

Universidad Austral de Chile

**Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica**

**Profesor patrocinante: Dr. Alejandro Venegas
Depto. de Genética Molecular y Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile.**

**Profesor copatrocinante: Dra. Gloria León
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile.**

**EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS TBPB Y PORA DE *Neisseria meningitidis* EN LA
CEPA VACUNA *Salmonella entérica* serovar Typhimurium χ 4550 Y EVALUACIÓN
DE RESPUESTA INMUNE EN RATONES VACUNADOS ORALMENTE.**

**Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y al Título
profesional de Bioquímico.**

ANA ISABEL CANALES SOTO

**VALDIVIA - CHILE
Marzo de 2004**

Dedicado con mucho cariño, alma y corazón, a papá, mamá y hermano Jorge:

“Uds me dieron la vida, la fuerza y el apoyo para lograr ser una persona completa y feliz, gracias por darme buenos consejos y ánimo para estar con la frente en alto siempre y en todo momento”.

AGRADECIMIENTOS

Sinceramente mi profunda gratitud a mi director de tesis, Dr. Alejandro Venegas, por sus enseñanzas, orientación y por darme la grata oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Agradezco a todos los profesores de mi universidad, por darme la valiosa formación y enseñanzas que a lo largo de estos años me han permitido crecer como persona y valorar esta profesión.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, por su cálida acogida, sincera amistad y apoyo constante frente a la adversidad que se presenta a veces; Elsa, Verónica, Claudia, Alejandra, María Inés, Patricio, José Luis y Johanna.

A mis amigas de toda la vida; Carolina , Liliana y Kattina, gracias por su apoyo y gratos momentos compartidos, y por ser mujeres triunfadoras.

Por último, agradecer el financiamiento de esta tesis; al Fondo de Ciencia y Tecnología, Fondecyt 1000730 y al Fondo para la Formación Científica y Desarrollo Tecnológico, Fondef D02I-1067.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
INDICE DE CONTENIDOS	i
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE TABLAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCION	3
2.1. Información general.	3
2.2. Proteínas de membrana externa PorA (OMP1).	6
2.3. Subunidad menor (TbpB) del complejo responsable de la unión de transferrina.	7
2.4. Diseño de vacunas.	8
2.5. Inmunidad mucosal.	10
2.6. Mutantes atenuados de <i>Salmonella</i> como cepas vacuna.	11
2.7. Hipótesis.	15
2.8. Objetivos.	15
2.8.1. Objetivo general	15
2.8.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIALES Y METODOS	17
3.1. Materiales.	17
3.1.1. Material biológico.	17
3.1.1.1. Cepas bacterianas	17

3.1.1.2. Animales de experimentación.	18
3.1.1.3. Vectores y plásmidos.	18
3.1.2. Reactivos.	18
3.1.3. Medios de cultivo y soluciones.	20
3.1.4. Antibióticos.	22
3.2. Métodos.	23
3.2.1. Almacenamiento y cultivo de las cepas bacterianas.	23
3.2.2. Purificación de plásmidos recombinantes.	23
3.2.2.1. Escala analítica (minipreparación).	23
3.2.3. Reacción de amplificación de DNA por PCR.	23
3.2.3.1. Amplificación del gen <i>asd</i> de <i>E.coli</i> K-12.	24
3.2.3.2. Amplificación de los genes <i>tbpB</i> y <i>porA</i> de <i>N. meningitidis</i> .	24
3.2.3.3. Diseño de oligonucleótidos utilizados como partidores.	24
3.2.4. Digestión de DNA con enzimas de restricción.	26
3.2.4.1. Digestión analítica.	26
3.2.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	26
3.2.5.1. Visualización de DNA.	27
3.2.5.2. Determinación de la concentración de DNA.	27
3.2.6. Transformación bacteriana con DNA plasmidial.	27
3.2.6.1. Transformación usando cloruro de calcio.	27
3.2.6.2. Transformación por electroporación.	29
3.2.6.3. Transformación con dos plásmidos.	31

3.2.7. Estudios de expresión de los clones recombinantes.	31
3.2.7.1. Ensayos de expresión bajo el control de promotores inducibles por IPTG.	31
3.2.7.2. Ensayos de expresión usando el sistema dual.	32
3.2.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes.	33
3.2.9. Western blot.	34
3.2.9.1. Transferencia a nitrocelulosa.	34
3.2.9.2. Reacción antígeno-anticuerpo.	35
3.2.10. Purificación de proteínas por electroelución.	36
3.2.10.1. Determinación de la concentración de proteínas.	36
3.2.11. Recuento de células viables de <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium χ4550 (cepa vacuna) con los plásmidos recombinantes.	37
3.2.12. Inmunización de ratones BALB/c con <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium χ4550 que expresa antígenos de <i>N. meningitidis</i>.	37
3.2.12.1. Preparación de la suspensión bacteriana.	37
3.2.12.2. Inmunización oral.	38
3.2.12.3. Colección y preparación de muestras de los ratones inmunizados.	38
3.2.13. Cuantificación de la respuesta de anticuerpos por ELISA.	39
3.2.14. Ensayos bactericidas de los anticuerpos anti-PorA y anti-TbpB séricos de ratones inmunizados.	40

4. RESULTADOS.	43
4.1. Selección de clones plasmidiales con los genes de <i>porA</i> y <i>tbpB</i> de <i>N. meningitidis</i>.	43
4.1.1. Análisis plasmidial de los clones disponibles.	43
4.2. Transferencia a <i>E. coli</i> χ6212 de los plásmidos portadores de los insertos que codifican para los antígenos TbpB y PorA de <i>N. meningitidis</i>.	49
4.3. Transferencia de los plásmidos a <i>Salmonella entérica</i> serovar Typhimurium χ3730.	49
4.4. Transferencia de los plásmidos que codifican PorA y TbpB de <i>N. meningitidis</i> de la cepa <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium χ3730 .	54
4.5. Purificación de las proteínas PorA y TbpB de <i>N. meningitidis</i> por electroelución de geles de poliacrilamida.	57
4.6. Inmunización de ratones BALB/c con la cepa vacuna que expresa ya sea el antígeno PorA o TbpB de <i>N. meningitidis</i> y evaluación de los niveles de anticuerpos.	57
4.7. Análisis de la respuesta de anticuerpos séricos IgG de ratones BALB/c previamente inmunizados con la cepa vacuna que expresa los antígenos TbpB o PorA de <i>N. meningitidis</i>.	63
4.7.1. Respuesta humoral anti-TbpB.	63
4.7.2. Respuesta humoral anti-PorA.	63

4.8. Análisis de la respuesta de IgA a nivel de mucosas en ratones BALB/c inmunizados oralmente con la cepa vacuna que expresa los antígenos TbpB o PorA de <i>N. meningitidis</i>.	64
4.8.1. Respuesta de IgA anti-TbpB en secreciones mucosas.	64
4.8.2. Respuesta de IgA anti-PorA en secreciones mucosas.	65
4.9. Ensayo de actividad bactericida de los anticuerpos anti-PorA y anti-TbpB del suero de ratones inmunizados.	65
5. DISCUSION.	68
5.1. Expresión de las proteínas TbpB y PorA en <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium.	69
5.2. Sistema de expresión en <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium.	71
5.3. Inducción de anticuerpos anti-TbpB y anti-PorA en ratones BALB/c inmunizados con la cepa vacuna <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium χ4550.	75
5.3.1. Inducción de anticuerpos anti-TbpB.	75
5.3.2. Inducción de anticuerpos anti-PorA.	76
5.4. Respuesta bactericida de los anticuerpos meningococales inducidos en ratón.	78
5.5. Proyecciones del uso de <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium como vector vacuna oral viva.	80
5.6. Conclusiones de la tesis.	83
6. BIBLIOGRAFIA.	84
APENDICE.	92

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Análisis plasmidial de los clones transformantes en la cepa <i>E. coli</i> DH ₅ α con los genes <i>porA</i> y <i>tbpB</i> en estudio y selección de los clones positivos para su uso posterior.	44
FIGURA 2. Amplificación por PCR del gen <i>asd</i> , en los clones 7 y 10 de <i>tbpB</i> y clones 10 y 12 de <i>porA</i> , utilizando los partidores ASDEC1 y ASDEC2, a partir de DNA plasmidial de los clones mencionados.	46
FIGURA 3. Amplificación por PCR del gen <i>tbpB</i> , utilizando los partidores TBPB-1 y TBPB-1.3, a partir de DNA plasmidial de los clones 7 y 10.	47
FIGURA 4. Amplificación por PCR del gen <i>porA</i> , utilizando los partidores NMCPS-3 y NMSPS-2, a partir de DNA plasmidial de los clones 10 y 12.	48
FIGURA 5. Detección simultánea de plásmidos en los transformantes <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium χ3730 con los sistemas duales letal balanceado pET- <i>tbpB</i> _{B4NT} <i>asd</i> /pGP1-2 y pET- <i>porA</i> _{B15:P1.3} <i>asd</i> /pGP1-2.	51
FIGURA 6. Expresión del antígeno PorA de <i>N. meningitidis</i> B15:P1.3, mediante el sistema dual letal balanceado en lisados de <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium χ3730, determinada por Western blot.	52

- FIGURA 7.** Expresión del antígeno TbpB de *N. meningitidis* B4:NT mediante el sistema dual letal balanceado en lisados de *S. entérica* serovar Typhimurium χ 3730, determinada por Western blot. 53
- FIGURA 8.** Expresión del antígeno PorA de *N. meningitidis* B15:P1.3, mediante el sistema dual letal balanceado en lisados de 5 transformantes de la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550, determinada por Western blot. 55
- FIGURA 9.** Expresión del antígeno TbpB de *N. meningitidis* B4:NT mediante el sistema dual letal balanceado en lisados de 5 transformantes de la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550, determinada por Western blot. 56
- FIGURA 10.** Respuesta sérica de IgG medida por ELISA luego de inmunización oral de ratones BALB/c con la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 que lleva el antígeno TbpB_{B4:NT} o el antígeno PorA_{B15:P1.3} de *N. meningitidis*. 60
- FIGURA 11.** Respuesta del tipo IgA en heces luego de inmunización oral de ratones BALB/c con la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 que lleva los antígenos TbpB_{B4:NT} o el antígeno PorA_{B15:P1.3} de *N. meningitidis*. 61
- FIGURA 12.** Títulos de las respuestas de IgG sérica (A) e IgA fecal (B) inducidas por inmunización oral con los antígenos TbpB_{B4:NT} o el antígeno PorA_{B15:P1.3} de *N. meningitidis*. 62

FIGURA Ap1. Mapa físico del plásmido pET21a.	92
FIGURA Ap2. Mapa físico del plásmido pGP1-2.	93
FIGURA Ap3. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen <i>tbpB</i> cepa <i>N. meningitidis</i> B4:NT.	94
FIGURA Ap4. Secuencia nucleotídica del gen <i>porA</i> cepa <i>N. meningitidis</i> B15:P1.3.	98
FIGURA Ap5. Esquema del sistema de expresión plasmidial dual letal balanceado, utilizado en <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium.	99
FIGURA Ap6. Esquema del ensayo bactericida cepa <i>N. meningitidis</i> serogrupos B15:P1.3 y B4:NT.	100

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Protocolo de inmunización de ratones BALB/c con las construcciones que expresan los antígenos PorA y TbpB de <i>N. meningitidis</i> en la cepa vacuna <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium χ 4550.	59
TABLA 2. Valores de los títulos obtenidos en los ensayos bactericidas con los sueros de ratones inmunizados con la cepa vacuna expresa los genes <i>porA</i> _{B15:P1.3} y aquella que expresa <i>tbpB</i> _{B4:NT} en <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium χ 4550 frente a <i>N. meningitidis</i> (serogrupos B15:P1.3 y B4:NT).	67

ABREVIATURAS

Aa	Amino ácido.
Amp	Ampicilina.
<i>Asd</i>	Gen que codifica la aspartato semialdehido deshidrogenasa de <i>E. coli</i> .
ATP	Adenosina trifosfato.
Br-Et	Bromuro de etidio.
BSA	Seroalbúmina de bovino.
C	Capacitancia.
Ci	Curie.
cm	centímetro.
<i>crp</i>	Gen que codifica la proteína receptora de AMP cíclico.
<i>cya</i>	Gen que codifica la adenilato ciclasa.
Da	Dalton.
DAP	Acido DL- α - ϵ -diaminopimérico.
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
D.O. _{600nm}	Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nanómetros.
E	Campo eléctrico.
EDTA	Acido etilendiaminotetracético.
F	Faradio.
g	Gramo.
GALT	Tejido linfático asociado al intestino.

hr	Horas.
IAA	Alcohol isoamílico.
IFN- γ	Interferón- γ .
IgG	Inmunoglobulina G.
IgA	Inmunoglobulina A.
IL-2	Interleuquina 2.
IL-4	Interleuquina 4.
IL-10	Interleuquina 10.
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido.
Kan	Kanamicina.
kb	Kilobase.
kDa	Kilodalton.
kV	Kilovolt.
λ - <i>Hind</i> III	DNA del fago lambda digerido con <i>Hind</i> III.
LPS	Lipopolisacárido.
MALT	Tejido linfoide asociado a la mucosa.
Mabs	Anticuerpos monoclonales.
Mb	Megabases
mA	Miliamper.
mM	Milimolar.
mmol	Milimol.
min	Minuto.
ml	Mililitro.

mRNA	RNA mensajero.
mseg	Milisegundo.
NALT	Tejido linforetico asociado a las vías nasales
nm	Nanómetro.
ng	Nanógramo.
Ω	Ohm.
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
pb	Pares de bases.
PBS 1X	Na ₂ HPO ₄ 10mM; KH ₂ PO ₄ 1,5 mM; KCL 2,7 Mm; NaCl 136 mM; pH 7,4 (Tampón Fosfato Salino).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PM	Peso molecular.
pmol	Picomol.
PSA	Persulfato de amonio.
RNA	Acido ribonucleico.
RNasa	Ribonucleasa.
rpm	Revoluciones por minuto.
R	Resistencia.
seg	Segundo.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
Taq pol	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> .
TEMED	N,N,N,N'- tetrametiletilendiamina.
Th 1	Células T "helper" 1 (subpoblación de linfocitos T).

Th 2	Células T “helper” 2 (subpoblación de linfocitos T).
Tris-HCl	Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano.
Tween 20	Polietilen sorbitano monolaurato.
U	Unidad enzimática.
μCi	MicroCurie.
μF	Microfaradio.
μL	Microlitro.
V	Volt.

RESUMEN

Neisseria meningitidis es el principal agente etiológico de la meningitis a nivel mundial y nacional. La falta de una vacuna apropiada contra el meningococo tipo B ha impulsado el estudio de proteínas, con la finalidad de obtener una vacuna eficiente. Entre éstas, se escogió TbpB y PorA, ya que ambas inducen anticuerpos bactericidas.

Existe amplia información sobre utilización de cepas atenuadas de *Salmonella* para inducir una respuesta inmune eficiente contra antígenos heterólogos recombinantes, generando respuestas celular y humoral, deseables en una vacuna oral viva. Nuestro interés radicó en expresar los antígenos TbpB y PorA en la cepa vacuna *Salmonella typhimurium* χ 4550, con la finalidad de evaluar, en un modelo murino, la utilidad de éstos para el desarrollo de una vacuna oral viva contra *N. meningitidis*. Para la expresión de los genes heterólogos en *Salmonella* se utilizó un sistema plasmidial dual letal balanceado.

La expresión de los antígenos foráneos en cultivos de *Salmonella* se demostró por Western blot. Se seleccionaron los clones recombinantes más eficientes de *S. typhimurium* χ 4550 y con ellos se inmunizaron ratones BALB/c por vía oral. Se tomaron muestras de sangre, heces y saliva y se determinó, mediante ELISA, los niveles séricos de IgG e IgA en heces y saliva. Estos estudios también fueron útiles para estimar la eficiencia de colonización de órganos por la cepa vacuna. Finalmente, se realizaron ensayos bactericidas utilizando sueros de los ratones inmunizados demostrándose la existencia de una actividad significativa. Los datos sugieren que TbpB puede ser mejor antígeno que PorA, para el desarrollo de una vacuna oral viva contra *N. meningitidis* al considerar su potencial en la inducción de anticuerpos bactericidas.

SUMMARY

N. meningitidis is the main etiological agent causing meningitis locally and worldwide. Since an appropriate vaccine against meningococcus B is not available, research has been focused on proteins with immuno-protective properties, with the purpose of designing an efficient vaccine. Among these proteins we selected TbpB and PorA, since both induce bactericidal antibodies when applied intraperitoneally.

Extensive *Salmonella* literature supports the use of attenuated strains to induce an efficient immune response when recombinant antigens are expressed, generating cellular and humoral responses, both desirables in oral live vaccine. Thus, we expressed the TbpB and PorA antigens in the vaccine strain *Salmonella typhimurium* χ 4550, and evaluated, on a murine model, the immuno-protective capabilities of these antigens for the development of an oral live vaccine against *N. meningitidis*. Antigen expression was obtained using a dual plasmid lethal balanced system.

The expression of the antigens was demonstrated by Western blot, and the clones with higher expression were selected and used for immunization of BALB/c mice by oral via. Blood, feces and saliva samples were taken, and the level of IgG in the sera and IgA in feces and saliva were determined by means of ELISA. Also, these studies were useful to estimate the organ colonization efficiency of the vaccine strain. In addition, bactericidal tests were carried out using sera from immunized mice and a significant activity against *N. meningitidis* was detected. According to the results, based on the bactericidal activities it is suggested that TbpB can be a better candidate than PorA for its use in the development of an oral live vaccine against *N. meningitidis*.

2. INTRODUCCION

2.1 Información general.

La meningitis corresponde a la inflamación de las membranas que rodean y protegen al sistema nervioso central. Las secuelas de esta enfermedad debido al daño cerebral varían desde pequeñas alteraciones a severas disfunciones, sin dejar de lado un importante índice de mortalidad.

Se conoce una variada gama de agentes etiológicos responsables de este cuadro. Entre los agentes bacterianos más importantes se encuentran *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*. Esta última bacteria puede causar bacteremia, meningitis, o septicemia fulminante en una proporción pequeña de portadores, con elevadas tasas de mortalidad y morbilidad, debido principalmente a que es el único agente etiológico capaz de llevar esta patología a niveles epidémicos.

A nivel nacional representa anualmente más de 300 casos, presentando un índice de mortalidad similar, incluso a veces superior a la tasa mundial (Castillo *et al.*, 1994).

N. meningitidis es un diplococo aerobio Gram negativo y parásito humano exclusivo. Forma parte de la flora bacteriana normal en las mucosas de la nasofaringe, detectándose su presencia entre un 5 a 10% de la población sana, con la más alta frecuencia de portadores en adolescentes y adultos jóvenes. Su medio de ingreso es a través de las vías aéreas altas. La bacteria induce la patogenia al colonizar las meninges y el líquido céfalo-raquídeo. Ya instalada en ese ambiente, el microorganismo inicia un crecimiento que no puede ser controlado por la respuesta inmune y su

erradicación se ve dificultada por el acceso restringido de los antimicrobianos a las regiones colonizadas y por los mecanismos de patogenicidad que posee. Esto último se explica en parte por la gran variabilidad genética de esta especie, describiéndose cepas prevalentes en ciertas regiones en el mundo.

Los distintos serogrupos de *N. meningitidis* (13 a la fecha) se clasifican de acuerdo a la variación serológica del polisacárido capsular, y en este contexto el 90% de los casos de enfermedad meningococal se deben a los serogrupos A, B y C, mientras que los casos restantes son causados principalmente por los serogrupos W-135 e Y. La serotipificación se refiere al reconocimiento de determinados epítomos o regiones variables (VRs) de la proteína de membrana externa clase 1 Omp1 (también denominada PorA) y la subtipificación se refiere a la presencia mutuamente excluyente de las proteínas OMP 2 u OMP3 en la membrana externa (Hart y Rogers, 1993; Tappero J. *et al.*, 1999). Así, una bacteria clasificada como B:15:P1.3, indica serogrupo B, serotipo 15 y subtipo P1.3. Este sistema de clasificación, basado en la reactividad frente a anticuerpos monoclonales (Mabs), tiene sus limitaciones ya que existen cepas, llamadas no tipificables, para cuyos tipos y subtipos no existe aún un monoclonal reactivo. De hecho, en Chile están tomando importancia epidemiológica varias cepas no tipificables como las B:4:NT y B:NT:NT, entre otras. Según registros recientes del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) en muestras de líquido cefaloraquídeo de niños menores de 15 años, las cepas tipificadas como B15:P1.3 en el año 2001 fueron un 53% y B4:NT (2,22%), de un total de 180 casos registrados, Comparativamente, en el año 2002 se registró un 41,6% para B15:P1.3, y un 5.6% para B4:NT, de un total de 125 casos registrados de *N. meningitidis*.

Actualmente, se cuenta con vacunas capsulares tetravalentes de eficacia razonable, basadas en mezcla de extractos de cápsula, provenientes de los serogrupos A, C, W-135, e Y (Reingold *et al.*, 1985; Rosenstein *et al.*, 1998). Pero, con respecto al meningococo serogrupo B, no existe vacuna disponible, ya que este polisacárido es poco inmunogénico en humanos, por lo que es ineficaz para inducir una respuesta inmune protectora en seres humanos de cualquier edad. Esto se explica debido a que la cápsula de *N. meningitidis* del grupo B, contiene un homopolímero del ácido $\alpha(2-8)$ N-acetil-neuroamínico, de composición química similar a las cadenas cortas del ácido neuroamínico que se encuentra en distintas glicoproteínas presentes durante el desarrollo embrionario humano (Finne *et al.*, 1983; Azmi *et al.*, 1995). Esta similitud estructural explicaría la escasa respuesta inmune contra este grupo, ya que probablemente los clones de linfocitos capaces de responder frente al polisacárido del grupo B desaparecen del organismo por la selección clonal negativa (Von Boehmer y Kisielow, 1990).). Dados los antecedentes antes comentados es de especial interés el diseño y obtención de una vacuna eficaz contra el serogrupo B de este patógeno.

Los resultados antes mencionados han llevado al estudio de proteínas de membrana externa (OMPs) de *N. meningitidis*, para evaluar su capacidad de inducir una respuesta antigénica de carácter bactericida. Se han realizado distintas experiencias con vacunas de diverso diseño y composición, ninguna de las cuales ha demostrado ser eficaz ya sea por la insuficiente cobertura sobre la población general, o escasa protección en niños menores de cinco años, grupo sensible a la enfermedad (Bjune *et al.*, 1991; Rosenqvist *et al.*, 1991; Sierra *et al.*, 1991; Zollinger *et al.*, 1991; De Moraes *et al.*, 1992).

El interés de esta tesis se ha centrado en el uso de las OMPs (TbpB y PorA) como antígenos a expresar en una vacuna oral viva y cuyas características se discuten a continuación.

