bordetella pertussis. *Immunol Lett* **68**:213-7.
164. Mahon, B. P., B. J. Sheahan, F. Griffin, G. Murphy, and K. H. Mills. 1997. Atypical disease after Bordetella pertussis respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin mu chain genes. *J Exp Med* **186**:1843-51.
165. Malley, R., S. C. Morse, L. C. Leite, A. P. Areas, P. L. Ho, F. S. Kubrusly, I. C. Almeida, and P. Anderson. 2004. Multiserotype protection of mice against pneumococcal colonization of the nasopharynx and middle ear by killed nonencapsulated cells given intranasally with a nontoxic adjuvant. *Infect Immun* **72**:4290-2.
166. Marr, N., D. C. Oliver, V. Laurent, J. Poolman, P. Denoel, and R. C. Fernandez. 2008. Protective activity of the Bordetella pertussis BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine* **26**:4306-11.
167. Mascart, F., V. Verscheure, A. Malfroot, M. Hainaut, D. Pierard, S. Temerman, A. Peltier, A. S. Debrie, J. Levy, G. Del Giudice, and C. Locht. 2003. Bordetella pertussis infection in 2-month-old infants promotes type 1 T cell responses. *J Immunol* **170**:1504-9.
168. Matsumoto, Y., S. Suzuki, T. Nozoye, T. Yamakawa, Y. Takashima, T. Arakawa, N. Tsuji, F. Takaiwa, and Y. Hayashi. 2009. Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of transgenic rice plants producing a vaccine candidate antigen (As16) of *Ascaris suum* fused with cholera toxin B subunit. *Transgenic Res* **18**:185-92.
169. Mattoo, S., and J. D. Cherry. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**:326-82.
170. Mattoo, S., A. K. Foreman-Wykert, P. A. Cotter, and J. F. Miller. 2001. Mechanisms of Bordetella pathogenesis. *Front Biosci* **6**:E168-86.
171. Mattoo, S., M. H. Yuk, L. L. Huang, and J. F. Miller. 2004. Regulation of type III secretion in Bordetella. *Mol Microbiol* **52**:1201-14.
172. McGuirk, P., B. P. Mahon, F. Griffin, and K. H. Mills. 1998. Compartmentalization of T cell responses following respiratory infection with Bordetella pertussis: hyporesponsiveness of lung T cells is associated with modulated expression of the co-stimulatory molecule CD28. *Eur J Immunol* **28**:153-63.
173. McGuirk, P., and K. H. Mills. 2000. A regulatory role for interleukin 4 in differential inflammatory responses in the lung following infection of mice primed with Th1- or Th2-inducing pertussis vaccines. *Infect Immun* **68**:1383-90.
174. Medhekar, B., R. Shrivastava, S. Mattoo, M. Gingery, and J. F. Miller. 2009. Bordetella Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo. *Mol Microbiol* **71**:492-504.
175. Menzies, R. M., Peter; Beard, Frank 2004. Vaccine Preventable Diseases and Vaccination Coverage in Aboriginal and Torres Strait Islander People, Australia, 1999 to 2002. *Communicable Diseases Intelligence*:S26-S28.
176. Merritt, E. A., S. Sarfaty, F. van den Akker, C. L'Hoir, J. A. Martial, and W. G. Hol. 1994. Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci* **3**:166-75.
177. Mielcarek, N., A. S. Debrie, D. Raze, J. Bertout, C. Rouanet, A. B. Younes, C. Creusy, J. Engle, W. E. Goldman, and C. Locht. 2006. Live attenuated B. pertussis as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog* **2**:e65.
178. Mills, K. H. 2001. Immunity to Bordetella pertussis. *Microbes Infect* **3**:655-77.
179. Mills, K. H., A. Barnard, J. Watkins, and K. Redhead. 1993. Cell-mediated immunity to Bordetella pertussis: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infect Immun* **61**:399-410.
180. Mills, K. H., and K. Redhead. 1993. Cellular immunity in pertussis. *J Med Microbiol* **39**:163-4.
181. Mills, K. H., M. Ryan, E. Ryan, and B. P. Mahon. 1998. 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* **66**:594-602.
182. Mobberley-Schuman, P. S., B. Connelly, and A. A. Weiss. 2003. Phagocytosis of Bordetella pertussis incubated with convalescent serum. *J Infect Dis* **187**:1646-53.
