

FINLAY
INSTITUTO



**Obtención y caracterización de una nueva
estructura coclear con capacidad adyuvante
derivada del proteoliposoma de *Vibrio cholerae* O1**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Lic. Reinaldo Acevedo Grogues

Tutores: Dr. Oliver G. Pérez Martín, DCs. Médicas

Lic. José Luis Pérez Quiñoy, DCs. Farmacéuticas

Asesora: Dra. Valerie Anne Ferro

La Habana

2011

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS EMPLEADOS.....	i
SÍNTESIS.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
II.1 Adyuvantes vacunales.....	9
<i>II-1.1 Adyuvantes inmunoestimuladores y polarizadores.....</i>	<i>11</i>
<i>II-1.2 Sistemas de liberación.....</i>	<i>13</i>
<i>II-1.3 Adyuvantes mucosales.....</i>	<i>15</i>
II-2 Proteoliposomas derivados de microorganismos.....	18
<i>II-2.1 Caracterización estructural de los proteoliposomas.....</i>	<i>19</i>
II-3 Estructuras Cocleares.....	20
<i>II-3.1 Cocleatos derivados de proteoliposomas bacterianos.....</i>	<i>21</i>
<i>II-3.2 Aplicaciones de los cocleatos.....</i>	<i>22</i>
II-4 Principales bacterias causantes de enfermedades diarreicas.....	24
<i>II-4.1 Vibrio cholerae.....</i>	<i>24</i>
<i>II-4.1.1 El cólera.....</i>	<i>25</i>
<i>II-4.1.2 Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad.....</i>	<i>25</i>
<i>II-4.1.3 Respuesta inmune.....</i>	<i>26</i>
<i>II-4.2 Salmonella.....</i>	<i>28</i>
<i>II-4.2.1 La Fiebre Tifoidea.....</i>	<i>29</i>
<i>II-4.2.2 Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad.....</i>	<i>29</i>
<i>II-4.2.3 Respuesta inmune.....</i>	<i>30</i>
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
III-1 Caracterización de un extracto de membrana externa de <i>V. cholerae</i> O1.....	32
<i>III-1.1 Cuantificación de proteínas totales.....</i>	<i>33</i>
<i>III-1.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....</i>	<i>33</i>
<i>III-1.3 Inmunotransferencia: Identificación de antígenos proteicos en el extracto.....</i>	<i>34</i>
<i>III-1.4 Cuantificación de LPS.....</i>	<i>34</i>
<i>III-1.5 Cuantificación de fosfolípidos totales.....</i>	<i>35</i>
<i>III-1.6 Extracción de lípidos.....</i>	<i>36</i>
<i>III-1.7 Identificación de fosfolípidos.....</i>	<i>36</i>
<i>III-1.8 Microscopía electrónica de transmisión. Tinción negativa.....</i>	<i>37</i>
<i>III-1.9 Microscopía electrónica de barrido.....</i>	<i>37</i>