2.2. Proteína de membrana externa PorA (Omp1).

Es uno de los constituyentes mayoritarios de la membrana externa de *N. meningitidis*, con un peso molecular de 42 kDa, siendo capaz de formar un poro hidrofílico para el paso de moléculas catiónicas de pequeño tamaño. Se presenta organizada en trímeros, con una conformación de hoja β -plegada. Su estructura secundaria se representa con 8 asas externas, de las cuales, la #1 y la # 4 poseen una alta variabilidad de secuencia aminoacídica (y por definición corresponden a las regiones variables VR1 y VR2).

Las regiones expuestas de PorA de *N. meningitidis* correspondientes a las regiones variables VR1 y VR2 son reconocidas por algunos de los anticuerpos monoclonales utilizados en la subtipificación de las cepas.

PorA es capaz de inducir una fuerte respuesta inmunológica en humanos (Poolman *et al.*, 1983; Frasch *et al.*, 1985) y se ha demostrado que la respuesta inmune humoral inducida por esta proteína en ratones infantiles presenta un carácter bactericida aún mayor que los inducidos por el LPS y las OMPs clase 2 y 3 (Saukkonen *et al.*, 1987).

Así, PorA ha sido considerada en la mayoría de los diseños de vacunas, siendo atractiva como componente para el uso como antígeno heterólogo a expresar en una vacuna viva de *Salmonella entérica*.

2.3. Subunidad menor (TbpB) del complejo responsable de la unión de transferrina.

El hierro es un requerimiento esencial para todos los organismos y en particular para la expresión de virulencia de los microorganismos patógenos. Consecuentemente, la capacidad del patógeno para capturar la transferrina circulante en el hospedero y secuestrar el hierro de esta fuente constituye una ventaja para la colonización bacteriana. Los niveles de hierro libre son limitados en el suero humano, por la unión no-covalente de éste a transferrina, siendo la adquisición del hierro de ésta coincidente con la patogenicidad de *N. meningitidis* (Boulton *et al.*, 1999).

La proteína que une transferrina es un complejo formado por la asociación estrecha de las subunidades TbpA (98 kDa) y TbpB (rango entre 65-90 kDa). Este receptor se encarga de la captación de transferrina, induciendo cambios conformacionales en ella, provocando la liberación del hierro, el cual es incorporado a la bacteria (Pintor *et al.*, 1993). Esta proteína ha centrado la atención de muchos investigadores y ha generado varios estudios sobre su capacidad inmunogénica (Ala`Aldeen *et al.*, 1996).

TbpA posee una estructura tipo porina conformada por hojas β -plegada, TbpB parece estar anclada más débilmente a la membrana externa, sin presentar estructuras de transmembrana. Esta asociación heterodimérica es la responsable de la formación de un complejo proteico eficiente para la captación de transferrina y del hierro, una vez que el patógeno ha entrado al torrente sanguíneo, pasando a condiciones de crecimiento anaeróbicas.

Se han detectado anticuerpos en sueros de pacientes con buena respuesta inmunológica contra TbpB, pero escasa o nula contra TbpA (Ala`Aldeen *et al.*, 1994). Según mediciones en conejos y ratones, TbpB sería responsable del efecto protector de los anticuerpos dirigidos al complejo (Lissolo *et al.*, 1995). La obtención reciente de mutantes para cada una de las proteínas, confiere una mayor importancia para TbpB en la fisiología bacteriana, siendo indispensable para la supervivencia del patógeno (Pintor *et al.*, 1998).

Todos estos antecedentes señalan a TbpB como uno de los más seguros candidatos para el desarrollo de una vacuna contra meningitis.

2.4. Diseño de vacunas.

Se han utilizado como antígenos mezclas que contienen componentes externos derivados de la cápsula y mezclas de OMPs y otras proteínas de elevado peso molecular. Es el caso de los modelos de la vacuna cubana y la vacuna estadounidense, las cuales han sido probadas, en el norte de Chile (Zollinger *et al.*, 1991), Cuba (Sierra *et al.*, 1991) y Brasil (De Moraes *et al.*, 1992). No se han obtenido buenos resultados debido a una protección insuficiente. Un enfoque diferente es el diseño de la vacuna noruega, que utiliza vesículas de membrana externa (OMVs) (Bjune *et al.*, 1991; Rosenqvist *et al.*, 1991). Esta vacuna genera una respuesta inmune de escasa reacción cruzada.

Estas vacunas se basan en las cepas predominantes en un determinado país, y por ello pueden ofrecer escasa protección contra las cepas prevalentes en otro, como se demostró con el uso de la vacuna cubana en Brasil (De Moraes *et al.*, 1992). Por

esto, es de suma importancia considerar en el desarrollo de una vacuna, el uso de antígenos obtenidos a partir de cepas locales características. Otra alternativa es la detección de antígenos que corresponden a estructuras conservadas en las distintas cepas de *N. meningitidis* para el desarrollo de una vacuna de uso universal.

Un diseño atractivo de vacuna es la utilización de bacterias vivas atenuadas como vectores de vacunación oral, recurriendo a cepas atenuadas de *Salmonella* como presentadora de antígenos heterólogos. Este enfoque ha sido considerado en el último tiempo (Hopkins *et al.*, 1995; Fagan *et al.*, 1997; García de la Guarda, 1998). Estas cepas vacunas, han generado respuesta inmune tanto contra sus propios componentes, como contra los antígenos heterólogos que portan, inclusive al utilizar vías de administración distintas de la gastrointestinal (Hopkins *et al.*, 1995). Los antígenos han sido clonados en vectores de expresión del tipo plasmidial, los cuales han sido incorporados y mantenidos en la cepa portadora por medio de marcadores metabólicos (Galán *et al.*, 1990; Cárdenas y Clements, 1993).

Una vez desarrolladas estas vacunas, se obtendría una ventaja desde el punto de vista de control epidemiológico, como también desde el punto de vista económico, aspectos relacionados con las ventajas proporcionadas por su producción masiva, distribución y almacenaje.

2.5. Inmunidad mucosal.

Las superficies mucosales son los sitios primarios de interacción entre el organismo y el medio ambiente, y se protegen de los patógenos por mecanismos no específicos, tales como la producción de mucus, el cual forma una barrera física, y sustancias tales como lisozima, lactoferrina y lactoperoxidasa, el cual mata o inhibe la replicación de los micro-organismos. El tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) protege a la mucosa de agresiones exógenas discriminando a los antígenos dañinos, microorganismos comensales y a los patógenos peligrosos. La respuesta inmune mucosal generalmente se inicia en sitios inductivos mucosales tal como las placas de Peyer, en el tejido linfoide gastrointestinal (GALT) y en sitios equivalentes en el tejido linfocítico asociado a la vía nasal (NALT) en la cavidad orofaríngea. La inducción de mecanismos inmunes locales específicos del MALT se realiza en forma efectiva con la aplicación directa de una vacuna a las superficies mucosales, obteniendo una respuesta inmune celular y/o humoral (Dietrich *et al.*, 2003).

El exitoso inicio de una inmunización mucosal ha sido identificado según Cripps *et al.*, (2001) bajo los siguientes criterios: 1) Efectiva entrega del antígeno al sitio de inducción. 2) Intensificación de la respuesta inmune mucosal por el uso de cepas vacunas vivas atenuadas, sistema de entrega de antígenos mejorada, o inmunomoduladores de la respuesta mucosal tales como enterotoxinas bacterianas y citoquinas, y (3) Opción de una ruta de inmunización apropiada para inducir respuesta protectora en el sitio mucosal deseado y preferentemente sistémico.

2.6. Mutantes atenuados de *Salmonella* como cepas vacuna.

Con el fin de seleccionar la respuesta inmune más eficaz, se han desarrollado distintas vacunas para la administración oral. Estas incluyen vacunas bacterianas contra el cólera, la fiebre tifoidea y vacunas virales contra la polio y más recientemente, contra el rotavirus (Barnes *et al.*, 2002). De especial interés son las vacunas orales vivas contra patógenos bacterianos entéricos. Estas vacunas imitan la infección natural y la capacidad que tienen de propagarse y colonizar el intestino permitiéndoles permanecer allí por un tiempo prolongado. La ruta oral de administración permite la introducción directa de antígenos a sitios inductivos del GALT y además produce respuesta inmune humoral local y sistémica. Las ventajas de las vacunas vivas atenuadas incluyen la marcada expresión de antígenos, los cuales son únicamente producidos bajo condiciones *in vivo* y las propiedades de expresión dependen fuertemente de encontrar un balance adecuado entre la atenuación de la bacteria y su inmunogenicidad para producir una vacuna eficaz y segura. Por estas razones, muy pocas vacunas orales vivas están actualmente registradas para su comercialización.

Cepas atenuadas de *Salmonella entérica* han resultado ser eficientes vectores bacterianos vivos que inducen una fuerte inmunidad mucosal, humoral y celular (Emoto *et al.*, 1992; Tacket *et al.*, 1997). La eficacia de estas cepas como vacunas eficientes en niños y adultos fue demostrada inicialmente usando una cepa químicamente mutagenizada denominada *Salmonella entérica* serovar Typhi Ty21a (Germanier, 1984; Wahdam *et al.*, 1984). Esta cepa fue desarrollada en los '70 proveniente de la cepa *S. entérica* serovar Typhi Ty2. Las mutaciones incluyen, entre varias otras, una inactivación del gen *galE* (el cual codifica UDP-galactosa-4-epimerasa, involucrada en

la síntesis del lipopolisacárido) y la incapacidad de expresar el polisacárido Vi. Mientras no todas las mutaciones son responsables de la atenuación, el fenotipo atenuado está caracterizado, lo que hace a Ty21a segura y bien tolerada (Levine *et al*, 1990). Sin embargo, la posibilidad de obtener revertantes virulentos de esta cepa a causa de la existencia de mutaciones puntuales ha limitado su aplicación.

La cepa vacuna *Salmonella entérica* serovar Typhi Ty21a se encuentra disponible en dos formas comerciales, como vacuna liofilizada en cápsulas recubiertas resistentes a la acidez y como formulación líquida, consistente de 2 “sachets”, uno que contiene la vacuna liofilizada y el otro que contiene un tampón bicarbonato para neutralizar la acidez estomacal; ambas formulaciones son suministradas en 3 dosis (entre 2 y 10 x10⁹ bacterias vivas) y se la encuentra en el mercado farmacéutico con el nombre de VIVOTIF®. Se la utiliza como vacuna oral atenuada contra fiebre tifoidea, aunque sin mucho éxito en nuestro país por la naturaleza de nuestra población, la cual ha estado en contacto inmunológico con el microorganismo durante largo tiempo.

Varios investigadores han desarrollado diversas cepas atenuadas de *Salmonella entérica* en las cuales se han incorporado mutaciones bien definidas dentro del cromosoma (Hone *et al.*, 1991), generando de esta manera cepas no virulentas, capaces de inducir una fuerte respuesta inmune después de una administración oral (Tacket *et al.*,1997). Otra de las ventajas que presenta este tipo de vacunas son su seguridad, fácil administración, protección duradera y la ausencia de reacciones adversas, en comparación con las antiguas vacunas tifoideas consistentes en células enteras inactivadas (Levine, 1988).

Un problema existente cuando se desea obtener respuesta inmune contra antígenos heterólogos es la inestabilidad del plásmido portador del antígeno y el requerimiento de determinantes de resistencia a antibióticos para su continua selección. Nakayama *et al.* (1988) desarrollaron un método genético denominado “sistema letal balanceado” mediante el cual se construyó una cepa de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium atenuada, con una delección en el gen *asd*. Este gen codifica la aspartato semialdehído deshidrogenasa, una enzima de la vía biosintética del ácido diaminopimélico (DAP) y otros aminoácidos. DAP es indispensable para la construcción de la pared celular de la bacteria y su ausencia induce lisis celular. El gen *asd* se inserta en el plásmido que porta el antígeno heterólogo, complementando así la deficiencia de la bacteria hospedera. Puesto que los tejidos animales carecen de DAP, solamente sobrevivirá la población de bacterias que porta el plásmido, asegurándose de esta manera la expresión del antígeno heterólogo y su presentación al GALT. En este sistema de Nakayama se utilizó el gen *asd* de *Streptococcus mutans*. Posteriormente, Galán *et al.* (1990), clonaron el gen *asd* de *S. entérica* serovar Typhimurium, el cual complementa más eficientemente la deficiencia de las cepas Δasd , aún en plásmidos de bajo número de copias. Así, el gen *asd*, actúa como un eficiente marcador metabólico de selección.

Esta tesis tiene como objetivo estudiar, mediante experimentación en ratones, la capacidad de diversos antígenos de *N. meningitidis* expresados en cepas atenuadas de *S. entérica* serovar Typhimurium, de inducir respuesta inmune protectora. Con esta evaluación preliminar en la respuesta frente a determinados antígenos, será posible proponer a futuro el desarrollo de una vacuna oral viva basada en *S. entérica* serovar

Typhi para uso humano. En el presente trabajo de tesis se realizará este tipo de estudio en un modelo murino, con dos antígenos de cepas relevantes de *N. meningitidis* en Chile: PorA y TbpB. Estos antígenos serán expresados utilizando el gen *asd* mediante un sistema de doble plásmido, inducible por temperatura (Harokopakis *et al.*, 1997). Uno de ellos (el de la familia de vectores pET) portará el gen de *N. meningitidis*, bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del fago T7, y el gen *asd* como marcador de selección; mientras que el segundo plásmido, pGP1-2, aportará la RNA polimerasa del fago T7, necesaria para la transcripción de los genes de *N. meningitidis*, siendo este gen termoinducibile. Como cepa vacuna, se utilizará *Salmonella entérica* serovar Typhimurium χ 4550, una mutante Δ *asd*, que es atenuada en su virulencia por otras dos deleciones, una en el gen *cya* (adenil ciclasa) y otra en el gen *crp* (receptor del cAMP), (Curtiss, comunicación personal; Curtiss y Kelly, 1987).

2.7. Hipótesis.

La manipulación de una cepa vacuna de *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 que expresa los antígenos TbpB y PorA de *N. meningitidis* en forma plasmidial y bajo promotores inducibles, es capaz de inducir una respuesta mucosal y sérica contra estos antígenos usando el ratón como modelo experimental.

2.8. Objetivos.

2.8.1. Objetivo general.

Evaluar la capacidad de los antígenos TbpB y PorA de *N. meningitidis*, expresados en una cepa vacuna de *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550, para inducir anticuerpos séricos y a nivel de mucosa en ratones inmunizados a fin de determinar su utilidad para el desarrollo de una vacuna oral contra la infección por *N. meningitidis*.

2.8.2. Objetivos específicos.

1. Optimización del vector plasmidial para la expresión de los antígenos foráneos:

1.1. Promotor Inducible por T⁰, sistema dual letal balanceado.

1.2. Transformación de la cepa vacuna χ 4550 con los genes *tbpB* y *porA* de *N. meningitidis* y evaluación comparativa de los niveles de expresión de estos genes en cultivos *in vitro*.

2. Selección de la cepa vacuna:

2.1. Capacidad de expresión de los genes *tbpB* y *porA* en la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550.

2.2. Estudios de expresión de los genes *tbpB* y *porA* en *S. entérica*

serovar Typhimurium χ 4550 ya inoculados en ratón, durante el período de colonización.

2.3. Ensayos de inducción de anticuerpos IgG e IgA en ratones inmunizados con la cepa vacuna.

3. Ensayos bactericidas:

3.1. Capacidad bactericida de los genes *tbpB* y *porA* de *N. meningitidis* en la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Materiales.

3.1.1. Material biológico.

3.1.1.1. Cepas bacterianas.

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

Cepa	Genotipo relevante
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F'/ <i>endA1 hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>glnV44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^r) <i>relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (ϕ 80 <i>LacZ</i> Δ M15) (1)
<i>E. coli</i> JM109 (DE3)	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> ($r_k^- m_k^-$) <i>relA1 supE44</i> Δ (<i>lac proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB lac^q Z</i> Δ M15] λ (DE3) (1)
<i>E. coli</i> χ 6212	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>supE44</i> λ^- <i>gyrA96</i> (Nal ^r) <i>recA1 relA1 endA1</i> Δ <i>asd A4</i> Δ <i>zhf-2::Tn 10</i> <i>hsdR17</i> (R ⁻ M ⁺) (1)
<i>Salmonella entérica</i> var. Typhimurium χ 3730	<i>leu hsdL galE trpD2 rpsL120</i> (Str ^r) Δ <i>asdA1</i> Δ [<i>zhf-4::Tn10</i>] <i>metE551 metA22 hsdSA hsdSB ilv</i> (2)
<i>S. entérica</i> var. Typhimurium χ 4550	<i>gyrA1816</i> (Nal ^r) Δ <i>asdA1</i> Δ [<i>zhf-4::Tn10</i>] Δ <i>crp-1</i> Δ <i>cya-1</i> (2)

(1) Cepario Laboratorio Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

(2) Gentilmente cedida por el Dr. Roy Curtiss III (Washington University, USA).

3.1.1.2. Animales de experimentación.

Ratones BALB/c libres de patógenos, hembras de 8 a 12 semanas, procedentes del Bioterio de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Chile.

3.1.1.3. Vectores y plásmidos.

Se utilizaron los siguientes vectores: pET21a (NOVAGEN) y pGP1-2 disponibles en el Laboratorio de Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

3.1.2. Reactivos.

Los reactivos utilizados se obtuvieron de los siguientes proveedores:

- **Becton Dickinson**, Industrias Quirúrgicas Ltda, Brasil: jeringas desechables de 1 ml, 15x5 25 G 5/8.
- **Bio-Rad** Laboratories Inc., Melville, NY, USA: 4-cloro- α -naftol; persulfato de amonio; anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano; cubetas de electroporación de 0,2 cm de distancia entre electrodos.
- **Boehringer** Mannheim GmbH, Alemania: IPTG; enzimas de restricción y sus soluciones amortiguadoras.
- **Calbiochem**, La Jolla, Ca, USA: p-nitrofenil fosfato sal disódica.
- **Difco** Lab. Ditroit, MI, USA: extracto de levadura, triptona pancreática digerida de caseína, agar SS, agar soya-triptona, agar cerebro-corazón.
- **Gibco BRL**, Maryland, USA: enzimas de restricción y sus soluciones amortiguadoras, *Taq* DNA polimerasa y su amortiguador, estándar de peso

molecular DNA λ -*Hind* III, estándar de peso molecular 1kb y 100 pb ladder, SDS, agar-agar.

- **Merck**, Darmstadt, Alemania: etanol, alcohol isoamílico, ácido acético glacial, cloroformo, isopropanol, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico fumante 37%, ácido sulfúrico, TEMED, dietiléter, dietanolamina, peróxido de hidrógeno 30%, ácido ortofosfórico 85%, fosfato de potasio, fosfato de potasio hidratado, fosfato de sodio monohidratado, fosfato de sodio dihidratado, carbonato de sodio anhidro, carbonato de sodio monohidratado, cloruro de sodio, cloruro de potasio, metanol.
- **Nalge Nunc**, International, Denmark: placas Inmuno-Nunc de superficie plana poliadsorbida.
- **New England Biolabs Inc.**, Beverly, MA, USA: marcador de proteínas preteñido rango amplio (2-212 kDa).
- **Nipro Corp.**, Osaka, Japan: sonda orogástrica 25G x $\frac{3}{4}$ " T.W. (0,5 x 19mm).
- **Oxoid Ltda.**, Basingstoke, Hampshire, England: Agar MacConkey N°3
- **Polaroid Corporation**, MA, USA: películas tipo 667.
- **QIAGEN**, Valencia, CA, USA: "QIAGEN plasmid midi kit".
- **Schleicher & Schuell**, Dassel, Alemania: papel de nitrocelulosa de 0,45 μ m.
- **Sigma Chemicals Co.**, St Louis, USA: anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina, anti-IgA de ratón conjugado a fosfatasa alcalina, Trizma-base, agarosa. EDTA, acrilamida, bisacrilamida, ampicilina, kanamicina, estreptomina, ácido nalidíxico, aceite mineral, azida de sodio, azul de bromofenol, azul de Coomasie R-250, β -mercaptoetanol, bromuro de etidio, cloruro de calcio, glicerol, glicina, cloruro

de magnesio, sulfato de magnesio, acetato de potasio, RNAsa A, Tween-20, BSA, ácido diamino pimélico (DAP), cloruro de carbamilcolina (carbacol),

- **Whatman** International Ltd., Maidstone, England: filtros N°1 y papel 3MM.
- **Winkler**, Ltda, Stgo, Chile: fenol saturado básico, marcador preteñido de proteínas rango amplio (20-120 kDa).

3.1.3. Medios de cultivo y soluciones.

Agar Luria.

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar-Agar	15 g/l

Disolver en agua destilada y esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 min.

Caldo Luria.

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l

Disolver en agua destilada y esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 min.

Agar MacConkey.

Añadir 51,5 g a un litro de agua destilada. Llevar a ebullición hasta disolución completa.

Esterilizar en autoclave a 120°C por 20 min.

Agar SS.

Añadir 60 g a un litro de agua destilada y hervir cuidadosamente por sólo 2-3 min para disolver completamente. No autoclavar.

Agar cerebro-corazón.

Disolver 37 gr a un litro de agua destilada de infusión cerebro-corazón, agregar 15 gr de agar-agar y esterilizar en autoclave por 20 min a 120°C.

Agar Soya-Triptona.

Disolver 40 gr en un litro de agua destilada, calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 min para disolver completamente el polvo. Esterilizar en autoclave por 20 min a 120°C. Para la preparación de placas de sangre, añadir 5-10% sangre sin fibrina al medio estéril que ha sido enfriado a 45-50°C.

3.1.4. Antibióticos.

Se utilizaron las siguientes soluciones de antibióticos con las concentraciones finales indicadas para placas de agar o en medios de cultivo líquido:

Antibiótico	Solución	Concentración final de trabajo
Ampicilina	100 mg/ml	80 ó 100 µg/ml
Tetraciclina	25 mg/ml	25 ó 50 µg/ml
Kanamicina	50 mg/ml	50 µg/ml
Acido Nalidíxico	20 mg/ml	20 µg/ml
Estreptomicina	50 mg/ml	50 µg/ml

Con la excepción de tetraciclina y ácido nalidíxico, todos los antibióticos se prepararon como soluciones acuosas y se esterilizaron por filtración en filtros Millipore de 0,22 µm. La tetraciclina se disolvió en 100% etanol (solución primaria) y en 50% de etanol (solución de trabajo). El ácido nalidíxico se disolvió en una solución de NaOH 0,01 N.

3.2. Métodos.

3.2.1. Almacenamiento y cultivo de las cepas bacterianas.

Las condiciones normales de crecimiento de las cepas de *E. coli* fueron en caldo Luria a 37°C con agitación durante toda la noche (250 rpm). Las cepas transformadas con los plásmidos recombinantes se crecieron en medio Luria con el antibiótico correspondiente según el vector utilizado, en iguales condiciones, excepto aquéllas que fueron transformadas con el sistema de doble plásmido inducible por temperatura, cuyo crecimiento se hizo a 30°C.