183. Mooi, F. R. 2009. Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* **10**:36-49.

184. **Mooi, F. R., W. H. Jansen, H. Brunings, H. Gielen, H. G. van der Heide, H. C. Walvoort, and P. A. Guinee.** 1992. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog* **12**:127-35.
185. **Mooi, F. R., V. D. M. NA, and H. E. De Melker.** 2013. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol Infect*:1-10.
186. **Mooi, F. R., I. H. van Loo, and A. J. King.** 2001. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis* **7**:526-8.
187. **Mooi, F. R., I. H. van Loo, M. van Gent, Q. He, M. J. Bart, K. J. Heuvelman, S. C. de Greeff, D. Diavatopoulos, P. Teunis, N. Nagelkerke, and J. Mertsola.** 2009. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* **15**:1206-13.
188. **Mooi, F. R., H. van Oirschot, K. Heuvelman, H. G. van der Heide, W. Gaastra, and R. J. Willems.** 1998. 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* **66**:670-5.
189. **Mossman, K. L., M. F. Mian, N. M. Lauzon, C. L. Gyles, B. Lichty, R. Mackenzie, N. Gill, and A. A. Ashkar.** 2008. Cutting edge: FimH adhesin of type 1 fimbriae is a novel TLR4 ligand. *J Immunol* **181**:6702-6.
190. **Muller, C. P., P. Beauverger, F. Schneider, G. Jung, and N. H. Brons.** 1995. Cholera toxin B stimulates systemic neutralizing antibodies after intranasal co-immunization with measles virus. *J Gen Virol* **76** (Pt 6):1371-80.
191. **Neiryck, S., T. Deroo, X. Saelens, P. Vanlandschoot, W. M. Jou, and W. Fiers.** 1999. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* **5**:1157-63.
192. **Nteyayabo, B., G. De Serres, and B. Duval.** 2003. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect Dis J* **22**:22-7.
193. **Octavia, S., V. Sintchenko, G. L. Gilbert, A. Lawrence, A. D. Keil, G. Hogg, and R. Lan.** 2012. Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying *prn2* and *ptxP3* alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008-2010. *J Infect Dis* **205**:1220-4.
194. **Olin, P., L. Gustafsson, L. Barreto, L. Hessel, T. C. Mast, A. V. Rie, H. Bogaerts, and J. Storsaeter.** 2003. Declining pertussis incidence in Sweden following the introduction of acellular pertussis vaccine. *Vaccine* **21**:2015-21.
195. **Olin, P., F. Rasmussen, L. Gustafsson, H. O. Hallander, and H. Heijbel.** 1997. 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* **350**:1569-77.
196. **Oliveira, M. L., A. P. Areas, and P. L. Ho.** 2007. Intranasal vaccines for protection against respiratory and systemic bacterial infections. *Expert Rev Vaccines* **6**:419-29.
197. **Olivera, N. C., M and Ricardo M Gómez.** 2011. The cholera toxin as a biotechnological tool p. 129-152. *In* S. Gowder (ed.), *Cholera*. Intech.
198. **Otsuka, N., H. J. Han, H. Toyozumi-Ajisaka, Y. Nakamura, Y. Arakawa, K. Shibayama, and K. Kamachi.** 2012. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One* **7**:e31985.
199. **Packard, E. R., R. Parton, J. G. Coote, and N. K. Fry.** 2004. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. *J Med Microbiol* **53**:355-65.
200. **Parkhill, J., M. Sebaihia, A. Preston, L. D. Murphy, N. Thomson, D. E. Harris, M. T. Holden, C. M. Churcher, S. D. Bentley, K. L. Mungall, A. M. Cerdeno-Tarraga, L. Temple, K. James, B. Harris, M. A. Quail, M. Achtman, R. Atkin, S. Baker, D. Basham, N. Bason, I. Cherevach, T. Chillingworth, M. Collins, A. Cronin, P. Davis, J. Doggett, T. Feltwell, A. Goble, N. Hamlin, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, H. Norberczak, S. O'Neil, D. Ormond, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Rutter, M. Sanders, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, L. Unwin, S. Whitehead, B. G. Barrell, and D. J. Maskell.** 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* **35**:32-40.
201. **Pascale, J. M., M. M. Shaw, P. J. Durant, A. A. Amador, M. S. Bartlett, J. W. Smith, R. L. Gregory, and G. L. McLaughlin.** 1999. Intranasal immunization confers protection against murine *Pneumocystis carinii* lung infection. *Infect Immun* **67**:805-9.