III-1.10 Espectroscopía de correlación fotónica y potencial Z	38
III-1.11 Preparación de la muestra y electroforesis bidimensional	38
III-2 Obtención del AFCo2 a partir del PLc	39
III-2.1 Determinación de la eficiencia de incorporación de los principales componentes del PLc en el AFCo2	40
III-2.2 Caracterización morfológica de las estructuras obtenidas	41
III-2.2.1 Microscopía óptica	41
III-2.2.2 Microscopía de congelación y fractura	41
III-2.2.3 Preparación y observación del AFCo2 con sonda fluorescente	41
III-3 Determinación del efecto de la transformación del PLc a AFCo2	42
III-3.1 Animales de laboratorio	42
III-3.2 Inmunizaciones y recolección de muestras	43
III-3.2.1 Obtención de las muestras de suero	44
III-3.2.2 Obtención de las muestras de saliva	44
III-3.2.3 Obtención de las muestras de heces	44
III-3.3 Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Determinación de anticuerpos	45
III-3.3.1 Anticuerpos específicos IgG en suero contra PLc y Poli Vi	45
III-3.3.2 Anticuerpos específicos IgA en saliva y heces contra PLc	46
III-3.2.3 Evaluación de la actividad vibriocida del suero	46
III-4 Análisis Estadístico	47
IV. RESULTADOS	48
IV-1 Composición del EMET y caracterización estructural	48
IV-1.1 Cuantificación de LPS en el extracto	48
IV-1.2 Identificación de antígenos en el extracto y las fracciones purificadas	49
IV-1.3 Identificación y cuantificación de fosfolípidos	52
IV-1.4 Caracterización morfológica	54
IV-2 Obtención del AFCo2 a partir del PLc	55
IV-2.1 Determinación de los parámetros que afectan el proceso de transformación del PLc en AFCo2	56
IV-2.2 Caracterización morfológica del AFCo2	58
IV-2.2.1 Permeabilidad de las estructuras cocleares a moléculas de variados tamaños	60
IV-3 Efecto de la transformación del PLc a AFCo2 en la identidad e inmunogenicidad de los antígenos de V. cholerae O1	62
IV-3.1 Respuesta inmune sistémica. Actividad vibriocida y anticuerpos IgG en suero	63
IV-3.2 Respuesta inmune mucosal. Anticuerpos IgA en heces y saliva	64
IV-4 Efecto adyuvante del AFCo2 sobre el Poli Vi	65

<i>IV-4.1 Respuesta inmune sistémica y mucosal. Anticuerpos IgA e IgG contra Poli Vi en saliva, heces y suero respectivamente.....</i>	<i>65</i>
<i>IV-4.2 Respuesta inmune sistémica y mucosal. Anticuerpos IgA e IgG contra PLc en saliva, heces y suero respectivamente</i>	<i>67</i>
V. DISCUSIÓN.....	69
VI. CONCLUSIONES.....	85
VII. RECOMENDACIONES.....	86
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	87
IX. AUTOBIBLIOGRAFÍA.....	95
ANEXOS	I

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS EMPLEADOS

AFCo1	Adyuvante Finlay Cocleato 1, derivado del proteoliposoma de <i>N. meningitidis</i> B
AFCo2	Adyuvante Finlay Cocleato 2, derivado del proteoliposoma de <i>V. cholerae</i> O1
AFPL1	Adyuvante Finlay Proteoliposoma 1, derivado de <i>N. meningitidis</i> B
AcM	Anticuerpos monoclonales
CTB	Subunidad B de la toxina de cólera
DE	Desviación estándar
DO	Densidad óptica
DOC	Desoxicolato de sodio, detergente
ECF	Espectometría de correlación fotónica
EMEt	Extracto de membrana externa de <i>V. cholerae</i> O1
FC	Fosfatidil colina
FE	Fosfatidil etanolamina
FG	Fosfatidil glicerol
Flps	Fosfolípidos
FS	Fosfatidil serina
IgA, IgG	Inmunoglobulinas de clase A y G
IM	Intramuscular
IN	Intranasal
Kdo	Ácido keto-3-deoxy-d-manosa-octulosónico
LAL	En inglés "Limulus Amebocytes Lised Assay", ensayo del LAL
LPS	Lipopolisacárido
Lyzo-FS	Lizo fosfatidil serina
Lyzo-FC	Lizo fosfatidil colina
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MECF	Microscopía electrónica de congelación y fractura
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MSHA	Hemaglutinina Sensible a Manosa
Ova-TR	Ovoalbúmina conjugada a la sonda fluorescente Texas red
PLc	Proteoliposoma derivado de <i>V. cholerae</i> O1
PAMPs	Patrones moleculares asociadas a patógenos
PLG	Polilactil co-glicolato
Poli Vi	Polisacárido Vi de <i>Salmonella</i> Typhi
pl	Punto isoelectrico
SB	Solución de Bloqueo
SDS	Duodecil sulfato de Sodio
SDS-PAGE	En inglés "Poliacrilamid gel electrophoresis with SDS", electroforesis en Geles de Poliactilamida con SDS y condiciones reductoras
SSTF	Solución Salina Tamponada con Fosfato
TF	Tampón de Formación
Thn	Linfocito T CD4 ⁺ auxiliador de tipo 1, 2 ó 3
TLRn	En inglés "Toll Like Receptors", receptores semejantes a "Toll" (1-11)
Tris	Tris-hidroxi metil-aminometano
TR	Tampón de Resuspensión
UFC	Unidades formadoras de colonias
VME	Vesículas de membrana externa