Para mantención por períodos cortos, las cepas se cultivaron a 37°C en placas con agar Luria y se guardaron a 4°C. Para una conservación por tiempos más prolongados, se almacenaron en glicerol al 50% a -20°C o en glicerol al 14% a -70°C (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.2. Purificación de plásmidos recombinantes.

3.2.2.1. Escala analítica (minipreparación).

La preparación de plásmidos recombinantes a pequeña escala se realizó por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979) con las modificaciones señaladas en Sambrook *et al.* (1989).

3.2.3. Reacción de amplificación de DNA por PCR.

La reacción de polimerización en cadena (PCR) se basa en ciclos repetidos de tres etapas simples necesarios para cualquier reacción de amplificación de DNA: (1) desnaturación del molde bicatenario (DNA cromosomal o plasmídico) en hebras

simples; (2) hibridación de oligonucleótidos específicos (partidores) a pequeñas zonas complementarias de cada hebra; y (3) extensión o polimerización de nuevas hebras de DNA a partir de los partidores. La síntesis de las hebras nuevas es llevada a cabo por la DNA polimerasa de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (*Taq* pol), amplificando exponencialmente una región definida del DNA molde (Delidow *et al.*, 1996).

3.2.3.1. Amplificación del gen *asd* de *E. coli* K-12.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ l en una solución amortiguadora de Tris-HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; 200 μ M de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), y partidores a una concentración final de 0,5 μ M (50 pmol/100 μ l).

Previo a la amplificación, el DNA plasmidial obtenido de los clones recombinantes (0,1-0,5 μ g) se desnaturó a 95°C en la mezcla de reacción antes descrita, durante 3 min. Luego, se adicionó 0,5 unidades de *Taq* pol y se recubrieron los tubos con una gota de aceite mineral. Cada mezcla de reacción se sometió a 30 ciclos de amplificación en un termociclador MJ Research. Cada ciclo consistió en 1 minuto a 94°C (desnaturación), 3 min a 55°C (hibridación) y 4 min a 72°C (elongación). Finalmente, las muestras se incubaron durante 10 min adicionales a 72°C y luego se mantuvieron a 4°C hasta ser analizadas.

3.2.3.2. Amplificación de los genes *tbpB* y *porA* de *N. meningitidis*.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 100 μ l en solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; 200 μ M de cada

desoxirribonucleósido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), y partidores a una concentración final de 0,5 μ M (50 pmol/100 μ l). Previo a la amplificación, el DNA genómico de *N. meningitidis* de la cepa respectiva (0,1-0,5 μ g) ya presente en la mezcla de reacción, se desnaturó a 95°C durante 5 min. Luego, se adicionó 0,5 unidades de *Taq. pol* y se recubrieron los tubos con una gota de aceite mineral. Cada mezcla de reacción se sometió a 35 ciclos de amplificación en un termociclador MJ Research. Cada ciclo consistió de 2 min a 95°C (desnaturación), 2 min a 43°C para *porA* o a 52°C para *tbpB* (hibridación) y 4 min a 72°C (elongación). Finalmente, las muestras se incubaron durante 10 min adicionales a 72°C y luego se mantuvieron a 4°C hasta ser analizadas.

3.2.3.3. Diseño de oligonucleótidos utilizados como partidores.

Gen *asd*.

Estos partidores se diseñaron de la secuencia nucleotídica del gen *asd* (Haziza, 1982), incluyendo la región del propio promotor, el codón de término de la traducción, y sitios de restricción como se indica a continuación:

ASDEC1 5' CTCTAGTACTGGATCCATAATCAGGATCAATAAACTGC 3'
ASDEC2 5' AGCTAGTACTGGATCCTGTATTACGCACTAACAGGGGCG 3'

* Secuencia en color rojo corresponde al sitio de reconocimiento de *ScaI*, necesario para incorporar el fragmento obtenido en el sitio *ScaI* del gen de resistencia a ampicilina del vector y en color azul, un sitio *BamHI* como un sitio alternativo.

Genes *porA* y *tbpB*.

El diseño de los partidores de estos genes se hizo a partir de la secuencia nucleotídica de los genes *porA* y *tbpB*, considerándose en ambos casos los sitios de restricción apropiados.

1. NMCPS-3 5' AGGAAGCC**CATATG**CGAAAAAACTTACCGC 3'
NMSPS-2 5' GCCC**AAGCTT**TAGAATTTGTGGCGCAA 3'
2. TBP-1 5' GCCGG**CATATG**AACAATCCATTGGTAAATCAGGCTGCT 3'
TBP-1.3 5' TTTAA**AAGCTT**TTATTGCACAGGCTGTTGGCGTTTC 3'

* 1, representa la secuencia de los partidores correspondientes al gen *porA* y 2, al gen *tbpB*. La secuencia color rojo corresponde al sitio de reconocimiento de *NdeI* necesario para incorporar el fragmento amplificado en el vector pET21a y en color azul, el sitio *Hind III*.

3.2.4. Digestión de DNA con enzimas de restricción.

3.2.4.1. Digestión analítica.

Se incubaron alrededor de 100 ng de DNA con 0,5 U de enzima de restricción y su amortiguador correspondiente, en un volumen final de 20 µl. El tiempo mínimo de incubación fue de 2 hr a la temperatura adecuada (normalmente a 37°C). Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en geles de agarosa para el correspondiente análisis de tamaño molecular.

3.2.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La separación de fragmentos entre 0,5 y 10 kb se realizó por electroforesis en geles horizontales de agarosa (0,8-1,0%) preparados en solución TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, EDTA 2 mM, acetato de sodio 20 mM ajustado a pH 8,0 con ácido acético glacial). Los geles se sometieron a electroforesis en solución amortiguadora TAE 1X a 50 mA,

los analíticos y a 30 mA, los preparativos. Antes de colocar las muestras en el gel, éstas se incubaron durante 5 min a 65°C con igual volumen de solución de carga 2X (glicerol 25%, SDS 0,5%, azul de bromofenol 0,025% y EDTA 12 mM).

3.2.5.1. Visualización de DNA.

Las bandas de DNA en los geles de agarosa se visualizaron en un transiluminador UV, previamente teñidos por 10 min en una solución de Br-Et (1 µg/ml). Los geles se fotografiaron bajo luz UV, utilizando para este propósito una película Polaroid tipo 667.

3.2.5.2. Determinación de la concentración de DNA.

La concentración de DNA se determinó por espectrofotometría realizando mediciones de absorbancia a 260 nm. Además, se consideró el valor de la razón 280/260 como referencia del grado de pureza de la preparación. Para DNA doble hebra se utilizó la relación $1 \text{ D.O.}_{260\text{nm}} = 50 \text{ µg/ml}$ y 20 µg/ml para oligonucleótidos de hebra simple (Sambrook *et al.*, 1989). Paralelamente, se realizaron cálculos estimativos en geles de agarosa analíticos, previamente teñidos con Br-Et comparándose la intensidad de la fluorescencia de las bandas de interés con aquella del estándar más similar en tamaño.

3.2.6. Transformación bacteriana con DNA plasmidial.

3.2.6.1. Transformación usando cloruro de calcio.

El procedimiento empleado fue básicamente el que describe Weston *et al.* (1981), que se basa en la permeabilización de las células con CaCl_2 0,075 M.

Preparación de células competentes.

Se inocularon 50 ml de medio Luria con 1 ml de un cultivo saturado y se incubó a 37°C con agitación fuerte hasta una D.O._{600nm} de 0,5 a 0,7. Las células se mantuvieron en hielo por 10 min y posteriormente, se centrifugaron en tubos estériles por 10 min a 5.000 rpm en centrífuga Beckmann JS-21, con rotor JA-20 a 4°C. Las células recolectadas se resuspendieron en 25 ml de una solución fría y estéril de CaCl₂ 75 mM. A partir de este instante las células se consideran competentes. El grado de competencia se aumentó dejando las células por 3-4 hrs en CaCl₂ 75mM a 0°C. Finalmente, las células se fraccionaron en alícuotas de 200 µl en tubos de microcentrífuga estériles con glicerol al 14%, se congelaron rápidamente en un baño de hielo seco y etanol y se almacenaron a -70°C.

Transformación de células competentes.

En un tubo de microcentrífuga estéril, se mezclaron 200 µl de una suspensión de células competentes, con 50-100 ng de DNA, dependiendo de la cepa a transformar. La mezcla se incubó 60 min en hielo, agitando suavemente cada 10 min, luego se dio un pulso de calor (42°C por 1 min). A continuación, la mezcla se transfirió a un tubo de vidrio estéril con 1 ml de medio Luria y se incubó a 37°C con agitación por 30 min. De este cultivo se sembraron 100 µl en placas con agar Luria al 1% que contenía como medio de selección el antibiótico correspondiente al vector utilizado, incubando posteriormente por 10 hr a 37°C.

3.2.6.2. Transformación por electroporación.

La técnica de transformación bacteriana por electroporación se basa en la desestabilización del potencial de membrana de bacterias Gram negativas y Gram positivas, al ser sometidas a un pulso de alto voltaje. El campo eléctrico aplicado induce la formación de poros transitorios a nivel de la membrana por los cuales el DNA puede ser incorporado a la célula (Andreason y Evans, 1988; Shigekawa y Dower, 1988).

El campo eléctrico depende de variables eléctricas que se pueden seleccionar en el aparato de electroporación. Este tiene acoplado un controlador de pulso que contiene un condensador capaz de producir voltajes que generan campos eléctricos intensos en pequeños volúmenes de muestra.

La electrotransformación de cepas de *E. coli* y *S. entérica* serovar Typhimurium se realizó básicamente según el método descrito por Chasy *et al.* (1988), con algunas modificaciones introducidas por Miller (1994). Se utilizó un equipo Bio-Rad compuesto por la fuente de poder Gen Pulser™ versión 2-89, acoplado a un controlador de pulsos. Se utilizaron cubetas de 0,2 cm de separación entre los electrodos.

Preparación de células electrocompetentes.

Se hizo según el método de Miller (1994), con las siguientes modificaciones: Se traspasó 100 ml de un cultivo en medio Luria crecido hasta una D.O._{600nm} entre 0,4 y 0,6 a un tubo "Corex" de 150 ml estéril y se centrifugó a 5000 rpm en un rotor GSA (Sorvall) a 4°C por 15 min. Luego de eliminar todo el medio de cultivo posible, las células se mantuvieron en hielo y se resuspendieron cuidadosamente en 100 ml de agua destilada estéril y fría, centrifugándose nuevamente en las mismas condiciones. Las células

recolectadas se resuspendieron en 50 ml de agua destilada estéril y fría y se centrifugaron en el mismo rotor a 6000 rpm por 15 min. El sedimento bacteriano se resuspendió en 2 ml de agua destilada estéril y fría y se traspasó a dos tubos estériles de microcentrífuga. Se centrifugó 5 min a 5000 rpm en microcentrífuga y finalmente, el sedimento de cada tubo se resuspendió en 100 μ l de solución fría de glicerol al 10%. La suspensión se guardó en alícuotas de 40 μ l a -70°C hasta ser utilizadas. El rendimiento general de esta preparación varió entre 10^9 a 10^{10} células/ml.

Electroporación.

En un tubo de microcentrífuga estéril mantenido en hielo, se agregaron 40 μ l de células electrocompetentes (10^8 - 10^9 células/ml) con 0,1 a 1,0 μ g de DNA plasmidial. La mezcla se mantuvo en hielo por 5 min y se traspasó a una cubeta estéril de electroporación Bio-Rad de 0,2 cm de distancia entre electrodos, la cual se dejó enfriar previamente en hielo y se transfirió a la cámara especial de electroporación para aplicar el pulso. El equipo Gene Pulser™ acoplado a la unidad controladora de pulso y las condiciones de electroporación se fijaron a un voltaje de 2.500 V, resistencia de 200 Ω y capacitancia de 25 μ F, con lo que se obtiene un campo eléctrico de 12,5 kV/cm al utilizar una cubeta de 0,2 cm y una constante de tiempo entre 4 a 5 mseg. Posteriormente, la cubeta con la mezcla de células y el DNA, enfriada en hielo se transfirió a la cámara especial de electroporación y se aplicó el pulso. Luego, se verificó las condiciones reales de electroporación, leyendo los registros en el equipo. Se retiró la cubeta de la cámara, colocándose inmediatamente en hielo y la mezcla se transfirió a

un tubo estéril con 1 ml de caldo Luria. La mezcla de transformación se incubó a 37°C con agitación durante 90 min.

La selección de las bacterias transformantes se realizó en placas con agar Luria al 1% con el antibiótico correspondiente dependiendo del vector utilizado. Las placas se incubaron entre 16 y 24 hr a 37°C.

3.2.6.3. Transformación con dos plásmidos.

Las transformaciones con los plásmidos compatibles pGP1-2 y pET21-*porA*_{B15:P1.3} *asd* o pET21-*tbpB*_{B4:NT} *asd* (con orígenes de replicación p15A el primero y ColE1 los otros), tanto en células de *E. coli* como de *S. entérica* serovar Typhimurium, se hicieron por electroporación. Ambas cepas se transformaron primero con pGP1-2, preparando células electrocompetentes a partir de una de las colonias y electroporándolas por segunda vez con el plásmido pET21-*porA*_{B15:P1.3} *asd* o pET21-*tbpB*_{B4:NT} *asd*. La selección se hizo en placas de agar Luria con kanamicina 50 µg/ml, incubándose a 30°C durante toda la noche.

3.2.7. Estudios de expresión de los clones recombinantes.

3.2.7.1. Ensayos de expresión bajo el control de promotores inducibles por IPTG.

Se inocularon 2 ml de caldo Luria conteniendo el agente seleccionador apropiado, con 0,1 ml de cultivo saturado de los clones de interés y se incubó a 37°C con agitación hasta una D.O._{600nm} de 0,5. Posteriormente, se adicionó IPTG a una concentración final de 1mM para inducir la expresión de las proteínas recombinantes por 4 hr. La

preparación de los extractos totales y el análisis por Western blot se hicieron como se señala en las secciones 3.2.8 y 3.2.9, respectivamente.

3.2.7.2. Ensayos de expresión usando el sistema plasmidial dual.

El sistema dual consiste en el plásmido pGP1-2 (kan^r), con el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el promotor del fago λ P_L termoinducible y de un plásmido derivado de pET21a que contiene el gen de interés bajo el control del promotor T7 y *asd* incorporado como marcador metabólico.

La inoculación de los clones en estudio se hizo en 2 ml de caldo Luria con kanamicina 50 μ g/ml (clones con el gen *asd*) y con 50 μ l (dilución 1:40) de cultivos saturados crecidos toda la noche a 30°C, en el caso de *E. coli*, o a 37°C en el de *S. entérica* serovar Typhimurium, con agitación. Los cultivos se crecieron en iguales condiciones hasta una D.O._{600nm} de 0,4 - 0,6, luego se adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM y se colocaron los cultivos en un baño a 42°C por 30 min para la inducción del promotor P_L de pGP1-2. Posteriormente, la incubación se continuó a 37°C por 4 hr con agitación (Ausubel *et al.*, 1990). De esta manera se indujo la expresión de los genes de interés bajo el control del promotor T7 en el vector pET. Se prepararon extractos totales de los cultivos inducidos y se analizaron por Western blot (secciones 3.2.8 y 3.2.9).

3.2.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.

Se procedió según la técnica descrita por Laemmli (1970), en geles de poliacrilamida-SDS. La concentración de acrilamida utilizada fue del 12% en el caso de PorA y del 8% en el caso de TbpB.

Se utilizaron las siguientes soluciones:

- Solución de acrilamida-bis: 30% de acrilamida y 0,8% de bisacrilamida.
- Solución A: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%.
- Solución B: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4%.
- Solución de corrida de electroforesis: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,4, SDS 1%.
- Solución de carga (2X): Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 6%, glicerol 20%, 2-βmercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,005%.
- Persulfato de amonio (PSA): solución al 10%.

Los minigeles (11 x 8 cm) se prepararon, de acuerdo a los requerimientos, con las siguientes concentraciones de poliacrilamida:

Soluciones (gel resolutivo)	8%	12%
Solución A (ml)	1,0	1,0
Sol. acrilamida-bis 30:0,8 (ml)	1,1	1,6
Agua destilada (ml)	1,9	1,4
PSA (ml)	0,02	0,02
TEMED (ml)	0,005	0,005

<u>Soluciones (gel concentrador)</u>	5%
Solución B (ml)	0,32
Sol. acrilamida-bis 30:0,8 (ml)	0,20
Agua destilada (ml)	0,92
PSA (ml)	0,01
TEMED (ml)	0,005

Las muestras correspondientes a lisados bacterianos totales, se concentraron por centrifugación hasta 10 veces, considerando el volumen de solución de carga 2X. Las células se lisaron durante 10 min a 100°C y se cargaron 10 µl de éstas en los geles.

La electroforesis se llevó a cabo a 100 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó la base del gel. Posteriormente, el gel se tiñó por 30 min a temperatura ambiente en una solución de tinción (Azul de Coomasie R-250 0,1%; ácido acético 10% y metanol 45%) con agitación. El exceso de colorante se eliminó por cambios sucesivos de la solución de desteñido (ácido acético 10%; metanol 10%) hasta lograr una visualización apropiada de las bandas de proteínas.

3.2.9. Western blot.

Esta técnica inmunolectroforética fue descrita por Towbin *et al.* (1979) y se basa en el reconocimiento, por anticuerpos específicos, de proteínas separadas previamente por electroforesis en geles de poliacrilamida y transferidas a membranas de nitrocelulosa.

3.2.9.1. Transferencia a nitrocelulosa.

Las muestras de proteínas se sometieron a electroforesis, luego de lo cual, el gel (sin teñir) se colocó en el sistema de electrotransferencia consistente en una esponja

sobre la cual se depositaba sucesivamente una hoja de papel filtro Whatman 3MM, el gel de proteínas, la membrana de nitrocelulosa, otro papel filtro y nuevamente una esponja, todo esto entre dos soportes de plástico perforados. Este sistema se sumergía en una cámara conteniendo la solución de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,4; glicina 192 mM y metanol 20%), con el cuidado de dejar la nitrocelulosa en dirección al ánodo y el gel hacia el cátodo. La electrotransferencia se hizo a 200 mA durante una hora. La hoja de nitrocelulosa con las proteínas electrotransferidas, se incubaron en una solución de bloqueo compuesta por PBS 1X (Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; KCl 2,7 mM; NaCl 136 mM; pH 7,4) con leche descremada al 1%, a temperatura ambiente durante 45 min o a 4°C por 10 hr con agitación.

3.2.9.2. Reacción antígeno-anticuerpo.

Luego de bloquear los sitios libres, la membrana se incubó durante 60 min a temperatura ambiente con sueros policlonales de conejo en solución PBS-leche (PBS con leche descremada al 1%). En el caso de TbpB, se utilizó una dilución 1:1000 mientras que en el caso de PorA, 1:500. Los anticuerpos unidos en forma inespecífica se eliminaron lavando 3 veces por 5 min cada vez con la solución de lavado (PBS-Tween 20 al 0,1%). Los anticuerpos que se unieron en forma inespecífica a las proteínas presentes en la nitrocelulosa se visualizaron incubando una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-IgG de conejo, conjugado a peroxidasa de rábano diluido 1:1000 en la solución de bloqueo (PBS-leche). Luego de lavar en las condiciones ya descritas, el conjugado ya unido específicamente fue revelado incubando la nitrocelulosa con 50 ml de una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y NaCl

150 mM, a la que se agregaron 30 mg de 4-cloro- α -1-naftol disuelto previamente en 10 ml de metanol frío y 200 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción se detuvo lavando con agua destilada.

3.2.10. Purificación de proteínas por electroelución.

Se trabajó de acuerdo a lo propuesto por Every y Green (1982). Se utilizaron geles preparativos de poliacrilamida-SDS, de 15 x 13 x 0,3 cm, para separar las proteínas provenientes de muestras equivalentes a 15 ml de cultivo bacteriano de clones que expresaron PorA o TbpB en condiciones óptimas. La electroforesis requirió 18 a 20 hr a 50 V. Los geles se tiñeron con KCl 0,1 M, hasta lograr la visualización de la banda de PorA o TbpB. La banda de interés se cortó del gel, se fraccionó en trozos pequeños con un bisturí y se depositó en el aparato de electroelución BIO-RAD. El procedimiento de electroelución se hizo de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes.

3.2.10.1. Determinación de la concentración de proteínas.

A cada extracto se le determinó la concentración de proteínas a través del método de Markwell (1978), que es una modificación del método descrito por Lowry en 1951. Alternativamente, se comparó la cantidad de proteína presente en alícuotas de la proteína electroeluída con alícuotas de diluciones de concentración conocida de BSA, en electroforesis SDS-PAGE. La comparación entre intensidades de tinción con azul de Coomassie, frente a las bandas de distintas concentraciones de BSA permite realizar

una estimación aproximada sobre la cantidad de proteína obtenida luego de la electroelución, corroborado con una gráfica de absorbancia versus concentración

3.2.11. Recuento de células viables de *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 (cepa vacuna) con los plásmidos recombinantes.

Se crecieron los clones de interés en caldo Luria con el agente seleccionador adecuado, con agitación a 30°C ó 37°C, según el caso, hasta una D.O._{600nm} de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0, tomándose alícuotas en cada uno de estos puntos del cultivo en crecimiento y sembrando diluciones convenientes en placas con agar Luria. Luego de incubar durante toda la noche, se contaron colonias y el cálculo del número de unidades formadoras de colonias (ufc) por cada ml de cultivo. Estos valores fueron un promedio de al menos 2 determinaciones independientes. Además, con estos datos y la variable tiempo, se elaboró una curva de crecimiento.

3.2.12. Inmunización de ratones BALB/c con *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 que expresa antígenos de *N. meningitidis*.

3.2.12.1. Preparación de la suspensión bacteriana.

Se crecieron con agitación (a 250 rpm), los clones elegidos para las inmunizaciones a partir de cultivos saturados en caldo Luria con el agente seleccionador, a 37°C hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,4 y 0,6. Se tomaron alícuotas de 1 ml, las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 4 partes de PBS y 1 parte de solución de bicarbonato de sodio al 7,5% en un volumen total de 200 μ l. La población bacteriana de la suspensión se estimó por D.O._{600nm} mediante

extrapolación de la curva de crecimiento (ver Tabla 1) y se confirmó el número de bacterias viables sembrando diluciones apropiadas en placas de agar Luria.

3.2.12.2. Inmunización oral.

Para cada clon de interés se procedió de la siguiente manera: se inmunizaron grupos de 8 ratones BALB/c de 8 a 12 semanas de edad, hembras, libres de patógenos, por vía oral, aplicando mediante sonda orogástrica de aproximadamente 25 "gauge" x $\frac{3}{4}$ T.W. (0,5 x 19 mm) de diámetro, una dosis de aproximadamente 10^7 ufc/200 μ l (D.O._{600nm} = 0,4) a los grupos de ratones.

La inmunización primaria consistió en 3 dosis administradas en un periodo de 6 días y un "booster" o inmunización secundaria de dosis única, después de 6 semanas.