202. **Peltola, H., A. Siitonen, H. Kyronseppa, I. Simula, L. Mattila, P. Oksanen, M. J. Kataja, and M. Cadoz.** 1991. Prevention of travellers' diarrhoea by oral B-subunit/whole-cell cholera vaccine. *Lancet* **338**:1285-9.
203. **Peppler, M. S.** 1984. Two physically and serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of *Bordetella pertussis* and their phenotype variants. *Infect Immun* **43**:224-32.
204. **Peppoloni, S., M. Pizza, M. T. De Magistris, A. Bartoloni, and R. Rappuoli.** 1995. Acellular pertussis vaccine composed of genetically inactivated pertussis toxin. *Physiol Chem Phys Med NMR* **27**:355-61.
205. **Pesco, P., P. Bergero, G. Fabricius, and D. Hozbor.** 2013. Assessment of pertussis vaccination strategies using a mathematical model of disease transmission. *Arch Argent Pediatr* **111**:377-83.

206. **Petersen, R. F., T. Dalby, D. M. Dragsted, F. Mooi, and L. Lambertsen.** 2012. Temporal trends in *Bordetella pertussis* populations, Denmark, 1949-2010. *Emerg Infect Dis* **18**:767-74.
207. **Pishko, E. J., D. J. Betting, C. S. Hutter, and E. T. Harvill.** 2003. *Bordetella pertussis* acquires resistance to complement-mediated killing in vivo. *Infect Immun* **71**:4936-42.
208. **Preston, A.** 2005. *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology. *CMAJ* **173**:55-62.
209. **Preston, N. W.** 1985. Essential immunogens in human pertussis: the role of fimbriae. *Dev Biol Stand* **61**:137-41.
210. **Preston, N. W.** 1976. Prevalent serotypes of *Bordetella pertussis* in non-vaccinated communities. *J Hyg (Lond)* **77**:85-91.
211. **Preston, N. W., and E. J. Carter.** 1992. Serotype specificity of vaccine-induced immunity to pertussis. *Commun Dis Rep CDR Rev* **2**:R155-6.
212. **Qadri, F., C. Wenneras, F. Ahmed, M. Asaduzzaman, D. Saha, M. J. Albert, R. B. Sack, and A. Svennerholm.** 2000. Safety and immunogenicity of an oral, inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine in Bangladeshi adults and children. *Vaccine* **18**:2704-12.
213. **Quiding, M., I. Nordstrom, A. Kilander, G. Andersson, L. A. Hanson, J. Holmgren, and C. Czerkinsky.** 1991. Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon-gamma production and evokes local immunological memory. *J Clin Invest* **88**:143-8.
214. **Ramos, C. R., P. A. Abreu, A. L. Nascimento, and P. L. Ho.** 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* **37**:1103-9.
215. **Ramos, H., P. Miyasato, C. Ramos, A. d. M. Arêas, and T. Kawano.** 2010. A Genetic Fusion between Sm14 and CTB does not Reduce *Schistosoma mansoni* Worm Burden on Intranasally Immunized BALB/c Mice. *J Vaccin Vaccinat* **1**.
216. **Reed, S. G., S. Bertholet, R. N. Coler, and M. Friede.** 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* **30**:23-32.
217. **Robinson, A., A. R. Gorringer, S. G. Funnell, and M. Fernandez.** 1989. Serospecific protection of mice against intranasal infection with *Bordetella pertussis*. *Vaccine* **7**:321-4.
218. **Rodgers, L., S. W. Martin, A. Cohn, J. Budd, M. Marcon, A. Terranella, S. Mandal, D. Salamon, A. Leber, M. L. Tondella, K. Tatti, K. Spicer, A. Emanuel, E. Koch, L. McGlone, L. Pawloski, M. Lemaile-Williams, N. Tucker, R. Iyer, T. A. Clark, and M. Diorio.** 2013. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*--Ohio, 2010-2011. *Clin Infect Dis* **56**:322-31.
219. **Rodriguez, M. E., S. M. M. Hellwig, D. F. Hozbor, W. Leusen, L. van der Pol, and J. G. van de Winkel.** 2001. Fc Receptor-Mediated Immunity Against *Bordetella pertussis*. *J Immunol* **167**:6545-6551.
220. **Rolland-Turner, M., G. Farre, D. Muller, N. Rouet, and F. Boue.** 2004. Immunological tools for the assessment of both humoral and cellular immune responses in Foxes (*Vulpes vulpes*) using ovalbumin and cholera toxin B as an antigenic model. *Vaccine* **22**:4163-72.