SÍNTESIS

Los adyuvantes son componentes esenciales de las formulaciones vacunales. Sin embargo, pocos han sido licenciados para su uso en humanos y solo la subunidad B de la toxina de cólera ha sido aprobada por vía mucosal. El objetivo de este trabajo es **obtener una nueva estructura coclear a partir del proteoliposoma *Vibrio cholerae* O1 y demostrar que su aplicación mucosal tiene efecto adyuvante sobre los antígenos que componen dicho proteoliposoma y el polisacárido Vi de *Salmonella Typhi*.** De esta forma, se identificaron fosfolípidos y proteínas en un extracto de membrana externa derivado de *V. cholerae* O1 que, junto al lipopolisacárido, forman vesículas que se denominaron como proteoliposoma de *V. cholerae* O1 (PLc). El PLc se enfrentó al catión divalente calcio a través de un proceso de diálisis rotacional continua y se obtuvo una nueva microestructura multilaminar y tubular con características semejantes a una estructura coclear que se denominó como Adyuvante Finlay Cocleato 2 (AFCo2). Durante este proceso no se afectó la identidad e inmunogenicidad de los principales antígenos que se identificaron en el PLc. Al contrario, la evaluación de la respuesta inmune en ratones Balb/c que se inmunizaron por vía intranasal (IN), reveló que el AFCo2 fue más inmunogénico a nivel mucosal que el PLc. Finalmente, se demostró el efecto adyuvante del AFCo2 sobre el polisacárido Vi de *S. Typhi* cuando se mezclaron y coadministraron por vía IN a ratones Balb/c. En general estos resultados demuestran que el AFCo2 puede ser obtenido a partir del PLc y ser utilizado como un adyuvante de aplicación mucosal.

I. INTRODUCCIÓN

El diseño y obtención de formulaciones vacunales contra agentes patógenos es hasta el momento la mejor opción para prevenir las enfermedades causadas por éstos. Sin embargo, el número de vacunas disponibles es realmente pobre en comparación con el gran número de enfermedades infecciosas que constituyen graves problemas de salud (1). Las mucosas constituyen la puerta más importante de entrada de agentes infecciosos por lo que numerosas investigaciones se han planteado el desarrollo de vacunas y adyuvantes mucosales (2-5). Los adyuvantes vacunales han sido descritos como sustancias que se utilizan para incrementar o modificar la respuesta inmune contra uno o varios antígenos (6). De acuerdo a su modo de acción los adyuvantes pueden ser clasificados como sistemas de liberación o inmunoestimuladores/polarizadores capaces de activar y modular la respuesta inmune contra el antígeno adyuvado (3).

La tendencia actual en el diseño racional de vacunas y adyuvantes se fundamenta en la combinación de sistemas de liberación con uno o varios inmunoestimuladores para potenciar su efecto sobre el sistema inmune (3, 7). Algunos derivados de membranas bacterianas pueden cumplir con estas propiedades, sin embargo la composición multiestructural y compleja que poseen, muchas veces dificulta su aceptación por entidades regulatorias, que demanda productos mejor caracterizados y más seguros.