3.2.12.3. Colección y preparación de muestras de los ratones inmunizados.

Se colectaron muestras de suero, saliva y heces, un día antes de iniciar la inmunización (muestras pre-inmunes), 4 semanas después de la inmunización primaria y 10 días después de la inmunización de refuerzo.

Antes de la obtención de muestras, los ratones fueron anestesiados dentro de una cámara cerrada que en su interior contenía unas pocas gotas de éter etílico sobre algodón, para facilitar el manejo del animal. Los sueros se obtuvieron centrifugando muestras de 100 a 150 μ l de sangre coagulada y colectada por vía ocular retro-orbital mediante micropilar. Los sueros se guardaron a -70°C hasta su uso.

La saliva se colectó con una micropipeta pocos minutos después de estimular el flujo salival en el animal mediante una inyección intraperitoneal de 5 µg de carbacol diluído en 200 µl de PBS estéril. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su uso.

Las heces de cada ratón se colectaron en una cantidad aproximada de 100 mg, a las que se le adicionó 1ml de PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, H₂PO₄ 1,5 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 136 mM; pH 7,4) con 0,02% de azida de sodio. Se hizo una suspensión mezclando fuertemente en un vortex, se centrifugó y el sobrenadante se guardó a -70°C hasta su uso.

3.2.13. Cuantificación de la respuesta de anticuerpos por ELISA.

Al soporte sólido, correspondiente a placas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc, fondo plano), primeramente se le agregó a cada pocillo 100 µl de la proteína comercial Pegotina^{MR} (2 µg/ml diluída en PBS, BiosChile I.G.S.A.) que aumenta la eficiencia de unión de los antígenos, optimizando así los ensayos., dejándose en estufa 37°C toda la noche. Al día siguiente se activó la placa con 100 µl por pocillo de cada antígeno purificado (50 ng/100µl, diluído en PBS) por incubación a 37°C durante 2 hr. Transcurrido este tiempo, se lavaron los pocillos con solución de lavado PBS-Tween 20 al 0,02%, 3 veces por 10 min cada lavado. Posteriormente, los sitios libres se bloquearon con 200 µl de PBS-BSA 1%, por 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó con PBS-Tween 20 al 0,02% y la placa se secó sobre una toalla absorbente. A cada pocillo activado se le agregó 100 µl de las diluciones dobles seriadas en PBS-BSA 1% de las muestras de suero, saliva y extracto de heces de los ratones inmunizados. Se incubó por una hora a 37°C y los anticuerpos inespecíficos se

eliminaron lavando 3 veces con 300 μ l de PBS-Tween 20 al 0,02% durante 5 minutos cada vez. La detección de anticuerpos unidos específicamente a la proteína usada para activar el soporte sólido se realizó con un anticuerpo anti-IgG o anti-IgA de ratón conjugado a fosfatasa alcalina, diluído según recomendación del proveedor, incubando durante 30 min a 37°C. El exceso de conjugado se eliminó lavando en las mismas condiciones descritas previamente y se reveló con 100 μ l de Solución PNP (p-nitrofenilfosfato 1 mg/ml en tampón dietanolamina 97 mM con azida de sodio 3mM, pH 9,8) por incubación durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, la reacción se detuvo con 50 μ l de NaOH 3M y el PNP hidrolizado se determinó por absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA (Labsystems Uniskan® I, Flow Laboratories).

3.2.14. Ensayos bactericidas de los anticuerpos anti-PorA y anti-TbpB séricos de ratones inmunizados.

Para inferir un carácter protector de los anticuerpos anti-PorA y anti-TbpB producidos en respuesta al proceso de inmunización, se propuso medir la actividad bactericida de las IgG anti-PorA y anti-TbpB. Para esto, se siguió básicamente el procedimiento descrito por Rokbi *et al.* (1997) con las modificaciones de un protocolo de ensayo de actividad bactericida del National Center for Infectious Diseases, C.D.C, Atlanta Georgia, USA.

Este ensayo se realizó en el Instituto de Salud Pública de Chile, sección Bacteriología Clínica, bajo supervisión y normas internacionales de control y bioseguridad del patógeno *N. meningitidis* serogrupos B15:P1.3 y B4:NT del año 1993

(cepa ISP, fecha en la cual se comenzó a trabajar con B15:P1.3 y B4:NT en el laboratorio de bioquímica de la PUC y de la que se aislaron los dos antígenos en estudio PorA y TbpB).

Se tomó una alícuota de *N. meningitidis*, almacenada en glicerol a -70°C , y se realizaron traspasos sucesivos de ella en placas de agar cerebro-corazón con incubaciones a 37°C en 5 % CO_2 (aproximadamente 3 días), para obtener un crecimiento bacteriano confluyente. Posteriormente una nueva colonia se diluyó en 4 ml de solución de Hanks (4mM NaHCO_3 , Glucosa, 0.1 % BSA fracción V), pH 7,2. Hasta obtener una suspensión meningococal ajustada a 1×10^5 ufc/ml y a la cual se le agregó además 2,5 U/ml de Heparina (dilución 1:50). En una placa de microtitulación estéril se añadió en cada pocillo, 25 μl de solución de Hanks, 25 μl de suero de ratones inmunizados (inmunización primaria y booster diluídos seriadamente hasta dilución 1/1024), 10 μl de bacterias ajustadas a 1×10^5 ufc/ml, 15 μl de plasma humana normal como fuente de complemento.

Los controles usados fueron; control viabilidad bacteriana (40 μl de tampón Hanks y 10 μl de bacteria), control complemento (25 μl de tampón Hanks más 10 μl de bacteria y 15 μl de plasma), control suero ratón preinmune (25 μl suero más 10 μl bacteria y 15 μl de plasma).

Después de añadidos todos los componentes, se incubó a 37°C por 30 minutos, después de este tiempo se agregó a cada pocillo 100 μl de agar Soya-Triptona 0.9 % evitando burbujas. Se deja incubando toda la noche a 37°C en 5 % CO_2 . La actividad

bactericida se determinó contando colonias bajo microscopio en las distintas diluciones seriadas.

4. RESULTADOS

4.1. Selección de clones plasmidiales con los genes de *porA* y *tbpB* de *N. meningitidis*.

El trabajo se inició con clones ya disponibles en el laboratorio, por lo que se procedió a su análisis detallado respecto de sus niveles de expresión, particularmente en *Salmonella*, para proseguir con la investigación. El diseño de construcción de éstos fue desarrollado por Uribe, 1999.

Las construcciones de ambos genes de *N. meningitidis* se encontraban en la cepa de *E. coli* DH5 α , con el vector de expresión pET21a, que tenía incorporado el gen *asd* como marcador de selección.

4.1.1. Análisis plasmidial de los clones disponibles.

De acuerdo a antecedentes previos de efectos líticos de *porA* en *E. coli* y para asegurar la estabilidad de las construcciones que serían utilizadas en la evaluación de su potencial inmunogénico como antígenos para una vacuna oral, se procedió a verificar la integridad de los plásmidos. Se extrajo DNA plasmidial (mediante el método de lisis alcalina), de todos los transformantes pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd* y pET-*tbpB*_{B4NT}*asd* obtenidos en *E. coli* DH5 α y se analizó su migración como DNA sobreenrollado para detectar el incremento de tamaño respecto al vector control pET21a, lo que aseguraba la inserción de los genes de interés. En la figura 1 se muestra el análisis electroforético en un gel de agarosa al 1%. Los resultados demostraron cierta heterogeneidad en el tamaño de los plásmidos, donde sólo el DNA de los clones transformantes de los

carriles 2, 4 y 6 (correspondientes a pET-*tbpB*_{B4NT}*asd* y de los carriles 8 y 10 (correspondientes a pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*, presentaban los tamaños totales de 8.95 kb y 8 kb respectivamente, que daban cuenta de la incorporación del inserto de interés. Para verificar la integridad de los plásmidos, se procedió a amplificar el DNA, tanto para el fragmento que codifica para *asd* y como para los genes de *porA* y *tbpB* de *N. meningitidis* según procediera.

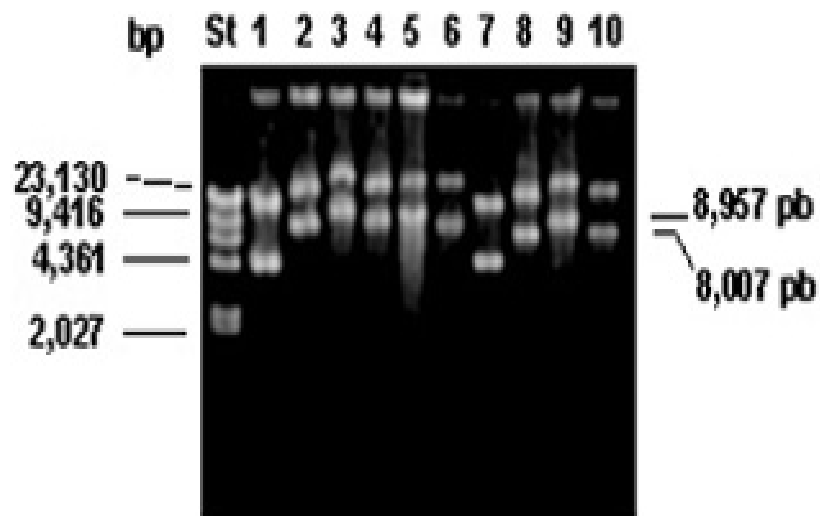


Figura 1. Análisis plasmidial de los clones transformantes en la cepa DH5 α con los genes *porA* y *tbpB* en estudio y selección de los clones positivos para su uso posterior.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA plasmidial, teñido con Br-Et.

Carril St, estándar de DNA λ -*Hind* III; Carril 1 y 7, DNA plasmidial del vector pET21a; Carril 2, clon 5 pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*, Carril 3, clon 6 pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*, Carril 4, clon 7 pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*, Carril 5, clon 8 pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*, Carril 6, clon 10 pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*, Carril 8, clon 10 pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*, Carril 9, clon 11 pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*, Carril 10, clon 12 pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*.

La verificación de la presencia de los genes *asd*, *tbpB* y *porA* en los mencionados clones se hizo por PCR como se señala en las secciones 3.2.3, 3.2.3.1 y 3.2.3.2. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 2, 3 y 4, respectivamente. Para los estudios posteriores se escogieron los clones 7 y 10 de pET-*tbpB*_{B4NT}*asd* y los clones 10 y 12 de pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd* en la cepa DH5 α , por presentar mejor rendimiento en el proceso de extracción del DNA plasmidial y mejor rendimiento en la reacción de PCR correspondiente. En la figura 2 se puede observar la banda amplificada correspondiente al gen *asd*, que según comparación con el estándar de tamaño molecular es de alrededor de 1.4 kb, siendo el tamaño teórico esperado para este fragmento de 1414 pb. La figura 3 muestra la amplificación del gen *tbpB* de *N. meningitidis*, con un tamaño molecular aproximado de 2100 pb. Los clones que presentaban la construcción con *porA* de *N. meningitidis*, también resultaron positivos originando un producto de amplificación de 1150 pb aproximadamente (Fig. 4).

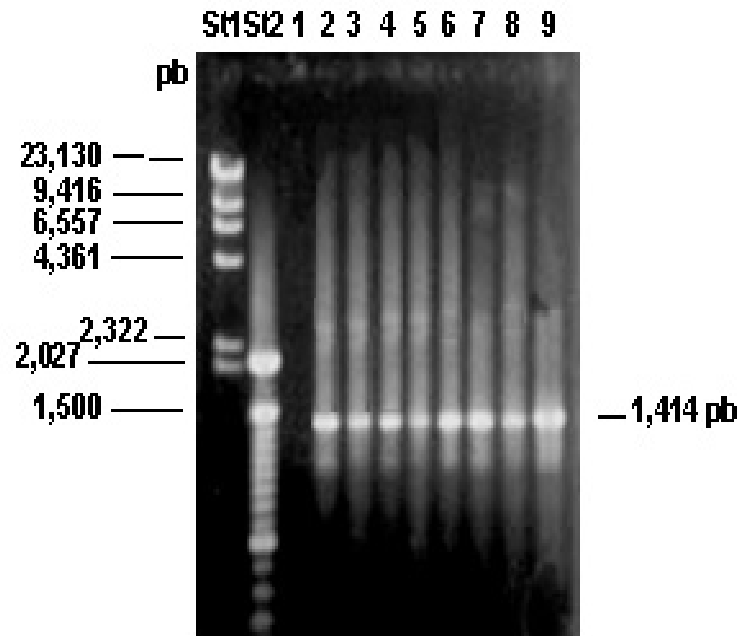


Figura 2. Amplificación por PCR del gen *asd*, en los clones 7 y 10 de *tbpB* y clones 10 y 12 de *porA*, utilizando los partidores ASDEC1 y ASDEC2, a partir de DNA plasmidial de los clones mencionados.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril St1, estándar DNA λ -*Hind* III; carril St2, estándar de peso molecular ladder de 100 pb ; carril 1, control negativo (mezcla de PCR sin DNA molde); carril 2 y 3 amplificación del gen *asd* en el clon 7 de pET-*tbpB*_{B4:NT}*asd*, carril 4 y 5 amplificación del gen *asd* en el clon 10 de pET-*tbpB*_{B4:NT}*asd*, carril 6 y 7 amplificación del gen *asd* en el clon 10 de pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*, carril 8 y 9 amplificación del gen *asd* en el clon 12 de pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*.

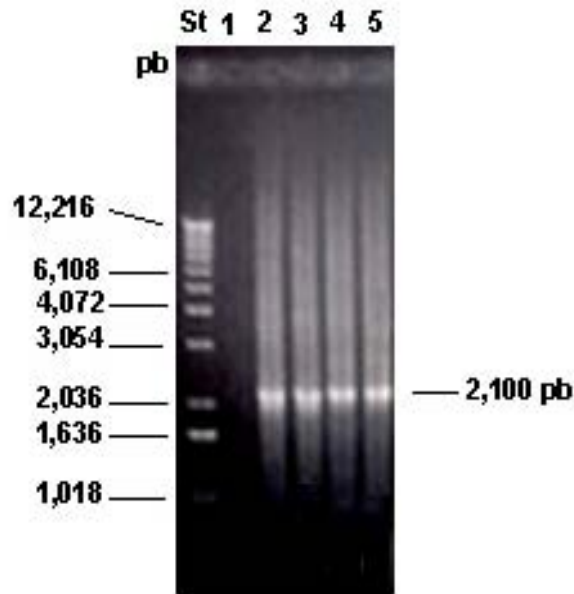


Figura 3. Amplificación por PCR del gen *tbpB*, utilizando partidores TBP-1 y TBPB-1.3 ,a partir de DNA plasmidial de los clones 7 y 10.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril St, estándar de peso molecular ladder de 1 kb; carril 1, control negativo (mezcla de PCR sin DNA molde); carril 2 y 3 amplificación del gen *tbpB* con DNA del clon 7 de pET-*tbpB*_{B4:NT}*asd*, carril 4 y 5 amplificación del gen *tbpB* con DNA del clon 10 de pET-*tbpB*_{B4:NT}*asd*.

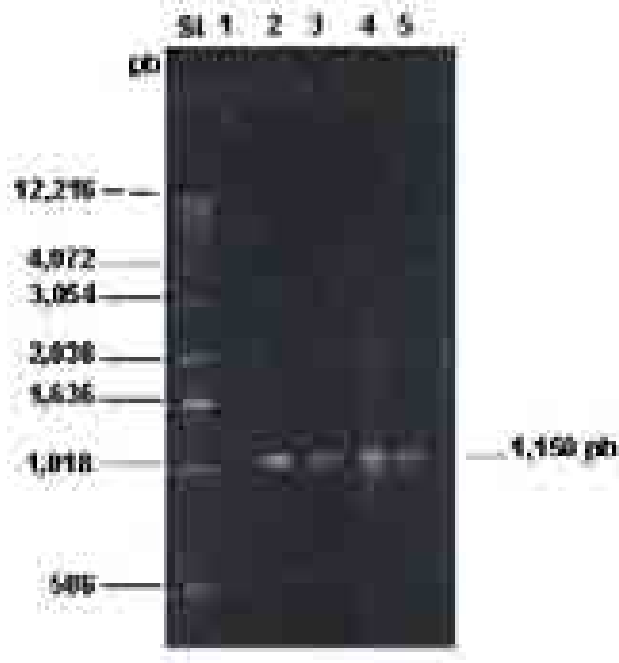


Figura 4. Amplificación por PCR del gen *porA*, utilizando los partidores NMCP3-3 y NMSPS-2, a partir de DNA plasmidial de los clones 10 y 12.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril St, estándar de peso molecular ladder 1 kb; carril 1, control negativo (mezcla de PCR sin DNA molde); carril 2 y 3 amplificación del gen *porA* con DNA del clon 10 de pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*, carril 4 y 5 amplificación del gen *porA* con DNA del clon 12 de pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*.

4.2. Transferencia de los plásmidos con los antígenos PorA y TbpB de *N. meningitidis* a *E. coli* χ 6212.

Con el fin de tener los plásmidos en una cepa apropiada para el mantenimiento de presión selectiva usando el marcador *asd*, los plásmidos del clon 10 (pET-*tbpB*_{B4:NT}*asd*) y del clon 12 (pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*), previamente caracterizados se transfirieron por electroporación a la cepa *E. coli* χ 6212 que carece del gen *asd*, de modo que los plásmidos se mantienen por complementación metabólica y no hay requerimiento de DAP para este cultivo bacteriano. La selección de las colonias se hizo en placas de agar Luria, en las que el agente seleccionador fue la ausencia de DAP (ya que la función de éste está siendo reemplazada por el gen *asd* inserto en el plásmido pET21a) y paralelamente, se cultivó en placas del mismo medio con Amp, marcador de resistencia que fue reemplazado por *asd*. En todas las placas que no tenían DAP crecieron transformantes, lo que demostró que estos clones tenían *asd* que se estaba expresando, porque habían complementado la deficiencia Δ *asd* de la cepa hospedera y no crecieron en aquellas que contenían ampicilina.

4.3. Transferencia de los plásmidos a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium χ 3730.

Para los estudios de expresión en *Salmonella*, los plásmidos pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd* y pET-*tbpB*_{B4NT}*asd* fueron transferidos separadamente por electroporación a una cepa *S. entérica* serovar Typhimurium χ 3730 que portaba el plásmido pGP1-2. Esta es una cepa intermediaria entre *E. coli* χ 6212 y la cepa vacuna, *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550, que facilita la transferencia de los plásmidos provenientes de *E.*

coli frente al sistema de restricción-modificación presente en *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550. La cepa intermediaria es un mutante *hsd* con fenotipo $r^- m^+$, en contraste con la cepa vacuna, que es $r^+ m^+$. De este modo el pasaje de los plásmidos por la cepa intermedia permite la metilación del DNA en aquellos sitios reconocidos por la enzima de restricción de la cepa vacuna y así aumenta la eficiencia de transformación en la cepa vacuna.

El sistema de dos plásmidos o sistema dual, comprende el plásmido con el gen a expresar bajo el control del promotor del fago T7 (p_{T7}) y el plásmido pGP1-2 (Tabor y Richardson, 1985, ver apéndice, figura Ap5) que provee la RNA polimerasa del fago T7 para la expresión del gen heterólogo. Esto ocurre al aumentar bruscamente la temperatura del cultivo de 30 a 42°C. El gen de esta enzima, contenido en el plásmido pGP1-2, está bajo el control del promotor izquierdo del fago λ (λp_L). Este promotor está permanentemente inhibido por el represor termosensible cI857, cuando la temperatura está por debajo de 30°C. El represor cI857 inhibe la transcripción a nivel del promotor λp_L a 30°C, pero al subir la temperatura del cultivo a 37°C ó 42°C, el represor se inactiva permitiendo la transcripción del gen de la RNA polimerasa del fago T7. Así, esta enzima, lleva a cabo la transcripción de los genes clonados en los vectores de la familia pET. En este caso, los genes *porA* y *tbpB* clonados en pET21a están bajo el control de p_{T7} , reconocido específicamente por la RNA polimerasa del fago T7. Los plásmidos pET21a (y sus derivados) y pGP1-2 son replicativamente compatibles en el mismo hospedero, ya que difieren en sus orígenes de replicación (colE1 y pA15) y además tienen diferentes marcadores de resistencia, Amp (reemplazado por el gen *asd* en

nuestras construcciones) y Kan, respectivamente (Ausubel, 1991), lo que facilita la presión selectiva.

La transformación se llevó a cabo en forma similar a lo descrito en la sección 3.2.7.2., y para verificar este procedimiento, se eligieron 4 colonias de las obtenidas con la construcción pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*/pGP1-2 y 4 con la construcción pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*/pGP1-2 y se procedió a verificar la presencia simultánea de ambos plásmidos, mediante la extracción de DNA plasmidial como se describe en sección 3.2.2. Todas las colonias escogidas presentaron los dos plásmidos (ver Fig. 5).

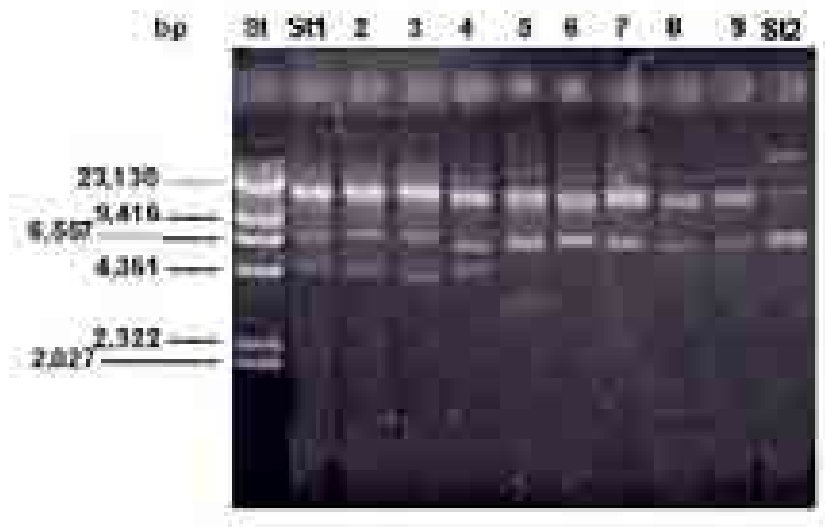


Figura 5. Detección simultánea de plásmidos en los transformantes *S. entérica* serovar Typhimurium χ 3730 con los sistemas duales letal balanceado pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*/pGP1-2 y pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*/pGP1-2.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con Br-Et.

Carril St, estándar de DNA λ -*Hind* III; St1, control de DNA plasmidial del vector pET21-*asd*; St2, control de DNA plasmidial del vector pGP1-2; carril 2 al 5, DNA plasmidial de colonias del clon 10 pET-*tbpB*_{B4:NT}*asd*/pGP1-2; carril 6 al 9, DNA plasmidial de colonias del clon 12 pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*/pGP1-2.