221. **Rosenthal, R. S., W. Nogami, B. T. Cookson, W. E. Goldman, and W. J. Folkening.** 1987. Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infect Immun* **55**:2117-20.
222. **Ross, P. d. J., C. E. Sutton, S. Higgins, A. C. Allen, K. Walsh, A. Misiak, E. C. Lavelle, R. M. McLoughlin, and K. H. G. Mills.** 2013. Relative Contribution of Th1 and Th17 Cells in Adaptive Immunity to *Bordetella pertussis*: Towards the Rational Design of an Improved Acellular Pertussis Vaccine. *PLoS Pathog* **9**:14.
223. **Ryan, M., G. Murphy, L. Gothefors, L. Nilsson, J. Storsaeter, and K. H. Mills.** 1997. *Bordetella pertussis* respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells. *J Infect Dis* **175**:1246-50.
224. **Sadeghi, H., S. Bregenholt, D. Wegmann, J. S. Petersen, J. Holmgren, and M. Lebens.** 2002. Genetic fusion of human insulin B-chain to the B-subunit of cholera toxin enhances in vitro antigen presentation and induction of bystander suppression in vivo. *Immunology* **106**:237-45.
225. **Sahdev, S., S. K. Khattar, and K. S. Saini.** 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem* **307**:249-64.
226. **Salmond, R. J., J. A. Luross, and N. A. Williams.** 2002. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins. *Expert Rev Mol Med* **4**:1-16.
227. **Sambrook, J., and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*, USA.
228. **Sambrook, J., and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*, USA.
229. **Sanchez, J., and J. Holmgren.** 2011. Cholera toxin - a foe & a friend. *Indian J Med Res* **133**:153-63.
230. **Sanchez, J., and J. Holmgren.** 2008. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell Mol Life Sci* **65**:1347-60.
231. **Sato, Y., K. Izumiya, H. Sato, J. L. Cowell, and C. R. Manclark.** 1980. Aerosol infection of mice with *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **29**:261-6.

232. **Saukkonen, K., C. Cabellos, M. Burroughs, S. Prasad, and E. Tuomanen.** 1991. Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med* **173**:1143-9.
233. **Serra, D. O., G. Lucking, F. Weiland, S. Schulz, A. Gorg, O. M. Yantorno, and M. Ehling-Schulz.** 2008. Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics* **8**:4995-5010.
234. **Shen, X., T. Lagergard, Y. Yang, M. Lindblad, M. Fredriksson, and J. Holmgren.** 2000. Systemic and mucosal immune responses in mice after mucosal immunization with group B streptococcus type III capsular polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccine. *Infect Immun* **68**:5749-55.
235. **Sheridan, S. L., R. S. Ware, K. Grimwood, and S. B. Lambert.** 2012. Number and order of whole cell pertussis vaccines in infancy and disease protection. *JAMA* **308**:454-6.
236. **Shin, J. S., and S. N. Abraham.** 2001. Cell biology. Caveolae--not just craters in the cellular landscape. *Science* **293**:1447-8.
237. **Skelding, K. A., D. K. Hickey, J. C. Horvat, S. Bao, K. G. Roberts, J. M. Finnie, P. M. Hansbro, and K. W. Beagley.** 2006. Comparison of intranasal and transcutaneous immunization for induction of protective immunity against *Chlamydia muridarum* respiratory tract infection. *Vaccine* **24**:355-66.
238. **Song, H., L. Zhou, W. Fang, Y. Li, X. Wang, H. Fang, X. Li, M. Wu, and B. Qiu.** 2004. High-level expression of codon optimized foot-and-mouth disease virus complex epitopes and cholera toxin B subunit chimera in *Hansenula polymorpha*. *Biochem Biophys Res Commun* **315**:235-9.
239. **Spangler, B. D.** 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* **56**:622-47.
240. **Storsaeter, J., H. O. Hallander, L. Gustafsson, and P. Olin.** 1998. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* **16**:1907-16.
241. **Sun, J. B., N. Mielcarek, M. Lakew, J. M. Grzych, A. Capron, J. Holmgren, and C. Czerkinsky.** 1999. Intranasal administration of a *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase-cholera toxoid conjugate vaccine evokes antiparasitic and antipathological immunity in mice. *J Immunol* **163**:1045-52.
242. **Tanaka, M., C. R. Vitek, F. B. Pascual, K. M. Bisgard, J. E. Tate, and T. V. Murphy.** 2003. Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999. *JAMA* **290**:2968-75.
243. **Thatte, J., S. Rath, and V. Bal.** 1995. Analysis of immunization route-related variation in the immune response to heat-killed *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* **63**:99-103.
244. **Thomas, S., A. Preda-Pais, S. Casares, and T. D. Brumeanu.** 2004. Analysis of lipid rafts in T cells. *Mol Immunol* **41**:399-409.
245. **Torre, D., G. Ferrario, G. Bonetta, L. Perversi, and F. Speranza.** 1996. In vitro and in vivo induction of nitric oxide by murine macrophages stimulated with *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **13**:95-9.
246. **Trollfors, B.** 1984. *Bordetella pertussis* whole cell vaccines--efficacy and toxicity. *Acta Paediatr Scand* **73**:417-25.
247. **Tsuji, N., K. Suzuki, H. Kasuga-Aoki, T. Isobe, T. Arakawa, and Y. Matsumoto.** 2003. Mice intranasally immunized with a recombinant 16-kilodalton antigen from roundworm *Ascaris* parasites are protected against larval migration of *Ascaris suum*. *Infect Immun* **71**:5314-23.
248. **Ulrich, B.** 2008. Mucosal vaccination against bacterial respiratory infections. *Expert Rev Vaccines* **7**:1257-1276.
249. **van Gent, M., M. J. Bart, H. G. van der Heide, K. J. Heuvelman, and F. R. Mooi.** 2012. Small mutations in *Bordetella pertussis* are associated with selective sweeps. *PLoS One* **7**:e46407.
250. **van Gent, M., D. Pierard, S. Lauwers, H. G. van der Heide, A. J. King, and F. R. Mooi.** 2007. Characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates that do not express the tracheal colonization factor. *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**:149-54.
251. **Vandebriel, R. J., E. R. Gremmer, J. P. Vermeulen, S. M. Hellwig, J. A. Dormans, P. J. Roholl, and F. R. Mooi.** 2007. Lung pathology and immediate hypersensitivity in a mouse model after vaccination with pertussis vaccines and challenge with *Bordetella pertussis*. *Vaccine* **25**:2346-60.
252. **Vanden Broeck, D., C. Horvath, and M. J. De Wolf.** 2007. *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *Int J Biochem Cell Biol* **39**:1771-5.
253. **Villarino Romero, R., I. Bibova, O. Cerny, B. Vecerek, T. Wald, O. Benada, J. Zavadilova, R. Osicka, and P. Sebo.** 2013. The *Bordetella pertussis* Type III Secretion System Tip Complex Protein Bsp22 Is Not a Protective Antigen and Fails To Elicit Serum Antibody Responses during Infection of Humans and Mice. *Infect Immun* **81**:2761-7.
254. **von Konig, C. H., S. Halperin, M. Riffelmann, and N. Guiso.** 2002. Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis* **2**:744-50.
255. **Walker, M. J., C. A. Guzman, M. Rohde, and K. N. Timmis.** 1991. Production of recombinant *Bordetella pertussis* serotype 2 fimbriae in *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*: utility of *Escherichia coli* gene expression signals. *Infect Immun* **59**:1739-46.

256. **Wang, B. N., Y. Yang, Y. Kuang, K. Cao, M. Y. Li, and W. Y. Li.** 2010. [Construction eukaryotic plasmids of the urel and ctB-urel and profile its' expression in cell]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **26**:764-6.
257. **Wang, L., L. Kedzierski, S. L. Wesselingh, and R. L. Coppel.** 2003. Oral immunization with a recombinant malaria protein induces conformational antibodies and protects mice against lethal malaria. *Infect Immun* **71**:2356-64.
258. **Warfel, J. M., J. Beren, and T. J. Merkel.** 2012. Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* **206**:902-6.
259. **Wendelboe, A. M., A. Van Rie, S. Salmaso, and J. A. Englund.** 2005. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J* **24**:558-61.
260. **Weyant, R. S., D. G. Hollis, R. E. Weaver, M. F. Amin, A. G. Steigerwalt, S. P. O'Connor, A. M. Whitney, M. I. Daneshvar, C. W. Moss, and D. J. Brenner.** 1995. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol* **33**:1-7.
261. **WHO.** 2007. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine.
262. **Wilson, A. D., M. Bailey, N. A. Williams, and C. R. Stokes.** 1991. The in vitro production of cytokines by mucosal lymphocytes immunized by oral administration of keyhole limpet hemocyanin using cholera toxin as an adjuvant. *Eur J Immunol* **21**:2333-9.