Posteriormente se realizó el estudio de expresión de los antígenos PorA_{B15:P1.3} y TbpB_{B4:NT}. De las 4 colonias portadoras del antígeno PorA_{B15:P1.3}, todas presentaron un nivel de expresión similar al ser inducidas con IPTG 1 mM, lo cual se demostró por Western blot (Fig. 6) y lo mismo ocurrió con las 4 colonias pET-*tbpB*_{B4:NT}*asd*/pGP1-2, todas expresaron el antígeno TbpB_{B4:NT} (Fig. 7).

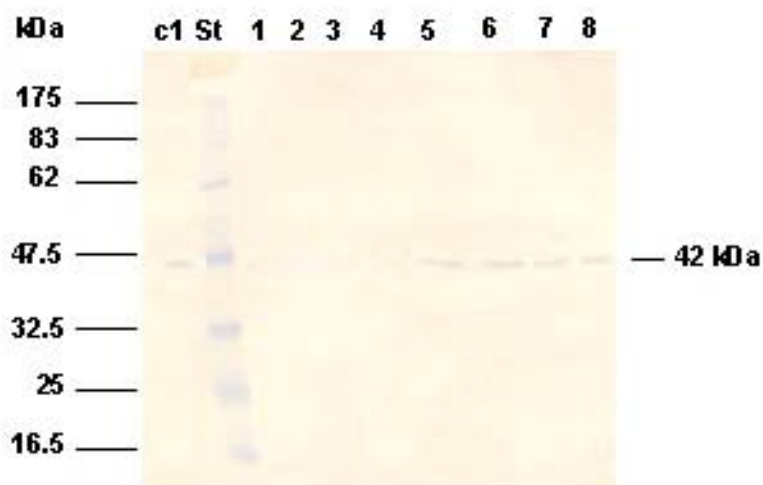


Figura 6. Expresión del antígeno PorA de *N. meningitidis* B15:P1.3, mediante el sistema dual letal balanceado en lisados de *S. entérica* serovar Typhimurium χ 3730, determinada por Western blot.

La separación de las proteínas se realizó en un gel de poliacrilamida-SDS al 8 % y la transferencia a nitrocelulosa de acuerdo a la sección 3.2.9.1. La expresión se realizó según lo descrito en sección 3.2.9.

Carril c1, control positivo del lisado total de pET21-*porA*_{B15:P1.3}*asd* en la cepa de *E. coli* JM109 (DE3); carril St, estandar de peso molecular de proteínas de rango amplio; carriles 1 al 4, lisados totales de 4 transformantes con el sistema dual pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*/pGP1-2 del clon 12 sin inducción de IPTG; carriles 5 al 8 lisados totales de los mismos 4 transformantes con el sistema dual pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*/pGP1-2 del clon 12 con inducción de IPTG 1mM.



Figura 7. Expresión del antígeno TbpB de *N. meningitidis* B4NT, mediante el sistema dual letal balanceado en *S. entérica* serovar Typhimurium χ 3730, determinada por Western blot.

La separación de las proteínas se hizo en un gel de poliacrilamida-SDS al 12 %. La transferencia a nitrocelulosa se desarrolló de acuerdo a la sección 3.2.9.1. La expresión se realizó según lo descrito en sección 3.2.9.

Carril c1, control negativo del lisado total de la cepa *S. typhimurium* χ 3730; carril c2, control positivo del lisado total de pET21-*tbp*_{B4:NT}*asd* en la cepa de *E. coli* JM109 (DE3); carril St, estándar de peso molecular de proteínas rango amplio; carriles 1 al 4, lisados totales de 4 transformantes con el sistema dual pET-*tbp*_{B4:NT}*asd*/pGP1-2 del clon 10 sin inducción de IPTG; carriles 5 al 8 lisados totales de los mismos 4 transformantes con el sistema dual pET-*tbp*_{B4:NT}*asd*/pGP1-2 del clon 10 con inducción de IPTG 1mM.

4.4. Transferencia de los plásmidos que codifican PorA y TbpB de *N.*

***meningitidis* de la cepa *S. enterica* serovar Typhimurium χ 3730 a la cepa vacuna χ 4550 y estudios de expresión en esta última.**

Nuevamente, de los clones de *S. entérica* serovar Typhimurium χ 3730 que expresaron los antígenos PorA y TbpB, se seleccionaron cuatro correspondientes a pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*/pGP1-2 y cuatro a pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*/pGP1-2, y los plásmidos correspondientes fueron extraídos, ya modificados en su patrón de metilación. Estos se introdujeron por electroporación en la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 y de las colonias crecidas se tomaron transformantes de cada construcción, y se hizo el mismo análisis plasmidial y estudios de expresión previamente descritos. Las 5 colonias seleccionadas que contenían los plásmidos pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*/pGP1-2 de *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 expresaron el antígeno PorA, lo que se demostró por “Western blot” (Fig. 8), Además, otras 5 colonias con los plásmidos pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*/pGP1-2 expresaron TbpB, que se demostró de igual forma (Fig. 9).

Así, luego de la inducción por aumento de temperatura del cultivo a 42°C por 30 min, se logró expresar ambos genes (*porA* y *tbpB*) de *N. meningitidis* en los sistemas duales, pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*/pGP1-2 y pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*/pGP1-2, en la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550.

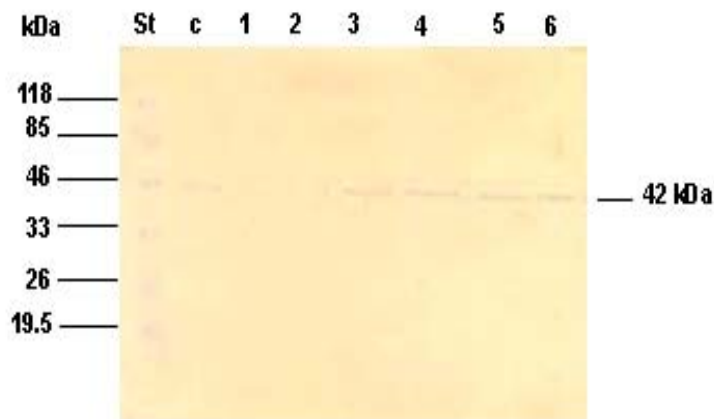


Figura 8. Expresión del antígeno PorA de *N. meningitidis* B15:P1.3, mediante el sistema plasmidial dual letal balanceado en lisados de 5 transformantes de la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550, determinado por Western blot.

La expresión se determinó luego de la separación de las proteínas de extracto total en un gel de poliacrilamida–SDS al 8% seguida de ensayo Western blot como se describió en la Fig. 6.

Carril St, estándar preteñido de proteínas de rango amplio; carril c, control positivo del lisado total de pET21-*porA*_{B15:P1.3}*asd* en la cepa de *E. coli* JM109 (DE3); carril 1, control negativo del lisado total de la cepa *S. typhimurium* χ 4550; carriles 2 al 6, lisados totales de 5 colonias transformantes con el sistema dual pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd*/pGP1-2.



Figura 9. Expresión del antígeno TbpB de *N. meningitidis* B4:NT, mediante el sistema plasmidial dual letal balanceado en lisados de 5 transformantes de la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550, determinada por Western blot.

La separación de las proteínas se realizó en un gel de poliacrilamida-SDS al 8% y la inmunodetección, como se describió para la Fig. 6.

Carril c, control positivo del lisado total de pET21-*tbpB*_{B4:NT}*asd* en la cepa de *E. coli* JM109 (DE3); carril St, estándar preteñido de proteínas rango amplio; carril 1 control negativo del lisado total de la cepa *S. typhimurium* χ 4550; carriles 2 al 6, lisados totales de 5 colonias transformantes con el sistema dual pET*tbpB*_{B4:NT}*asd* /pGP1-2.

4.5. Purificación de las proteínas PorA y TbpB de *N. meningitidis* por electroelución de geles de poliacrilamida.

Para detectar la presencia de los anticuerpos en ratones mediante ensayos ELISA que se describen más adelante, fue necesario preparar grandes cantidades de los antígenos purificados PorA y TbpB. Esto se realizó según el procedimiento descrito en la sección 3.2.10. PorA fue purificada a partir de una fracción de membrana externa de *E. coli* JM109 (DE3) como se indica en la sección 3.2.10, por electroelución de la banda de 42 kDa cortada de un gel de poliacrilamida-SDS al 8% en el cual se separaron las proteínas de membrana externa. La pureza obtenida fue superior al 93% y en los ensayos de “Western blot” se detectó escasa reacción cruzada con otras proteínas. TbpB se obtuvo por electroelución en forma similar a PorA, pero con un rendimiento más bajo, debido a su mayor tamaño y menor nivel de expresión.

4.6. Inmunización de ratones BALB/c con la cepa vacuna que expresa ya sea el antígeno PorA o TbpB de *N. meningitidis* y evaluación de los niveles de anticuerpos.

Para determinar si los antígenos PorA y TbpB podrán ser utilizados para desarrollar una vacuna oral viva contra la infección por *N. meningitidis*, se consideró necesario evaluar inicialmente si éstos eran capaces de inducir anticuerpos específicos al inmunizar ratones por vía intragástrica, con la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 que portaba cada construcción genética con el correspondiente antígeno. Con este fin, se utilizaron ratones BALB/c divididos en grupos de 8 individuos, los que se inmunizaron como se indica en métodos (3.2.12.2). En total, se inocularon

intragástricamente 3 grupos de ratones (uno con el gen del antígeno PorA, uno con el gen del antígeno TbpB y un grupo control al cual se le administró PBS 1X), La inmunización primaria se aplicó en tres dosis día por medio y la inmunización secundaria o “booster”, luego de 50 días. Cada dosis, en un volumen de 200 μ L contenía la suspensión bacteriana correspondiente en un rango de 1×10^7 a 1.2×10^7 UFC, como se detalla en la Tabla 1.

Para determinar si estos antígenos indujeron anticuerpos IgG séricos e IgA en secreciones mucosas (saliva y heces), se tomaron muestras de sangre, heces y saliva, como se indica en métodos (3.2.12.3), 30 días después de la inmunización primaria y 15 días después del “booster”. También se tomaron muestras 1 día antes de la inmunización primaria (muestras preinmunes).

En dichas muestras, luego de procesarlas, como se señala en la sección 3.2.12.3, se determinaron los niveles de anticuerpos anti-PorA y anti-TbpB, del tipo IgG e IgA, mediante la técnica de ELISA, que se describe en 3.2.13. Además, se evaluó la respuesta de anticuerpos frente a un lisado total de la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550. Las lecturas se obtuvieron midiendo D.O. a 405nm.

Los resultados se analizaron de dos maneras. Por un lado, se compararon las lecturas promedios de los ELISA de las muestras pre-inmunes con aquellas tomadas después de la inmunización primaria y secundaria de cada ratón inmunizado, dentro del grupo correspondiente, ya sea con la cepa vacuna expresando el antígeno TbpB (Fig. 10 B, Fig 11B) o PorA (Fig. 10 C, Fig. 11C), y por otro, se calcularon los títulos de anticuerpos alcanzados en cada una de las muestras, determinando la mayor dilución cuya lectura fue estadísticamente significativa (Prueba *t* de Student, $p < 0,05$) y mayor

que las muestras pre-inmunes correspondientes, para la inmunización oral con ambos antígenos (Fig. 12 A y Fig. 12 B, respectivamente).

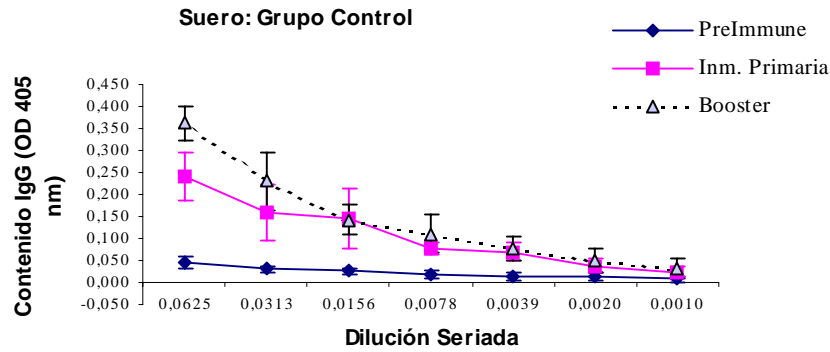
Tabla 1. Protocolo de inmunización en ratones BALB/c con las construcciones que expresan los antígenos PorA y TbpB de *N. meningitidis* en la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550.

Suspensión de vacuna <i>S.entérica</i> var Typhimurium χ 4550					
Nombre del grupo de ratones	Construcción	DOSIS			
		Inmunización primaria *		Inmunización secundaria	
		ufc/200 μ l	D.O. _{.600nm}	ufc/200 μ l	D.O. _{.600nm}
Control	PBS 1X	○	---	○	---
2	pET- <i>tbpB</i> _{B4NT} <i>asd/pGP1-2</i> (clon 10)	1,1 x 10 ⁷	0,4	1,0 x 10 ⁷	0,4
3	pET- <i>porA</i> _{B15:P1.3} <i>asd/pGP1-2</i> (clon 12)	1,2 x 10 ⁷	0,4	1,2 x 10 ⁷	0,4

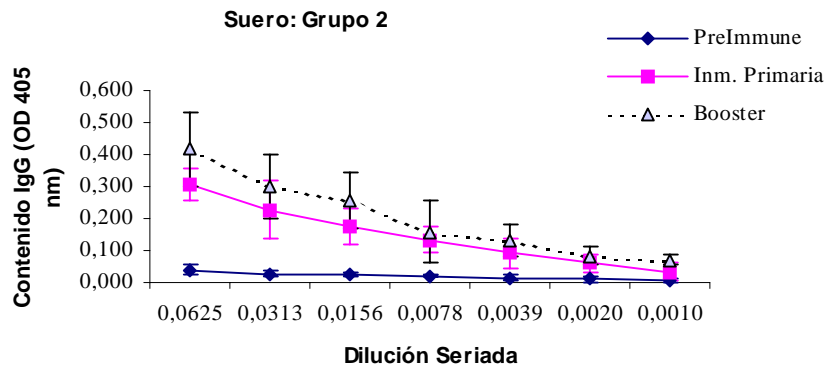
* Valor de ufc es un promedio de las tres dosis de la inmunización primaria.

○ Volumen de PBS 1X aplicando 200 μ l.

A



B



C

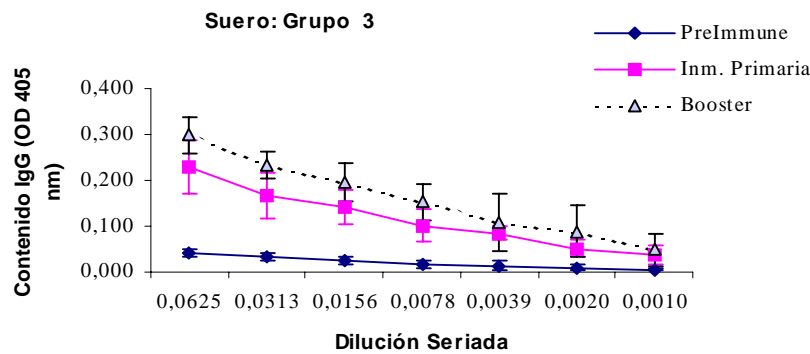


Figura 10. Respuesta sérica de IgG medida por ELISA luego de inmunización oral de ratones BALB/c con la cepa vacuna *S. typhimurium* χ 4550 que lleva el antígeno TbpB_{B4:NT} o el antígeno PorA_{B15:P1.3} de *N. meningitidis*. La inmunización se evaluó en grupos de 8 ratones siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 1. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante microcapilares aplicados retro-orbitalmente según se describe en la sección 3.2.12.3. El ensayo ELISA se realizó en un lector Labsystems Uniskan® I, Flow Laboratories, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 3.2.13. En A) grupo control inmunizado oralmente con 200 μ l de PBS 1X, B) inoculación oral con cepa vacuna χ 4550 pET21- *tbpB*_{B4:NT}asd/pGP1-2, C) inoculación oral con cepa vacuna χ 4550 pET21- *porA*_{B15:P1.3}asd/pGP1-2.

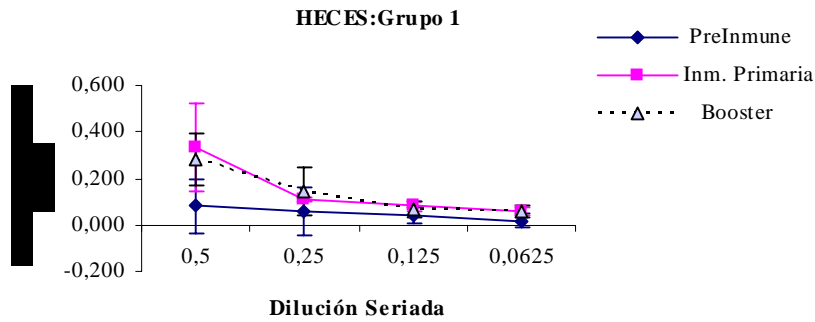
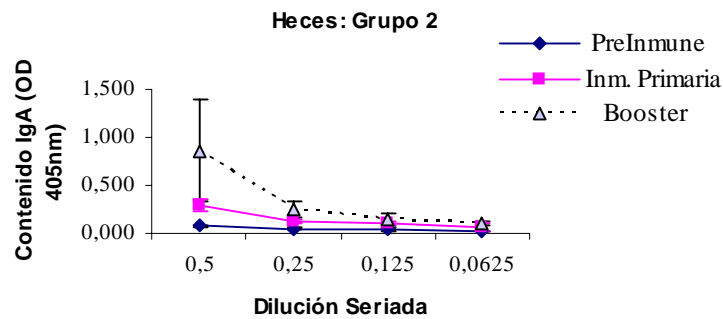
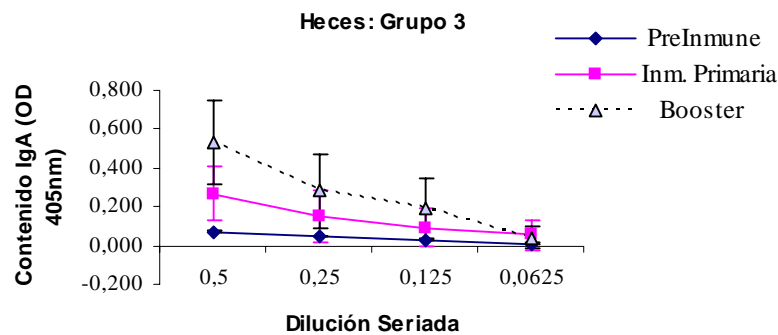
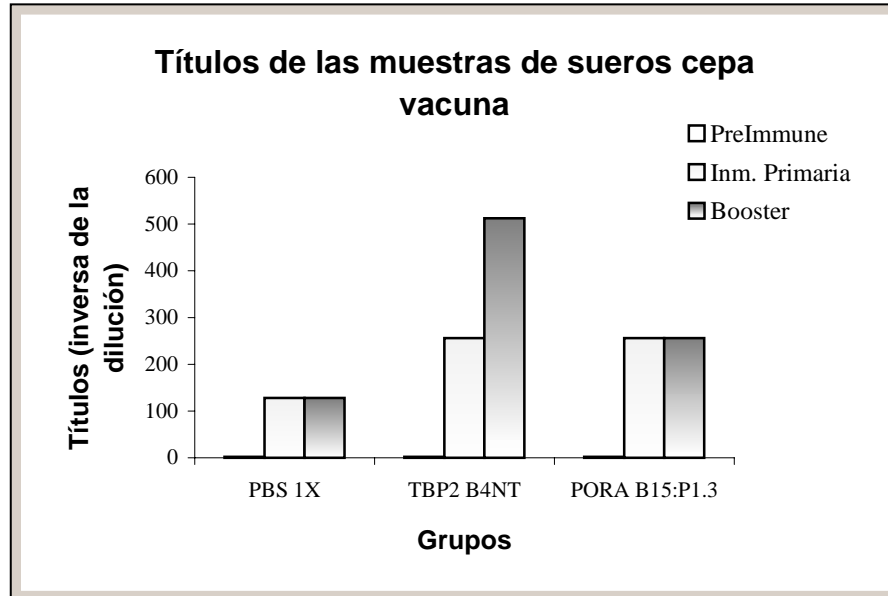
A**B****C**

Figura 11. Respuesta del tipo IgA en heces luego de la inmunización oral de ratones BALB/c con la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 que lleva los antígenos Tbp_{B4:NT} y PorA_{B15:P1.3} de *N. meningitidis*.

El procedimiento de inmunización y la detección de los anticuerpos son similares a los descritos en la Fig. 10. La obtención y preparación de las muestras se describen en la sección 3.2.12.3.

A) grupo control inmunizado oralmente con 200 μ l de PBS 1X, B) inmunización oral con cepa vacuna χ 4550 pET21- *tbp*_{B4:NT}asd/pGP1-2, C) inmunización oral con cepa vacuna χ 4550 pET21- *porA*_{B15:P1.3}asd/pGP1-2.

A



B

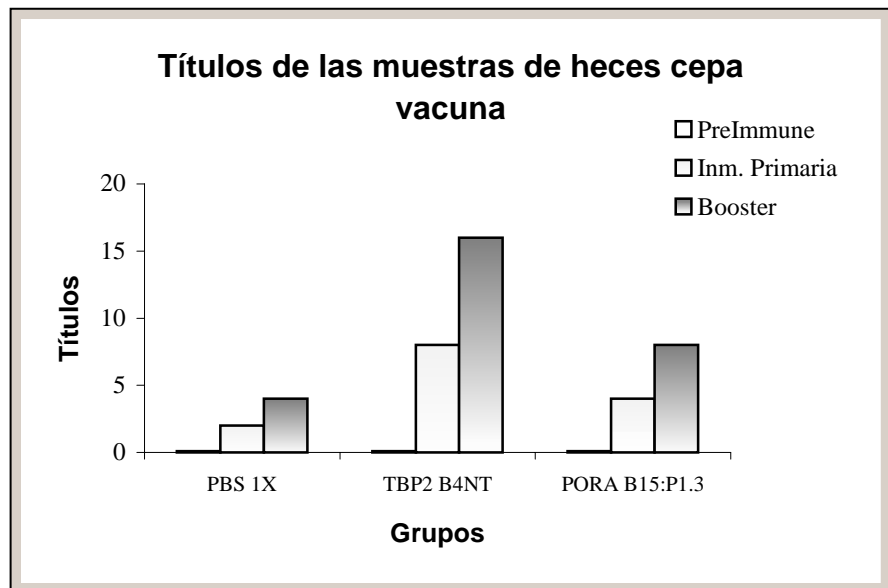


FIGURA 12. Títulos de las respuestas de IgG sérica (A) e IgA fecal (B) inducidas por inmunización oral con los antígenos TbpB_{B4:NT} y PorA_{B15:P1.3} de *N. meningitidis*, expresados en la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550.

Los datos corresponden a aquéllos de las Figuras 10 y 11. Los títulos establecidos se calcularon considerando el valor recíproco de las máximas diluciones de suero o heces de cada grupo de ratones cuyas D.O._{405nm} eran estadísticamente mayor ($p < 0,05$) que la lectura de las respectivas muestras preinmunes.

4.7. Análisis de la respuesta de anticuerpos séricos IgG de ratones BALB/c previamente inmunizados con la cepa vacuna que expresa los antígenos TbpB o PorA de *N.meningitidis*.

4.7.1. Respuesta humoral anti-TbpB.

A partir del análisis de los valores de ELISA (D.O._{405nm}) de las muestras tomadas un mes después de la inmunización primaria y aquellos obtenidos 10 días después de la inmunización secundaria, comparado con las muestras pre-inmunes, se observó que el grupo 2 (construcción pET-*tbpB*_{B4NT}*asd*/pGP1-2) presentó una respuesta significativa de anticuerpos. Esta se reflejó en un título de 512, luego del “booster”, valor que es estadísticamente significativo ($p < 0,05$) con respecto al suero pre-inmune (Fig. 12A). En el grupo control de inmunización con PBS, no se aprecia diferencia significativa entre la D.O._{405nm} de la muestra booster versus la inmunización primaria o la pre-inmune. Además, se aprecia un leve incremento en la D.O._{405nm} por parte del grupo2 (Fig. 10B) respecto al grupo control PBS 1X. El grupo 3 presentó un título sérico más bajo (Fig.12A y 10B).

Las observaciones antes señaladas, sugieren que en este grupo hubo colonización persistente del intestino por la cepa vacuna en concordancia con la buena estimulación lograda con el antígeno TbpB.

4.7.2. Respuesta humoral anti-PorA.

En este caso también se usó el sistema de expresión dual (pET/pGP1-2) para la expresión del antígeno PorA. El título sérico contra este antígeno, según los ELISA realizados fue de 256 (Fig. 12 A), para las muestras inmunización primaria y booster, y

se aprecia un incremento moderado en el promedio de la D.O._{405nm} por parte de este grupo con respecto al grupo control PBS 1X (Fig 10A), en contraste al grupo 2 que presentó un título sérico más alto (Fig 10B). Así se puede establecer que el antígeno PorA es capaz de inducir una leve respuesta sérica y que se mantiene durante el transcurso de la inmunización sin presentar un aumento en el tiempo.

Al igual que en el caso anterior, esto sugiere que en este grupo de ratones, ocurrió colonización intestinal por la cepa vacuna, tal vez en menor grado que con la inmunización realizada con el antígeno TbpB_{B4:NT}.

4.8. Análisis de la respuesta de IgA a nivel de mucosas en ratones BALB/c inmunizados oralmente con la cepa vacuna que expresa los antígenos TbpB o PorA de *N. meningitidis*.

4.8.1. Respuesta de IgA anti-TbpB en secreciones mucosas.

Las muestras fecales de todos los grupos de ratones inmunizados con TbpB presentaron lecturas de D.O._{405nm} mayores que los del respectivo grupo control inmunizado con PBS1X y del grupo 3 (Fig. 11A, 11B y 11C). El título de IgA fecal anti-TbpB alcanzado en la respuesta secundaria fue 16 (Fig. 12B), para los ratones que han recibieron el “booster” luego de 30 días de la inmunización primaria.

En cuanto a las muestras de saliva, debido a la escasa homogeneidad en los volúmenes recolectados fue muy difícil obtener resultados confiables y reproducibles, tanto para IgA anti-TbpB, como para IgA anti-*Salmonella*, en los grupos de ratones estudiados. Por esta razón estos resultados no fueron incluidos.

4.8.2. Respuesta de IgA anti-PorA en secreciones mucosas.

En el grupo 3, se observó una menor respuesta inmune mucosal comparada con el grupo 2. En este caso, los niveles de IgA fecal anti-PorA fueron similares a los niveles de lectura (D.O._{405nm}) obtenidos con el grupo control inmunizado con PBS 1X (Fig. 11A, 11B y 11C). El título de IgA fecal anti-PorA alcanzado en la respuesta secundaria fue tan solo 8 (Fig. 12B).

En las muestras de saliva, como se comentó antes, no se detectó IgA anti-PorA ni anti-Salmonella por las razones ya citadas.

Ensayo de actividad bactericida de los anticuerpos anti-PorA y anti-TbpB del suero de ratones inmunizados.

Con el fin de establecer si los anticuerpos inducidos luego de la vacunación oral con la cepa vacuna que expresa los antígenos TbpB y PorA, tenían algún potencial protector y debido a la falta de un modelo animal adecuado para un buen ensayo de desafío, se evaluó la capacidad bactericida de éstos en un ensayo *in vitro*.

Para el ensayo bactericida, según lo detallado en sección 3.2.14, se trabajó con un inóculo idéntico (1×10^5 ucf/ml) de bacterias para ambas cepas de *N. meningitidis* (B15:P1.3 y B4:NT), los cuales se incubaron con un volumen fijo de 10 uL que correspondía a diluciones seriadas de suero inmune de los ratones vacunados oralmente con la cepa de *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 que portaba los antígenos PorA o TbpB.

Se usaron los sueros de ratones individuales representativos de cada grupo previamente inmunizados y los resultados obtenidos de este ensayo se indican en la

Tabla 2. Luego de incubación con el suero anti-PorA “post-booster” del ratón 30, sólo crecieron 134 colonias de *N. meningitidis* B15:P1.3 al utilizar una dilución 1/16, lo que indica un 85% de eficacia bactericida y un título de 16. Un resultado similar se obtuvo para el suero anti-PorA del ratón 28, donde la dilución 1/16 de éste (post-booster) mostró una eficacia bactericida del 84,3%, alcanzando así un título de 16, idéntico al anterior.

En el caso de los ratones vacunados con la cepa que lleva el antígeno TbpB se realizó el ensayo usando un solo suero disponible proveniente del ratón 24. Este suero post-booster presentó una eficacia del 79,8% en su capacidad bactericida, estableciéndose un título bactericida de 32 (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de los títulos obtenidos en los ensayos bactericidas con los sueros de ratones inmunizados con la cepa vacuna que expresa los genes *porA*_{B15:P1.3} y aquella que expresa *tbpB*_{B4:NT} en *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550 frente a *N. meningitidis* (serogrupos B15:P1.3 y B4:NT).

Suero anti- PorA (Cepa vacuna con sistema dual pET-*porA*_{B15:P1.3}*asd/pGP1-2*)

Diluciones seriadas del suero

Ratón 28	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Inmuniz.Primaria	2	107	112	142	215	367	NC	NC	NC	NC
Booster	18	71	115	139	204	311	NC	NC	NC	NC

Diluciones seriadas del suero

Ratón 30	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Inmuniz.Primaria	0	94	102	350	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Booster	0	0	76	134	321	NC	NC	NC	NC	NC

Controles con la cepa *N. meningitidis* B15:P1.3: C₁ = NC; C₂ = 885 bacterias; C₃ = NC

Suero anti-TbpB (Cepa vacuna con sistema dual pET-*tbpB*_{B4:NT}*asd/pGP1-2*)

Diluciones seriadas del suero

Ratón 24	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Inmuniz.Primaria	23	88	115	180	228	380	NC	NC	NC	NC
Booster	15	43	108	143	194	256	NC	NC	NC	NC

Controles con la cepa *N. meningitidis* B4:NT: C₁ = NC; C₂ = 964 bacterias; C₃ = NC

Simbología:

NC = Número no cuantificable de colonias, gran población bacteriana.

C₁ = Control complemento, 25 μ l tampón Hanks más 10 μ l bacterias y 15 μ l plasma.

C₂ = Control Viabilidad bacteriana, 40 μ l tampón Hanks y 10 μ l bacterias.

C₃ = Control suero sin inmunización, 25 μ l suero pre-inmune más 10 μ l bacterias y 15 μ l plasma.

5. DISCUSION

Esta tesis permitió evaluar, en un modelo murino, la capacidad para inducir una respuesta inmune de los antígenos TbpB y PorA de *N. meningitidis* expresados en una cepa atenuada de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium χ 4550. Esta etapa representa el paso previo para desarrollar posteriormente una vacuna oral viva basada en *S. entérica* serovar Typhi para humanos: Esto requerirá optimizar distintas formulaciones de vacuna viva, incluyendo distintas proporciones de bacterias que expresan ambos antígenos, o bien, mediante la construcción de híbridos entre estas proteínas de *N. meningitidis* que explotan las mejores características inmunogénicas de cada una de ellas.

Se disponía de los antígenos de las cepas chilenas de *N. meningitidis* (B4:NT y B15:P1.3) clonados en el vector de expresión pET21a, incluyendo sus propios péptidos señales de secreción al periplasma (Uribe, 1999). Se optó por este enfoque porque de este modo las proteínas utilizadas como antígenos en la cepa vacuna atenuada serían presentadas en la superficie bacteriana, facilitando la interacción con los componentes de la respuesta inmune en el evento de una infección, luego que el sujeto ha sido vacunado. Al mismo tiempo esto permite que la presentación de los antígenos foráneos en la cepa vacuna sea de una forma lo más parecida posible a como ocurre en la relación natural “hospedero-patógeno” y con la idea de reforzar la respuesta inmune con la participación de epítomos conformacionales que estuviesen presentes en estas proteínas. El vector plasmidial utilizado en la expresión de los genes foráneos incluye además una copia del gen *lacI*, lo que aumenta la carga genética de los antígenos en la

bacteria y al mismo tiempo se traduce en una represión regulable a nivel del operador *lac* en la expresión de los genes bajo el control del promotor de T7 en el vector.

5.1. Expresión de las proteínas TbpB y PorA en *S. entérica* serovar Typhimurium.

Dado el uso potencial de estas proteínas en un sistema de vacuna oral viva, son deseables elevados niveles de expresión para lograr inducir una mejor respuesta inmune en los sujetos vacunados. Por esto debe considerarse el hecho de que un cultivo de laboratorio representa las condiciones ideales para el desarrollo bacteriano y no se asemeja a las condiciones de vacunación.

Debe considerarse que una vez en el hospedero, la bacteria cambia su fisiología dependiendo de las condiciones "*in vitro*", como consecuencia de la adaptación a un medio hostil y no tan rico en nutrientes. Para expresar los antígenos se recurrió al uso de cultivos bacterianos en etapa de crecimiento exponencial para optimizar la expresión de éstos.

Para encontrar y aislar clones de *E. coli* DH5 α y *S. entérica* serovares Typhimurium χ 3730 y χ 4550, que expresaran las proteínas en estudio, se seleccionaron colonias inmediatamente luego de la transformación de las cepas con los DNAs correspondientes a las construcciones en pET21a bajo condiciones de represión de los genes en cuestión. Se consideró adecuado para estos clones crecidos en medio líquido, seleccionar aquellos que dieron el nivel de expresión más alto detectable por ensayos de Western blot en *S. entérica* serovar Typhimurium.

En un inóculo fresco inducido con IPTG 1mM a una D.O._{600nm} de 0.2, a partir de dos horas post-inducción es posible detectar PorA en muestras de lisados bacterianos,

obteniéndose un aumento gradual de la expresión de esta proteína a medida que aumentaba el tiempo de inducción. En contraste, la aparición de TbpB tuvo un retardo luego de iniciada la inducción, no obstante presentó un aumento gradual paulatino a medida que transcurría el tiempo. La explicación a esto podría ser debido a una menor estabilidad del mRNA de TbpB, así como a diferencias en la eficiencia del inicio de la traducción de los mensajeros, lo que podría reflejarse en una menor velocidad de síntesis de proteica. Esto podría cobrar especial relevancia si se considera la expresión de estos antígenos en el hospedero natural (*N. meningitidis*), en que PorA se expresa de forma continua en la superficie bacteriana con un cierto grado de recambio, mientras que TbpB sólo se sintetiza en condiciones de ausencia de hierro. Sin embargo, estos elementos de control de la expresión de TbpB no están operativos en *E. coli* o *S. entérica* serovar Typhimurium, que usan otros sistemas para la captura de fierro (Larson *et al.*, 2002) y además, el promotor T7 presente en las construcciones, sólo es inducible por IPTG en *E. coli* y además por incremento de temperatura cuando los genes se transfieren a *Salmonella*. Otra opción podría ser un efecto diferente a nivel de eficiencia a nivel de traducción por diferencias en el uso del codón al comparar ambos genes.

Esta posibilidad debe tenerse en cuenta dado los distintos tipos de roles fisiológicos que juegan en *N. meningitidis*, lo que puede traducirse en una necesidad de regulación más estricta para TbpB. Un efecto de regulación diferente a nivel transcripcional no es esperable ya que el promotor utilizado en la expresión heteróloga es el mismo para ambos genes.

Con respecto a la detección de estas proteínas, las diluciones de los anticuerpos utilizados fueron de 1:500 para PorA y 1:1000 para TbpB. Esto podría otorgar una

mayor inmunogenicidad de TbpB en conejos y por ser una proteína de *N. meningitidis* con una función especializada, pueda deberse a la existencia de epítomos asociados a la funcionalidad del polipéptido otorgándole un mayor potencial inmunogénico.

La reacción inmune de antisueros de conejos contra TbpB muestra escasa reacción cruzada al expresarla en cepas de *S. entérica* serovar Typhimurium, revelándose de forma bastante definida y clara, en contraste al ensayo de Western blot de PorA, que siempre muestra un grado de reacción cruzada, en particular con bandas de menor tamaño que PorA sugiriendo contaminantes que han sufrido degradación proteolítica ya que no corresponden al patrón de bandas observables en una muestra de PorA con degradación parcial.

5.2. Sistema de expresión en *Salmonella entérica* serovar Typhimurium.

La utilización de un sistema plasmidial dual, basado en los vectores pGP1-2 y pET21a con los genes *tbpB* y *porA* para la expresión de ambas proteínas en *S. entérica* serovar Typhimurium, presenta ciertos inconvenientes como modelo de vacuna para ser evaluado en ratón y eventualmente en el hombre. Estos se relacionan con que cada plásmido tienen un marcador de resistencia a antibiótico distinto, lo cual implicaría que para la permanencia de los plásmidos en las células bacterianas se requiere incorporar estos antibióticos al ratón durante el proceso de vacunación. Esto resulta inadecuado y complejo por decir lo menos, y además, éticamente cuestionable si se plantea su uso en humanos. Por otro lado, el sistema de expresión con el vector pET21a que lleva una copia del gen *lacI* (necesario debido a la inexistencia de *este gen* en el genoma de *S. entérica* serovar Typhimurium), debe requerir la adición de IPTG

durante el crecimiento bacteriano para la síntesis de TbpB o PorA; pero resulta complicado y oneroso la administración de IPTG a ratones. Esto hace al sistema de expresión dependiente de tres compuestos que deben suministrarse simultáneamente al ratón vacunado (ampicilina, kanamicina e IPTG). Para simplificar esto, se usó una cepa vacuna que utiliza el sistema letal balanceado (García de la Guarda, 1998) en que el gen *asd* ha reemplazado al gen de resistencia a ampicilina y los cultivos del inóculo para vacunar han sido previamente inducidos con IPTG, efecto que dura en cultivos *in vitro*, lo que puede extrapolarse a *in vivo*. Esto concuerda con datos de tiempos de duplicación de la bacteria *in vivo* que puede extenderse de 30 min a 5-12 horas (Mims, Playfair, Roitt, Wakelin, William, Anderson, 1993) lo que reduce el efecto de dilución del IPTG intracelular causado por división celular.

Con respecto al plásmido pGP1-2, no se contempló realizar ningún tipo de modificación que lo ligase de forma metabólica a *S. entérica* serovar Typhimurium. Se ha demostrado que para un sistema dual de estas características, en el cual sólo uno de los plásmidos ha sido ligado a la bacteria, éste es capaz de inducir aún una respuesta humoral en un sistema murino (García de la Guarda, 1998).

El requerimiento de kanamicina *in vivo* parece no ser tan necesario ya que bacterias recuperadas luego de 2 semanas de colonizar ratones con *S. entérica* serovar Typhimurium y rescatadas desde bazo e hígado a cultivo Luria sin kanamicina, aún contienen el plásmido pGP1-2 (datos no mostrados).

En relación al sistema letal balanceado aquí utilizado, *S. entérica* serovar Typhimurium χ 3730 así como la cepa vacuna χ 4550, son mutantes *asd*, es decir dependientes estrictos de DAP. Por esto se planteó el clonamiento del gen *asd* de *E.*

coli y su inserción en el vector pET21a para hacer metabólicamente dependiente a la bacteria, evitando así el uso de ampicilina en la administración de la vacuna.

Como se mencionó en métodos, sección 3.2.7.2, la RNA polimerasa del fago T7 codificada por pGP1-2, se encuentra bajo el control del promotor termoinducible P_L del fago λ. Esto significa que el sistema de expresión desarrollado para la evaluación de la vacuna en el modelo animal, se encuentra reprimido durante el cultivo a 30°C. Una vez administrada la vacuna viva, el sistema será inducido por la mayor temperatura corporal del animal, esto significa que en el ratón, la expresión de la RNA polimerasa del fago T7 pasa a ser prácticamente constitutiva. Esto permite mantener una cantidad significativa de moléculas de esta polimerasa dentro de la célula bacteriana, lo que consecuentemente mantendría un apropiado nivel de producción de las proteínas heterólogas TbpB y PorA.

El uso de *Salmonella* como vector de vacunación oral viva atenuada se ha investigado exhaustivamente (Clements *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1997; Sinha *et al.*, 1997; Valentine *et al.*, 1998; Sydenham *et al.*, 2000; Bumann, 2001; Wang *et al.*, 2001). Este enfoque se ha ensayado además en humanos para evaluar la factibilidad de su uso en vacunación de humanos (Levine *et al.*, 1987; Tacket *et al.*, 1997a; Tacket *et al.*, 1997b).

La administración oral de estas vacunas proporciona además la posibilidad de inducir una respuesta inmune mucosal, consistente principalmente en anticuerpos de tipo secretor (fundamentalmente IgA y en menor proporción, IgG). De esta forma, luego de una inmunización, una posterior infección puede ser controlada a nivel de mucosa, evitando el ingreso del microorganismo al hospedero.

Entre las ventajas que ofrece el uso de bacterias vivas atenuadas como vectores de vacunación, está su capacidad de multiplicarse en el hospedero, lo cual proporciona un suministro continuo de antígenos al GALT, de manera semejante a la condición natural de infección y presentando los mismos antígenos que aquéllos presentes cuando el patógeno invade el hospedero. Una ventaja adicional de la bacteria atenuada es la capacidad de inducir protección al antígeno cuando es administrado vía oral frente a la agresión intestinal causada por proteasas y sales biliares, aún después de atravesar la barrera gástrica (Dougan, 1994). Al usar antígenos purificados vía oral, éstos disminuyen significativamente frente a enzimas degradativas pancreáticas y sales biliares en el tracto digestivo.

Además, se ha demostrado que una cepa vacuna del tipo *Salmonella*, a pesar de ser un mutante con virulencia reducida, puede funcionar como portador de antígenos para la estimulación de IgA secretora, debido que aún conserva ciertos determinantes de patogenicidad, como por ejemplo, una invasividad moderada (Curtiss y Kelly, 1987; Dougan *et al.*, 1988), permitiéndole interactuar con el GALT sin causar necesariamente una activación sistémica.

5.3. Inducción de anticuerpos anti-TbpB y anti-PorA en ratones BALB/c

inmunizados con la cepa vacuna *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550.

5.3.1. Inducción de anticuerpos anti-TbpB.

Se evaluó usando las construcciones pET21-*tbpB*_{B4:NT}*asd*/pGP1-2. El mayor título anti-TbpB fue de 512 (Fig. 12A) y se obtuvo en la muestra de suero "booster" de los ratones del grupo 2 (ver Tabla 1), con una dosis de $1,0 \times 10^7$ ufc/200 μ l, como se indica en las secciones 3.2.12.1 y 3.2.12.2. La respuesta de anticuerpos IgG séricos de este grupo de ratones frente a un lisado total de la cepa vacuna (datos no mostrados), fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y alcanzó un título de 256. El hecho de que este grupo haya mostrado una clara respuesta frente al lisado de la cepa vacuna pueda deberse a una eficiente colonización intestinal y estimulación por parte del GALT, por lo cual en este grupo se esperaba además una buena respuesta humoral anti-TbpB. El análisis morfológico a órganos de la cavidad abdominal realizado a ratones de este grupo durante el transcurso de la inmunización oral con la cepa vacuna, evidenció claras señales de invasión de la bacteria observándose inflamación generalizada de hígado, bazo e intestinos. Los ratones vivos que completaron el tratamiento de inmunización presentaron un estado físico óptimo y saludable.

Con respecto a la inmunidad a nivel de mucosas, la inducción de anticuerpos IgA anti-TbpB, en general fue baja. No hubo un incremento significativo en la respuesta de anticuerpos en las muestras de heces (Fig. 11B y 12B). Aunque debe considerarse que este extracto tiene adicionalmente una dilución que corresponde a una suspensión de 100 mg de heces en 100 μ l de PBS 1X lo cual implica un título real de 32.

La falta de una buena respuesta a nivel de mucosas, puede deberse en parte a que la cantidad de antígeno TbpB presentada al GALT haya sido insuficiente para inducir al sistema inmune mucosal. Se esperaba que esta respuesta debía ser potenciada por antígenos bacterianos como el LPS que actúan como adyuvantes frente a mucosas para potenciar aún más la inmunogenicidad.

Por otro lado, pudo ser necesario la evaluación *in vivo* de la eficiencia del promotor con T7 para asegurar una óptima respuesta de IgA específica en las secreciones mucosas.

5.3.2. Inducción de anticuerpos anti-PorA.

En la determinación de anticuerpos séricos de ratones vacunados con la bacteria que expresa el gen *porA* se encontró un nivel de inducción estadísticamente significativo de anticuerpos anti-PorA aunque un poco más bajo que el obtenido para el otro antígeno en estudio. Esto fue tanto a nivel sérico y de mucosas (Fig. 10C, 11C y 12B). También cabe señalar que este grupo de ratones inmunizados con este antígeno PorA presentó respuesta IgG sérica anti-lisado total de la cepa vacuna, con un título de 64, algo más bajo que lo obtenido para TbpB (dato no mostrado). Esto podría interpretarse como una colonización moderada de la cepa vacuna a nivel del tejido linfoide mucosal. Quizás la baja respuesta se deba a una baja inmunogenicidad, lo que podría ser una característica peculiar de esta proteína, o a que sus epítomos se procesen menos eficientemente para su presentación a los linfocitos T a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II).

Es probable que este antígeno induzca una respuesta de tipo celular, lo que no se ha evaluado a la fecha. Esto podría proporcionar un buen nivel de protección en ratones inmunizados, aún a pesar de la baja inducción de anticuerpos. Se han señalados casos en la literatura de antígenos expresados en *Salmonella* que producen una modulación de la respuesta inmune otorgando una respuesta celular protectora en vez de la humoral, en estos casos se presume de la participación directa de citoquinas tipo IL-10 e INF- γ y de células presentadoras de antígenos que producen efectos inhibitorios e inducen tolerancia en los tejidos mucosales modulando la inducción de la respuesta tipo Th1 o Th2 (Elías y Fló, 2002; Williamson *et al.*, 1999; Mizuno *et al.*, 2003).