263. **Willems, R. J., J. Kamerbeek, C. A. Geuijen, J. Top, H. Gielen, W. Gaastra, and F. R. Mooi.** 1998. The efficacy of a whole cell pertussis vaccine and fimbriae against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections in a respiratory mouse model. *Vaccine* **16**:410-6.
264. **Winter, K., K. Harriman, J. Zipprich, R. Schechter, J. Talarico, J. Watt, and G. Chavez.** 2012. California pertussis epidemic, 2010. *J Pediatr* **161**:1091-6.
265. **Wirsing von Konig, C. H., and M. Riffelman.** 2007. Pertussis: an old disease in new clothes. *Euro Surveill* **12**:E1-2.
266. **Wolfe, D. N., G. S. Kirimanjesswara, E. M. Goebel, and E. T. Harvill.** 2007. Comparative role of immunoglobulin A in protective immunity against the *Bordetellae*. *Infect Immun* **75**:4416-22.
267. **Wood, N., and P. McIntyre.** 2008. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev* **9**:201-11; quiz 211-2.
268. **Woof, J. M., and M. A. Kerr.** 2006. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* **208**:270-82.
269. **Xing, D. K., R. G. Das, L. Williams, C. Canthaboo, J. Tremmil, and M. J. Corbel.** 1999. An aerosol challenge model of *Bordetella pertussis* infection as a potential bioassay for acellular pertussis vaccines. *Vaccine* **17**:565-76.
270. **Xu, Y., Y. Wang, Y. Tan, H. Zhang, L. Wu, L. Wang, Q. Hou, and S. Zhang.** 2009. Production and characterization of recombinant pertactin, fimbriae 2 and fimbriae 3 from *Bordetella pertussis*. *BMC Microbiol* **9**:274.
271. **Yang, P., C. Tang, D. Luo, Z. Zhan, L. Xing, Y. Duan, W. Jia, D. Peng, X. Liu, and X. Wang.** 2010. Cross-clade protection against HPAI H5N1 influenza virus challenge in BALB/c mice intranasally administered adjuvant-combined influenza vaccine. *Vet Microbiol* **146**:17-23.
272. **Yih, W. K., E. A. Silva, J. Ida, N. Harrington, S. M. Lett, and H. George.** 1999. *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Infect Dis* **5**:441-3.
273. **Yu, J. J., and S. L. Gaffen.** 2008. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci* **13**:170-7.
274. **Yuk, M. H., E. T. Harvill, P. A. Cotter, and J. F. Miller.** 2000. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol* **35**:991-1004.
275. **Yuk, M. H., E. T. Harvill, and J. F. Miller.** 1998. The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol* **28**:945-59.
276. **Zackrisson, G., T. Lagergard, and B. Trollfors.** 1989. Subclass compositions of immunoglobulin G to pertussis toxin in patients with whooping cough, in healthy individuals, and in recipients of a pertussis toxoid vaccine. *J Clin Microbiol* **27**:1567-71.
277. **Zepp, F., U. Heininger, J. Mertsola, E. Bernatowska, N. Guiso, J. Roord, A. E. Tozzi, and P. Van Damme.** 2011. Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe. *Lancet Infect Dis* **11**:557-70.
278. **Zepp, F., M. Knuf, P. Habermehl, H. J. Schmitt, C. Meyer, R. Clemens, and M. Slaoui.** 1997. Cell-mediated immunity after pertussis vaccination and after natural infection. *Dev Biol Stand* **89**:307-14.
279. **Zorzeto, T. Q., H. G. Higashi, M. T. da Silva, F. Carniel Ede, W. O. Dias, V. D. Ramalho, T. N. Mazzola, S. C. Lima, A. M. Morcillo, M. A. Stephano, M. A. Antonio, L. Zanolli Mde, I. Raw, and M. M. Vilela.** 2009. Immunogenicity of a whole-cell pertussis vaccine with low lipopolysaccharide content in infants. *Clin Vaccine Immunol* **16**:544-50.
280. **Zurita, E., G. Moreno, A. Errea, M. Ormazabal, M. Rumbo, and D. Hozbor.** 2013. The stimulated innate resistance event in *Bordetella pertussis* infection is dependent on reactive oxygen species production. *Infect Immun* **81**:2371-8.



Lesson learned and the wheels keep turning...