Se han realizado estudios de que según sea la presentación del antígeno en la superficie mucosal y el diseño de la vacuna, es el tipo de respuesta celular que se obtiene, dependiendo de las citoquinas secretadas por los linfocitos T “helper”. Así, las células tipo Th1 secretan IL-2 e IFN- γ y estas últimas inducen a las células B a secretar IgG_{2a}; por el contrario las células tipo Th2 producen IL-4 e IL-10, entre otras, las cuales intensifican la secreción de IgG₁, IgE e IgA en la superficie de las células B. Es por esto que es posible modificar la inducción y regulación de la respuesta (celular o humoral) según sean los requerimientos de la vacuna contra un blanco específico (Jackson *et al.*, 1993; Xu-Amano *et al.*, 1992).

Con estos resultados se determinó que los ratones BALB/c inmunizados con esta bacteria desarrollan una respuesta inmune apropiada contra epítomos superficiales de *S. entérica* serovar Typhimurium y conlleva a una producción de anticuerpos del tipo IgG y en menor grado IgA.

5.4. Respuesta bactericida de los anticuerpos meningococales inducidos en ratón.

Los ensayos bactericidas séricos son una medición funcional de la capacidad del anticuerpo, el cual, en conjunto con el complemento, tiene la capacidad para matar bacterias y es considerado un parámetro importante en los ensayos de protección de vacunas y como un análisis opcional para medir anticuerpos antimeningococales funcionales *in vivo*.

El ensayo se llevó a cabo según lo descrito en la sección 3.2.14, y analizados los resultados de la Tabla 2, se concluyó que para el antígeno PorA se obtiene un título bactericida de 1:16 y para TbpB 1:32, concordante en parte con los resultados obtenidos de los ensayos medidos por ELISA.

Un ensayo ELISA suministra resultados que se correlacionan cercanamente con las mediciones de actividad funcional del anticuerpo y que son importantes en la protección contra la enfermedad meningococal. No obstante, la administración de la vacuna puede inducir anticuerpos de baja o alta avidéz, siendo ésta reflejada en estos tipos de ensayos y en la naturaleza del antígeno (Granoff *et al.*, 1998).

Los ensayos de unión de patógenos a anticuerpos y su consecuente efecto lítico ofrecen un método más reproducible y conveniente para cuantificar la respuesta inmune frente a la vacunación, sin necesidad de requerir ensayos de desafío, los que descansan en la disponibilidad de un modelo animal validado que no siempre existe, como es el caso de *N. meningitis*, que es un patógeno exclusivo de humanos.

Según investigaciones desarrolladas en el pasado, (Goldschneider *et al.*, 1969a; Goldschneider *et al.*, 1969b; Frasch, 1995), se comenta que mientras más alto es el

título se otorga un mayor margen de seguridad en una protección valorada; y en general, un título $\geq 1:4$ es aceptado como el título umbral protector en Europa, mientras que un título $\geq 1:8$ es considerado aceptable en USA (Santos *et al.*, 2001).

El principal inconveniente con el ensayo bactericida tradicional es que el conteo de colonias no puede ser totalmente automatizado y por esto también es difícil de estandarizar. Además, si se explora la literatura al respecto, los ensayos bactericidas difieren en el número de ufc utilizados por pocillo, tampón de ensayo, condiciones de crecimiento bacteriano, tiempo de incubación, fuente de complemento (aunque se valida el complemento murino tanto como el humano) y dilución sérica de inicio. Además, se han usado distintos amortiguadores bactericidas, pero la solución de Hanks es seleccionada en forma preferente porque es la más usada para ensayos bactericidas frente a *Neisseria* del serogrupo B (Rodríguez *et al.*, 2002).

El uso de complemento humano de adultos sanos tiene ciertas limitaciones ya que contiene anticuerpos adquiridos naturalmente que reaccionan frente a polisacáridos específicos del grupo bacteriano, al LPS o frente a proteínas de membrana externa del meningococo. Estos anticuerpos subyacentes pueden activar el complemento y producir una bacteriolisis meningococal adicional e interferir con los resultados del ensayo (Santos *et al.*, 2001) Por eso es necesario el uso de controles apropiados e incluso, algunos investigadores lo han substituído por suero de conejo como fuente de complemento por su fácil obtención y preparación. Por otro lado, esta fuente de complemento es recomendada por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC, USA) y por la Organización Mundial de la Salud (WHO, USA).

Zollinger y Mandrell (1983), señalaron que con el uso de complemento de conejo, se obtienen títulos bactericidas más altos para la cepa meningococal serogrupo B que si se usa complemento humano.

Los anticuerpos bactericidas presentes en el suero confieren protección contra la enfermedad meningococal, lo cual permite el establecimiento de una sustitución de protección. Hasta la fecha y por más de 25 años de investigación, la mejor solución para predecir la protección de actividad bactericida, es medir los niveles de títulos por el ensayo de Goldschneider *et al.* (1969a) como lo están realizando la mayoría de los investigadores.

5.5. Proyecciones del uso de *S. entérica* serovar Typhimurium como vector vacuna oral viva.

En el presente, las vacunas con el vector *Salmonella* se encuentran en fase experimental y la mayoría de los estudios han sido desarrollados en el modelo murino. Numerosos genes de bacterias, virus, parásitos y otros organismos de origen eucariótico han sido expresados y desarrollados en *Salmonella* atenuada obteniendo distintos resultados favorables.

Se han desarrollado una serie de estrategias para conseguir la expresión estable de antígenos en vectores de *S. entérica* serovar Typhimurium. Una de ellas es el sistema letal balanceado desarrollado por Nakayama *et al.* (1988), que estabiliza la expresión plasmidial, mientras otros enfocan el uso en plásmidos que integran el gen foráneo dentro del cromosoma de *Salmonella* (Strugnell *et al.*, 1990).

Una de las estrategias más efectivas para sobrellevar el problema de la inestabilidad plasmidial es el uso de promotores inducibles *in vivo* (Chatfield *et al.*, 1992), donde el nivel de expresión del antígeno foráneo es baja hasta cuando el vector bacteriano recibe un estímulo del ambiente *in vivo*, intensificando su expresión.

Dunstan *et al.* (1998) estudiaron, en un modelo murino, la capacidad de distintas cepas atenuadas de *S. entérica* serovar Typhimurium, para inducir inmunidad humoral contra el antígeno heterólogo ToxC (subunidad de la toxina tetánica) y evaluaron protección frente al reto con la toxina tetánica. Luego de evaluar cepas *aroA*, *aroAD*, *purA*, *ompR*, *hrtA* y la doble mutante *crp cya*, concluyeron que todas las cepas vacunas expresaron el antígeno en igual magnitud con el sistema empleado en ese trabajo. Además todas, excepto *purA*, colonizaron en niveles similares las placas de Peyer y el bazo de los ratones e indujeron títulos semejantes de anticuerpos específicos del tipo IgG sérico. El aumento del set de promotores con propiedades definidas hace posible ajustar un apropiado nivel de expresión *in vivo* para muchos antígenos foráneos, Esto ayudará a mejorar racionalmente las vacunas basadas en *Salmonella* contra una amplia gama de enfermedades infecciosas .

Así, deben tomarse en cuenta un número de variables para el desarrollo óptimo de una vacuna oral, tal como la localización, regulación y niveles de expresión del antígeno, como también sus propiedades inherentes para ser expresado y el tipo de respuesta inmune requerida, son factores que cuando se combinan podrían afectar en la eficacia de una vacuna multivalente basada en *Salmonella* atenuada.

Basándose en el análisis genético para la obtención de diferentes respuestas a dosis bajas de antígenos y la comprensión de los mecanismos involucrados,

establecemos que el sistema vector *S. entérica* serovar Typhimurium es eficaz para la inducción de inmunidad mucosal a largo plazo y de importancia crucial para establecer nuevas terapias de vacunas o de anti-infección.

Ante lo señalado, se establece una oportunidad para investigar los diferentes aspectos de la respuesta inmune involucrados en la infección natural, y disponiendo de los antígenos y formulaciones adecuadas el desarrollo de una vacuna óptima contra *N. meningitidis* u otros patógenos está cercano.

5.6 Conclusiones de la tesis.

1. El gen *asd*, complementa la delección cromosomal en el gen del mismo nombre de la cepa vacuna χ 4550 y funciona como marcador metabólico de selección tan eficientemente como los marcadores de resistencia a antibióticos.
2. Los antígenos TbpB y PorA de *N. meningitidis* pueden ser expresados en *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550, siendo capaces de inducir una respuesta sérica significativa, siendo el nivel de expresión de TbpB mayor que el de PorA.
3. El sistema dual letal balanceado, es eficiente para inducir anticuerpos séricos anti-TbpB y anti-PorA, en ratones BALB/c inmunizados, según el diseño experimental.
4. TbpB puede ser un mejor candidato que PorA para su utilización en el desarrollo de la vacuna oral viva contra la infección por *N. meningitidis*.

6. BIBLIOGRAFIA

Ala' Aldeen, D.A., Stevenson, P., Griffiths E., Gorringe, A.R., Irons, L.L., Robinson, A., Hyde, S. and Borriello, S.P. (1994) Immune responses in humans and animals to meningococcal transferrin-binding proteins: implications for vaccine design. *Infect. Immun.* 62:2984-2990.

Ala' Aldeen, D.A. (1996) Transferrin receptors of *Neisseria meningitidis*: promising candidates for a broadly cross-protective vaccine. *J. Med. Microbiol.* 44:237-243.

Andreason, G.L. and Evans, G.A. (1988) Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques* 6:650-660.

Ausubel, F.M., Brent, R.R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G. and Struhl, K. Editors. (1990) Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 2, Unit 16.2, Supplement 11. John Wiley & Sons, Inc., USA.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G. and Struhl, K. Editors. (1994) Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 1, Unit 17, Supplement 27. John Wiley & Sons, Inc., USA.

Azmi, F., Lucas, A., Spielberg, H. and Granoff, D. (1995) Human immunoglobulin M paraproteins cross-reactive with *Neisseria meningitidis* group B polysaccharide and fetal brain. *Infect. Immun.* 63:1906-1913.

Barnes, G.L., Lund, J.S., Mitchell, S.V., De Bruyn, L., Piggford, L., Smith, A.L., Furmedge, J., Masendycz, P.J., Bugg, H.C., Bogdanovic-Sakran, N., Carlin, J.B. and Bishop, R.F. (2002) Early phase II trial of human rotavirus vaccine candidate RV3. *Vaccine* 20:2950-2956.

Birboim, H.C. and Dolly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 7:1513-23.

Bjune, G., Gronnesby, J.K., Hoiby, E.A., Closs, O. and Nokleby, H. (1991) Results of an efficacy trial with an outer membrane vesicle vaccine against systemic serogroup B meningococcal disease in Norway. *NIPH Ann.* 14:125-132.

Boulton, I.C., Gorringe, A.R., Shergill, J.K., Joannou, C.L. and Evans R.W. (1999) A dynamic model of the meningococcal transferrin receptor. *J. Theor. Biol.* 198(4):497-505.

Bumann D. (2001) *In vivo* visualization of bacterial colonization, antigen expression, and specific T-cell induction following oral administration of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium. *Infect. Immun.* 69:4618-4626.

Cárdenas, L. and Clements, J.D. (1993) Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. *Vaccine* 11:126-135.

Castillo, L., Maldonado, A., García, J., Silva, W., Ulloa, M., Valenzuela, M.T., Bustos, R., Valenzuela, M.E. and Gassibe, P. (1994) Caracterización de *Neisseria meningitidis* aislada de infecciones sistémicas. Chile 1992-1993. *Rev. Med. Chile* 122: 760-767.

Chassy, B.M., Mercenier, A. and Flickinger, J. (1988) Transformation of bacteria by electroporation. *Biotechniques* 6:303-309.

Chatfield, S.N., Charles, I.G., Makoff, A.J., Oxeer, M.D., Dougan, G., Pickard, D., Slalter, D. and Fairweather, N.F. (1992) Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Bio/Technology* 10:888-892.

Clements, J., Lyon, F., Lowe, K., Farrand, A. and El-Morshidy, S. (1986) Oral immunization of mice. *Infect. Immun.* 53:685-692.

Cripps, A.W., Kyd, J.M. and Foxwell, A.R. (2001) Vaccines and mucosal immunization. *Vaccine* 19:2513-2515.

Curtiss, R.III and Kelly, S. (1987) *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect. Immun.* 55:3035-3043.

De Moraes, J.C., Perkins, B.A., Camargo, M.C., Hidalgo, N.T., Barbosa, H.A., Sacchi, C.T., Landgraf, I.M., Gattas, V.L., Vasconcelos, H. de G., et al (1992) Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 340: 1074-1078. Published erratum appears in *Lancet* 340:1554.

Delidow, B.C., Lynch, J.P., Peluso, J.J. and White, B.A. (1996) Polymerase chain reaction, en "Basic DNA and RNA protocols". Editado por Harwood, A.J., Humana Press Inc., NJ, USA, pp. 275-292.

Dietrich, G., Griot-Wenk, M., Metcalfe, I.A., Lang, A.B. and Viret J.F. (2003) Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine* 21:678-683.

Dougan, G., Chatfield, S., Pickard, D., O' Callaghan, D., Maskell, D. (1988) Construction and characterization of *Salmonella* vaccine strains harbouring mutations in two different *aro* genes. *J. Infect. Dis.* 158(6): 1329-1335.

Dougan, G. (1994) The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. *Microbiology* 140: 215-224.

Dunstan, S., Simmons, C. and Strugnell, R. (1998) Comparison of the abilities of different attenuated *Salmonella typhimurium* strains to elicit humoral immune response against a heterologous antigen. *Infect. Immun.* 66:732-740.

Elías, F. and Fló, J. (2002) Modulation of the immune response mediated by oral transgene administration of IL-10. *Cell. Immun.* 216:73-81.

Emoto, M., Danbara, H. and Yoshikai, Y. (1992) Induction of gamma/delta T cells in murine salmonellosis by an avirulent but not by a virulent strain of *Salmonella choleraesuis*. *J. Exp. Med.* 176: 363-372.

Every, D. and Green, R.S. (1982) Purification of individual proteinase isozymes from *Bacteroides nodosus* by use of polyacrilamide gel electrophoresis, a fluorogenic substrate detection system, and a simple electroelution apparatus. *Anal. Biochem.* 119:82-85.

Fagan, P.K., Djordjevic, S.P., Chin, J., Eamens, G.J. and Walker, M.J. (1997) Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium aroA* expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). *Infect. Immun.* 65:2502-2507.

Finne, J., Leinonen, M. and Mäkelä, P. (1983) Antigenic similarities between brain components and bacterial causing meningitidis. *Lancet* ii: 355-357.

Frasch, C.E., Zollinger, W.D. and Poolman, J.T. (1985) Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev. Inf. Dis.* 7:504-510.

Frasch, C. E. (1995) Meningococcal vaccines: past, present and future, p.245-283. In K. Cartwright (ed.), Meningococcal disease. John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Galán, J., Nakayama, K. and Curtiss, R. III. (1990) Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene* 94: 29-35.

García de la Guarda, R. (1998) Expresión de antígenos de *Helicobacter pylori* en una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium*. Evaluación preliminar de los antígenos recombinantes en un modelo murino, para el desarrollo de una vacuna oral viva. Tesis para obtener el grado de Magíster en Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Germanier, R. (1984) Bacterial Vaccines. Copyright 1984 Academic Press, Inc. ISBN 0-12-280880-0. Chapter 5:137-165.

Goldschneider, I., Gotschlich, E. and Artenstein, M. (1969a) Human immunity to meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J. Exp. Med.* 129:1307-1326.

Goldschneider, I., Gotschlich, E. and Artenstein, M. (1969b) Human immunity to meningococcus. II. Development of natural immunity. *J. Exp. Med.* 129:1327-1348.

Granoff, D., Maslanka, S., Carlone, G., Plikaytis, B., Santos, G., Mokatri, A. and Raff, H. (1998) A modified enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to meningococcal C polysaccharide that correlate with bactericidal responses. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 5: 479-485.

Harokopakis, E., Hajishengallis, G., Greenway, T.E., Russell, M.W. and Michalek, S.M. (1997) Mucosal immunogenicity of a recombinant *Salmonella typhimurium* cloned heterologous antigen in the absence or presence of coexpressed cholera toxin A2 and B subunits. *Infect. Immun.* 65: 1445-1454.

Hart, C.A. and Rogers, T.R (1993) Meningococcal disease. *J. Med. Microbiol.* 39: 3-25.

Haziza, C., Cassan, M. and Patte, J.C. (1982) Identification of the *asd* gene of *Escherichia coli* using in vitro fusion with the *lac* operon. *Biochimie* 64:227-230.

Hone, D.M., Harris, A.M., Chatfield, S., Dougan, G. and Levine, M.M. (1991) Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9:810-816.

Hopkins, S., Kraehenbuhl, J.P., Schodel, F., Potts, A., Peterson, D., de Grandi, P. and Nardelli-Haeffliger, D. (1995) A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect. Immun.* 63:3279-3286.

Jackson, R.J., Fujihashi, K., J, Xu-Amano., Kiyono, H., Elson, C.O. and McGhee, J.R. (1993) Optimizing oral vaccines: Induction of systemic and mucosal B cell and antibody responses to tetanus toxoid by use of cholera toxin as adjuvant. *Infect. Immun.* 61:4272-4279.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Larson, J., Higashi, D., Stojiljkovic, I. and So, M. (2002) Replication of *Neisseria meningitidis* within epithelial cells requires TonB-dependent acquisition of host cell iron. *Infect. Immun.* 70:1461-1467.

Levine, M.M. (1988) Typhoid fever vaccines (Eds Plotkin, S.A. & Mortimer E.A.) WB Saunders Philadelphia. 333-361.

Levine, M., Ferreccio, C., Black, R. and Germanier, R. (1987) Chilean typhoid committee, large scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet* 1:1049-1052.

Levine, M., Ferreccio, C., Cryz, S. and Ortiz, E. (1990) Comparison of enteric coated-capsules and liquid formulation of Ty21a typhoid vaccine in randomised controlled field trial. *Lancet* 336:891-894.

Lissolo, L., Maitree-Wilmotte, G., Dumaas, P., Mignoon, M., Danve, B. and Quentin-Millet, M.J. (1995) Evaluation of transferrin-binding protein 2 within the transferrin-binding complex as a potential antigen for future meningococcal vaccines. *Infect. Immun.* 63:884-890.

Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L. and Tolbert, N.E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87:206-210.

Miller, J.F. (1994) Bacterial transformation by electroporation. *Method. Enzymol.* 235:375-385.

Mims C.A., Playfair J.H.L., Roitt I.M., Wakelin D., Williams R. and Anderson, R.M. (1993) In: "Medical Microbiology", .Ed Mosby Europe Limited, pp. 14.4.

Mizuno, Y., Takada, H., Nomura, A., Jin, C.H., Hattori, H., Ihara, K., Aoki, T., Eguchi, K. and Hara, T. (2003) Th1 and Th1-inducing cytokines in *Salmonella* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 131:111-117.

Nakayama, K., Kelly, S.M. and Curtiss, R.III. (1988) Construction of an *asd*⁺ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Biotechnology* 6: 693-697.

Pintor M., Gómez J.A., Ferron L., Ferreiros C.M. and Criado M.T. (1998) Analysis of TbpA and TbpB functionality in defective mutants of *Neisseria meningitidis*. *J. Med. Microbiol.* 47:757-760.

Poolman, J.T., Hopman, C.T. and Zanen, H.C. (1983) Immunogenicity of meningococcal antigens as detected in patient sera. *Infect. Immun.* 40: 398-406.

Reingold, A.L., Broome, C.V., Hightower, A.W., Ajello, G.W., Bolan, G.A., Adamsbaum, C., Jones, E.E., Phillips, C., Tiendrebeogo, H. and Yada, A. (1985) Age-specific differences in duration of clinical protection after vaccination with meningococcal polysaccharide A vaccine. *Lancet* 2(8447):114-8.

Rodríguez, T., Lastre, M., Cedré, B., del Campo, J., Bracho, G., Zayas, C., Taboada, C., Díaz, M., Sierra, G. and Pérez, O. (2002) Standardization of *Neisseria meningitidis* serogroup B colorimetric serum bactericidal assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:109-114.

Rokbi B., Mignon M., Maitre-Wilmotte G., Lissolo L., Danve B., Caugant D. and Quentin-Millet M. (1997) Evaluation of recombinant transferrin-binding protein B variants from *Neisseria meningitidis* for their ability to induce cross-reactive and bactericidal antibodies against a genetically diverse collection of serogroup B strains. *Infect. Immun.* 65:55-63.

Rosenqvist, E., Hoiby, E. A., Bjune, G., Bryn, K., Closs, O., Feiring, B., Klem, A., Nokleby, H. and Frohm, L.O. (1991) Human antibody responses after vaccination with the Norwegian group B meningococcal outer membrane vesicle vaccine: results from ELISA studies. *NIPH Ann.* 14: 169-179.

Rosenstein, N., Levine, O., Taylor, J.P., Evans, D., Plikaytis, B.D., Wenger, J.D. and Perkins, B.A. (1998) Efficacy of meningococcal vaccine and barriers to vaccination. *JAMA* 279(6):435-439.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Santos, G., Deck, R., Donnelly, J., Blackwelder, W. and Granoff, D. (2001) Importance of complement source in measuring meningococcal bactericidal titers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8:616-623.

Saukkonen, K., Abdillahi, H., Poolman, J.T. and Leinonen, M. (1987) Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model; new prospects for vaccine development. *Microb. Pathogen.* 3:261-267.

Shigekawa, K. and Dower, W. (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* 6:742-751.

Sierra, G.V., Campa, H.C., Varcacel, N.M., García, I.L., Izquierdo, P.L., Sotolongo, P.F., Casanueva, G.V., Rico, C.O., Rodriguez, C.R. and Terry, M.H. (1991) Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann.* 14: 195-207.

Sinha, K., Mastroeni, P., Harrison, J., Demarco, R. and Hormaeche, C. (1997) *Salmonella typhimurium aroA, hrtA, and aroD hrtA* mutants cause progressive infections in athymic (nu/nu) BALB/c mice. *Infect. Immun.* 65: 1566-1569.

Strugnell, R.A., Maskell, D., Fairweather, D., Pickard, A., Cockayne, C., Penn, C. and Dougan, G. (1990) Stable expression of foreign antigens from the chromosome of *Salmonella typhimurium* vaccine strains. *Gene* 88:57-63.

Sydenham, M., Douce, G., Bowe, F., Ahmed, S., Chatfield, S. and Dougan, G. (2000) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *surA* mutants are attenuated and effective live oral vaccines. *Infect. Immun.* 68:1109-1115.

Tabor, S. and Richardson C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1074-8.

Tacket, C., Sztein, M., Losonsky, G., Wasserman, S., Nataro, J., Edelman, R., Pickard, D., Dougan, G., Chatfield, S.N and Levine, M. (1997a) Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune response in humans. *Infect. Immun.* 65:452-456.

Tacket, C., Kelly, S., Shodel, F., Losonsky, G., Nataro, J., Edelman, R., Levine, M. and Curtiss, R. (1997b) Safety and immunogenicity in humans of an attenuated encoded hepatitis B antigens stabilized by the *asd-* balanced lethal system. *Infect. Immun.* 65: 3381-3385.

Tappero, J.W., Lagos, R., Maldonado, A., Plikaytis, B., Williams, D., Dykes, J., Gheeling, L.L., Carlone, G.M., Hoiby, E.A., Holst, J., Nokleby, H., Rosenqvist, E., Sierra, G., Campa, C., Sotolongo, F., Vega, J., García, J., Herrera, P., Poolman, J.T. and Perkins, B.A. (1999) Immunogenicity of 2 serogroup B outer membrane protein meningococcal vaccines. *JAMA* 281:1520-1527.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7897-7901.

Uribe, F. (1999) Expresión en *Salmonella* de las proteínas TbpB y PorA de *Neisseria meningitidis* para el diseño de una vacuna oral viva. Tesis para obtener el grado de Magíster en Bioquímica y título profesional de Bioquímico. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Valentine, P., Devore, B. and Heffron, F. (1998) Identification of the three highly attenuated *Salmonella typhimurium* mutants that are more immunogenic and protective in mice than a prototypical *aroA* mutant. *Infect. Immun.* 68: 1196-1201.

Von Boehmer, H. and Kisielow, P. (1990) Self-nonsel self discrimination by T cells. *Science* 248:1369-1373.

Wahdan, M.H., et al. (1984) A controlled field trial of live oral typhoid vaccine Ty21a. *Bull World Health Organ.* 58:46-474.

Wannig, J., Pasetti, M., Noriega, F., Anderson, R., Wasserman, S., Galen, J., Szeiinn, M. and Levine, M. (2001) Construction, genotypic and phenotypic characterization and immunogenicity of attenuated *Δgua* BA *Salmonella enterica* serovar *Typhi* strain CVD 915. *Infect. Immun.* 69: 4734-4741.

Weston, A., Brow, M.G.M., Perkins, H.R., Saunders, J.R. and Humphreys, G.O. (1981) Transformation of *E. coli* with plasmid deoxyribonucleic acid: calcium induced binding of deoxyribonucleic acid to whole cells and to isolated membrane fractions. *J. Bacteriol.* 145:780-787.

Williamson, E., Westrich, G. and Viney, J. (1999) Modulating dendritic cells to optimize mucosal immunization. *J. Immunol.* 163:3668-3675.

Xu-Amano, J., Kiyono, H., Jackson, R.J., Staats, H.F., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Elson, C.O., Pillai, S. and McGhee, J.R. (1993) Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: Oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa-associated tissues. *J. Exp. Med.* 168:1309-1320.

Zhang, X., Kelly, S., Bollan, W. and Curtiss, R. (1997) Characterization and immunogenicity of *Salmonella typhimurium* SL1344 and UK- 1 *Δcrp* and *Δcdt* deletion mutants. *Infect. Immun.* 64: 5381-5387.

Zollinger, W.D., and Mandrell, R.E. (1983) Importance of complement source in bactericidal activity of human antibody and murine monoclonal antibody to meningococcal group B polysaccharide. *Infect. Immun.* 40:257-264.

Zollinger, W.D., Boslego, J., Moran, E., García, C., Ruiz, S., Brandt, B., Martinez, M., Arthur, J., Underwood, P. et al (1991) Meningococcal serogroup B vaccine protection trial and follow-up studies in Chile. The Chilean National Committee for Meningococcal Disease. *NIPH Ann.* 14:211-212; discusión 213.

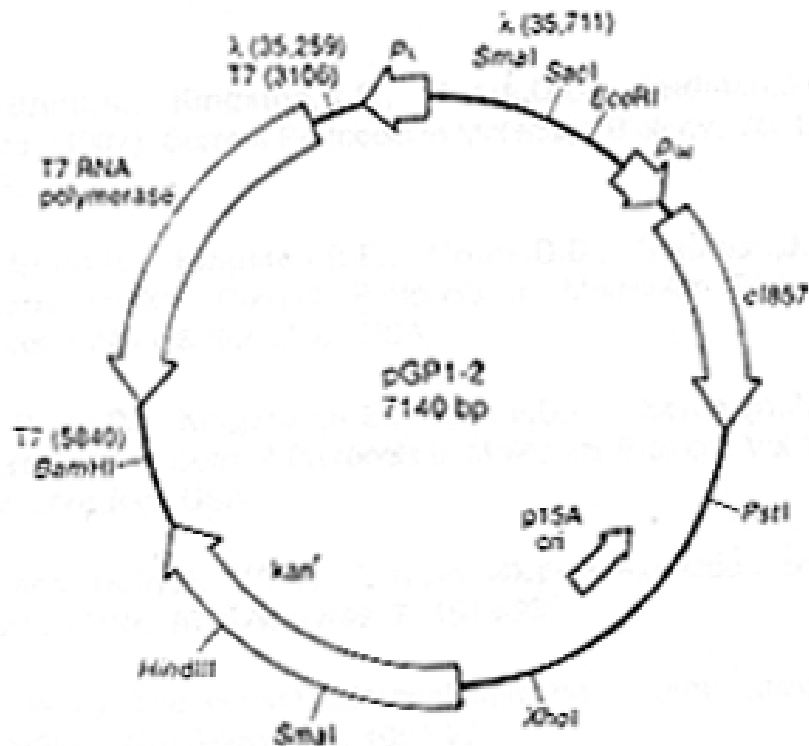


Figura Ap2. Mapa físico del plásmido pGP1-2 que porta el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor izquierdo del fago λ (λP_L) inducible por temperatura. Su origen de replicación es compatible con el de los vectores de la familia pET, por lo que, al cotransformarlo con alguno de éstos en una célula de *E. coli* o *Salmonella*, permite la expresión de los genes clonados en pET bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del fago T7.

Figura Ap3. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida gen *tbpB* cepa *N. meningitidis* B4:NT. Número total de bases: 2148

10	20	30	40	50	60
ATGAACAATCCATTGGTAAATCAGGCTGCTATGGTGCTGCCGGTGTGTTTTGTTGAGTGCT					
M	N	N	P	L	V
N	Q	A	A	M	V
L	P	V	F	L	L
S	A				
70	80	90	100	110	120
TGTTTTGGGCGGAGGCGGCGGCAGCTTCGATCTTGATTCTGTGATACCGAAGCCCCGCGT					
C	L	G	G	G	G
S	F	D	L	D	S
V	D	T	E	A	P
R					
130	140	150	160	170	180
CCCCGCGCCAAAGTATCAAGATGTTTCTTCCGAAAAAACCGCAAGCCCAAAAGACCAAGGC					
P	A	P	K	Y	Q
D	V	S	S	E	K
T	A	S	P	K	D
Q	G				
190	200	210	220	230	240
GGATACGGTTTTGCAATGCGCTTCAAGCGGCGGAATCGGCATCCTATGGTGATTCCGAAA					
G	Y	G	F	A	M
R	F	K	R	R	N
R	H	P	M	V	I
P	K				
250	260	270	280	290	300
GAAACCGAGGTTAAACTGAACCCAAATGATTGGGAGGCGACGGGATTACCGACAGAACCC					
E	T	E	V	K	L
N	P	N	D	W	E
A	T	G	L	P	T
E	P				
310	320	330	340	350	360
AAGAAACTGCCATTAATAACAAGAATCCGTCATTTCAAAAGTACAAGCAAACAATGGCGAC					
K	K	L	P	L	K
Q	E	S	V	I	S
K	V	Q	A	N	N
G	D				
370	380	390	400	410	420
AACAAACAATATTTTACACTTCCCCCTATCTCACGCAATCAAACCATCAAAACGGCAACT					
N	N	N	I	Y	T
S	P	Y	L	T	Q
S	N	H	Q	N	G
N	T				
430	440	450	460	470	480
GGCAACGGTGTAACCAACCTAAAAATCAGGCAAAAGGTTACGAAAATTTCCAATATGTT					
G	N	G	V	N	Q
P	K	N	Q	A	K
G	Y	E	N	F	Q
Y	V				
490	500	510	520	530	540
TATTCCGGCTGGTTTTACAAACATGCTAAACCAACCATAGATCAATCCCAAAAAAATTT					
Y	S	G	W	F	Y
K	H	A	K	P	T
I	D	Q	S	Q	K
K	F				
550	560	570	580	590	600
CAACAAGGCGACGACGGTTATATCTTTTATCACGGCAAAGAACCTTCCCGACAACCTTCCC					
Q	Q	G	D	D	G
Y	I	F	Y	H	G
K	E	P	S	R	Q
L	P				

610 620 630 640 650 660
GCTTCTGGAAAAGTTACCTACAAAGGTGTGTGGCATTGTAACCGATAACGAAACAGAGA
A S G K V T Y K G V W H F V T D T K Q R

670 680 690 700 710 720
CAAAAATTTAACGATATTCTTGAAACCTCAAAAGGGCAAGGCGACAAATATAGCGGATTT
Q K F N D I L E T S K G Q G D K Y S G F

730 740 750 760 770 780
TCGGGCGATGAAGGCGAAACAACCTTCCAATAGAACTGATTCCAACCTTAATGGGAATCAC
S G D E G E T T S N R T D S N L N G N H

790 800 810 820 830 840
GAGGGTTATGGTTTTACCTCGAATTTAGAAGTGGATTTGACAATAAGAAATTGACGGGC
E G Y G F T S N L E V D F D N K K L T G

850 860 870 880 890 900
AAACTGATACGCAATAATAGAGTTACAAACGCTACTACTGGCGACAAACATACCACGCAA
K L I R N N R V T N A T T G D K H T T Q

910 920 930 940 950 960
TATTACAGCCTCGAGGCTCAAGTAACAGGCAACCGCTTCAACGGCAAGGCGATGGCAACC
Y Y S L E A Q V T G N R F N G K A M A T

970 980 990 1000 1010 1020
GCAAACCCGGCAACGGCGAAACCAACAACATCCTTTGGTTCCGACTCGCTTCTTTGAGC
A N P A T A K P N N I L W F R L A S L S

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GGCGGCTTTTTTCGGCCCGAAGGGTGAAGAATTGGGTTTTTCGCTTTTTGAGCGACGATAAA
G G F F G P K G E E L G F R F L S D D K

1090 1100 1110 1120 1130 1140
AAAGTTTCGGTTGTCTGGCAGCGCGAAAACCAAAGCAAAGACGCAAATGGCAATACTGAGG
K V S V V G S A K T K A K T Q M A I L R

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CGGCGTTTCAGGCGGCACAGGTCGGCAGCATCGGGCGGTCGGCAGCTATGCCGTCTGAAAA
R R S G G T G R Q H R A V G S Y A V - K

1210 1220 1230 1240 1250 1260
CGGTAAGCTGACCACGGTTTTGATGCGGTTCGAGCTGACGCACGGTGGCACAGCAATCAAA
R - A D H G F D A V E L T H G G T A I K

1270 1280 1290 1300 1310 1320
| | | | | |
AAACTCGACAACCTTCAGCAACGCCGCCAACTGGTTGTCGACGGCATTATGATTCCGCTC
K L D N F S N A A Q L V V D G I M I P L

1330 1340 1350 1360 1370 1380
| | | | | |
CTGCCCCGAGGCTTCCGAAAAGTGGGAACAACCAAGCCAATCAAGGTACAAACGGCGGAACA
L P E A S E S G N N Q A N Q G T N G G T

1390 1400 1410 1420 1430 1440
| | | | | |
GCCTTTACCCGCAAATTTGCCACACGCCGAACAGCGATGAAAAAGACACCCAAGCAGGT
A F T R K F A H T P N S D E K D T Q A G

1450 1460 1470 1480 1490 1500
| | | | | |
ACGGCGGAGAATGGCAATCCAGCCGCTTCAAATACGGCAGGTGATACCAATGGCAAAAACA
T A E N G N P A A S N T A G D T N G K T

1510 1520 1530 1540 1550 1560
| | | | | |
AAAACCTATGCAGTCGAAGTCTGCTGTTCCAACCTCAATTATCTGAAATACGGGTTGCTG
K T Y A V E V C C S N L N Y L K Y G L L

1570 1580 1590 1600 1610 1620
| | | | | |
ACACGCAAAACCCCGGCAACACGGTGGAAGGCGGCAACGGCAGCCCAACCGCCGCCAAA
T R K T P A T R W K A A T A A Q P P P K

1630 1640 1650 1660 1670 1680
| | | | | |
CGGCACAGGGTGCACCAAAGTATGTTCNTCCAAGGCGAGCGCACCGATGAAAACAAGATT
R H R V H Q S M F X Q G E R T D E N K I

1690 1700 1710 1720 1730 1740
| | | | | |
CCAAGCGAGCAAAACGTCGTTTATCGGGGTCTTGGTACGGGCATATCGCCGGCAGCACA
P S E Q N V V Y R G S W Y G H I A G S T

1750 1760 1770 1780 1790 1800
| | | | | |
AGCTGGAGCGGCAATGCTTCCAATGCAACGAGTGGCAACAGGGCGGAATTTACTGTGAAT
S W S G N A S N A T S G N R A E F T V N

1810 1820 1830 1840 1850 1860
| | | | | |
TTCGATACGAAAAAATTAACGGCAAGTTAACCGCTGAAAAACAGGCAGGAGGCAGCCTTT
F D T K K I N G K L T A E N R Q E A A F

1870 1880 1890 1900 1910 1920
| | | | | |
ACCATTGAGGGAACGATTCAGGACAACGGCTTTGAAGGTACGGCAAAAACCTGCTGACTTA
T I E G T I Q D N G F E G T A K T A D L

1930	1940	1950	1960	1970	1980
GGTTTTGATCTCGATCAAAGCAATACCACCGGCACGCCTAAGGCATATTACACAGATGCC					
G	F	D	L	D	Q
S	N	T	T	G	T
P	K	A	Y	Y	T
D	A				
1990	2000	2010	2020	2030	2040
AAGGTGAAGGGCGGTTTTTACGGGCCTAAAGCCGAAGAGTTGGGCGGATGGTTTTGCCTAT					
K	V	K	G	G	F
Y	G	P	K	A	E
E	L	G	G	W	F
A	Y				
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CCGGGCGATAAAACAAACGGAAAAGGCAACGGTTACATCCGGCGATGGAAATTCAGCAAGC					
P	G	D	K	Q	T
E	K	A	T	V	T
S	G	D	G	N	S
A	S				
2110	2120	2130	2140		
AGTGCAACTGTCGTATTTCGGTGCGAAACGCCAAAAGCCTGTGCAATAA					
S	A	T	V	V	F
G	A	K	R	Q	K
P	V	Q	-		

1 tattgtccgc actgccgctt gcggccggtg ccgatgtcag cctatacggc gaaatcaaag
61 ccggcggtgga aggcaggaac taccagctgc aattgactga agcacaagcc gctaacgggtg
121 gagcgagcgg tcaggtaaaa gttactaagg ccaaaagccg catcaggacg aaaatcagtg
181 atttcggctc gtttatcggc ttttaagggga gtgaggattt gggcgacggg ctgaaggctg
241 tttggcagct tgagcaagac gtatccggtg ccggcggcgg cgcgaccag tggggcaaca
301 gggaaatcctt tatcggcttg gcaggcgaat tcggtagcgt gcgcgcgggt cgcggttgcga
361 atcagtttga cgatgccagc caagccattg atccttggga cagcaataat gatgtggctt
421 cgcaattggg tattttcaaa cggcacgacg atatgccggt ttccgtacgc tacgattccc
481 ccgaattttc cggtttcagc ggcagcgtcc aattcgttcc ggcccaaac agcaagtccg
541 cctatacggc ggctactctt gctaattggtg ctaataatac aattattcgc gttccggctg
601 ttgtcggcaa gcccggatcg gatgtgtatt atgccggtct gaattacaaa aatggcgggtt
661 ttgccgggaa ctatgccttt aaatatgcga gacacgcca tgtggggcgt gatgctttta
721 atttgttctt gcttgggagc atcggcgatg atgatgaagc caaaggtagc gatcccttga
781 aaaaccatca ggtacaccgc ctgacgggag gctatgagga aggcggcttg aatctcgcct
841 tggcggctca gttggatttg tctgaaaatg gcgacaaaac caaaaacagt acgaccgaaa
901 ttgccgccac tgcttcttac cgcttcggta atgcagttcc gcgcatcagc tatgcccatg
961 gtttcgactt tatcgaacgc ggtaaaaaag gcgaaaatac cagctacgat caaatcatcg
1021 ccggcggttg ttatgatttt tccaaacgca cttccgcat cgtgtctggc gcttggctga
1081 aacgcaatac cggcatcggc aactacactc aaattaatgc cgcctccatc ggtttgcgcc
1141 acaaattcta a

Figura Ap4. Secuencia nucleotídica deducida del gen *porA* cepa *N. meningitidis* B15:P1.3. Número total de bases: 1151.

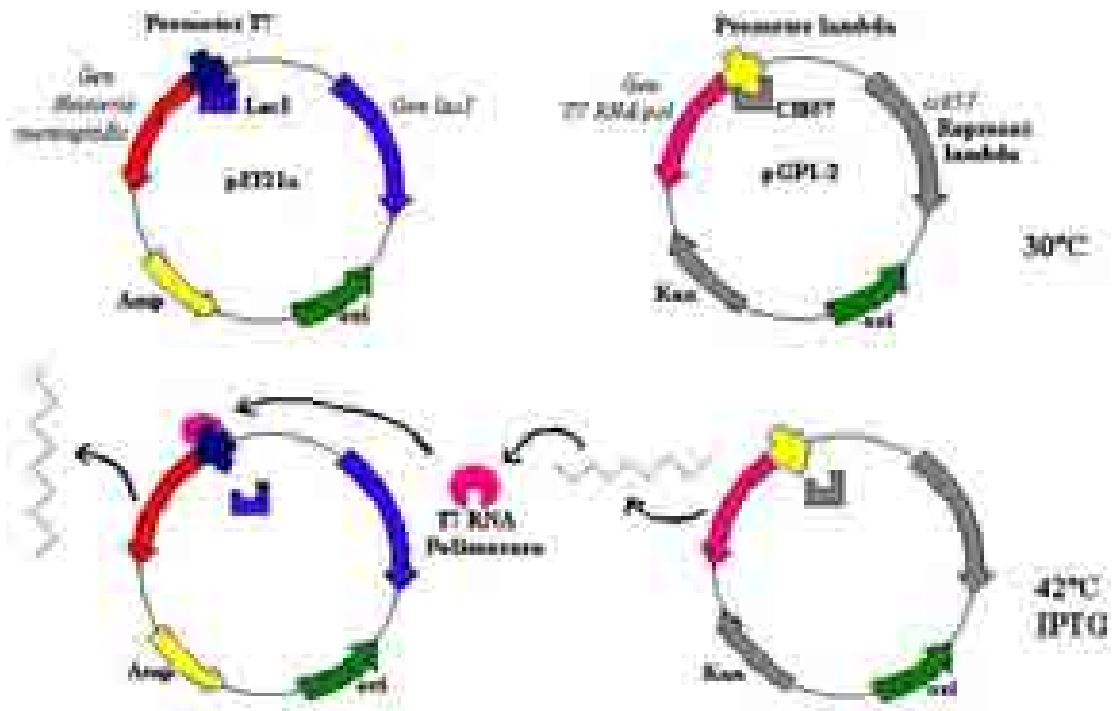


Figura Ap5. Esquema del sistema de expresión plasmidial dual letal balanceado, utilizado en *S. entérica* serovar Typhimurium χ 4550. La expresión utiliza 2 plásmidos, los vectores pET21a y pGP1-2. Este último aporta el gen de la RNA polimerasa del fago T7. En este caso la expresión requiere tanto de un estímulo químico como de uno térmico. El primero lo representa la adición de IPTG al medio de cultivo. El segundo está dado por la labilidad térmica del represor λ , que es incapaz de unirse y bloquea el promotor P_L del fago λ .

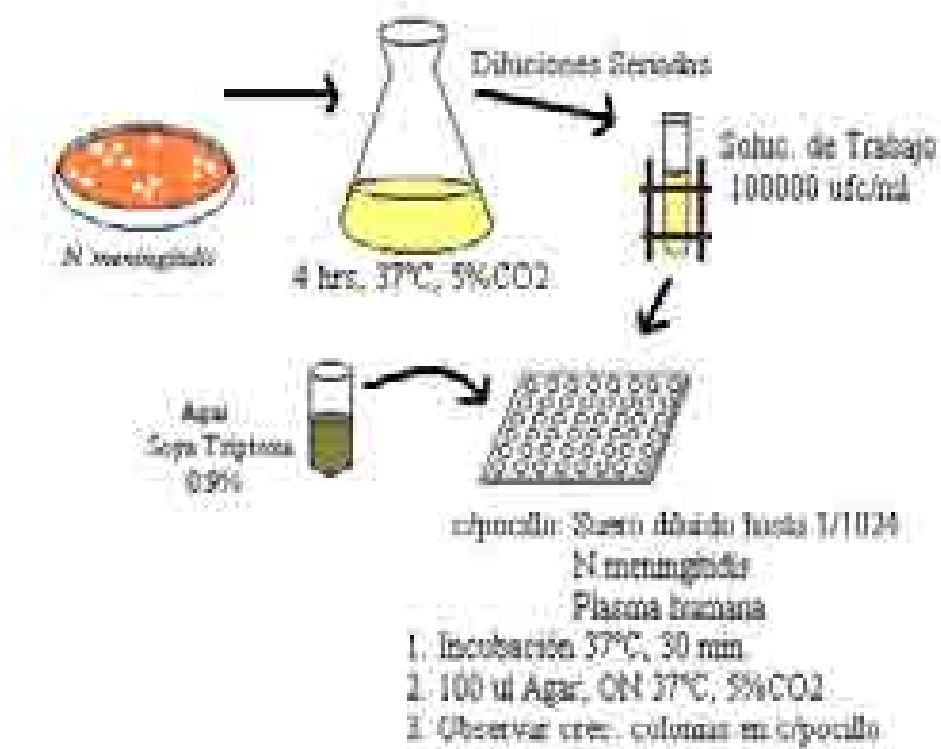


Figura Ap6. Esquema del ensayo bactericida cepa *N. meningitidis* serogrupos B15:P1.3 y B4:NT. La bacteria se incuba en placa con agar cerebro-corazón, realizándose trasposos consecutivos por 3 días para finalmente obtener un crecimiento bacteriano confluyente en incubación por 4 h. a 37°C y CO₂ 5%. Posteriormente, se realizan diluciones de ésta en solución de Hanks, pH7,2; preparándose una “solución de trabajo” con aproximadamente 1×10^5 ufc/ml. En cada pocillo de una placa de microtitulación se agregan en dilución seriada las muestras de suero de ratones inmunizados, la solución de trabajo bacteriana, plasma como fuente de complemento y solución de Hanks. Posteriormente, se incuba 30 min a 37°C y se añade a cada pocillo agar soya-triptona 0,9%; incubándose toda la noche a 37°C en CO₂ 5% para observar finalmente bajo microscopio óptico el crecimiento bacteriano y la capacidad bactericida del suero.