El Adyuvante Finlay Cocleato 1 (AFCo1) es una microestructura tubular derivada de las membranas bacterianas, de elevada estabilidad que ha demostrado ser un potente adyuvante para numerosos antígenos y constituye una estrategia adyuvante importante, particularmente por su potencial utilidad en el desarrollo de formulaciones mucosales de administración nasal (8). Su obtención se basa, fundamentalmente, en la interacción entre los fosfolípidos (Fíps), proteínas y lipopolisacáridos (LPS) del

proteoliposoma derivado de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (AFPL1, Adyuvante Finlay Proteoliposoma 1) con el catión divalente calcio (9).

Estudios preliminares en los que el LPS de *V. cholerae* O1 se adyuvó con el AFCo1 sugirieron que esta estrategia podía ser poco efectiva contra este patógeno. En este sentido, se conoce que a pesar de ser el LPS es uno de los antígenos más importantes de *V. cholerae*, los componentes antigénicos no-LPS juegan también un papel fundamental en la inducción de la respuesta inmune contra el patógeno (10, 11).

Teniendo en cuenta las experiencias previas de obtención y evaluación de AFCo1, una de las alternativas de gran interés sería obtener una estructura coclear a partir de los componentes que forman la membrana externa de *V. cholerae* O1. Las nuevas estructuras pudieran constituir una importante estrategia para el diseño de formulaciones mucosales contra patógenos entéricos, incluyendo al *V. cholerae* O1 que continúa causando serios problemas de salud a nivel mundial (12).

Los cocleatos fueron descritos por primera vez por Papahadjopoulos D y colaboradores (13) en trabajos relacionados con estudios de procesos de fusión de membranas donde el calcio y otros cationes multivalentes inducían, bajo ciertas condiciones, la precipitación de mezclas de Flps y colesterol extraídos de fuentes animales y/o vegetales. En estas estructuras, los cationes pueden estabilizar las cargas negativas de las cabezas polares de los Flps, formando puentes iónicos entre bicapas lipídicas adyacentes, generando un complejo hidrofóbico, multilaminar y compacto altamente estable. Sin embargo, para la obtención de estas estructuras es esencial lograr las condiciones adecuadas en cuanto a composición y estructura de la mezclas de lípidos de partida. Este aspecto adquiere mayor importancia si se emplean mezclas de elevada complejidad como las derivadas de las membranas bacterianas. En este sentido, la formación de estructuras de tipo proteoliposómicas resulta en un aspecto

esencial para la obtención de estructuras cocleares a partir de mezclas proteo-lipídicas complejas (9).

En el año 2006, en el Instituto Finlay, Pérez JL y colaboradores obtuvieron un extracto inmunogénico a partir de la membrana externa de la cepa salvaje C7258 de *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa (EMEt). Sin embargo, los autores no estudiaron a profundidad los componentes de dicho extracto o el tipo de estructuras que estos forman (14). Si se tiene en cuenta también que los proteoliposomas bacterianos constituyen la materia prima fundamental para la obtención de estructuras cocleares (9), entonces la primera interrogante a que se enfrenta este trabajo es si **¿tendrá el EMEt componentes proteicos y lipídicos capaces de inducir la formación de una estructura proteoliposómica que sustente la posibilidad de su transformación en estructuras cocleares?**

Para la obtención de cocleatos a partir de mezclas artificiales de fosfolípidos y colesterol han sido patentadas y estudiadas varias metodologías (15, 16). En el año 2002 Pérez O y colaboradores patentaron un método para la obtención de cocleatos a partir de proteoliposomas bacterianos basado en un proceso de diálisis rotacional continua. El AFCo1 obtenido a través de esta metodología resultó ser una estructura con mayor capacidad para la incorporación de antígenos, más estable e inmunogénica que el AFPL1 del cual se deriva (8, 9).

Si se considera la posibilidad de que los componentes del EMEt se ensamblen y formen un proteoliposoma derivado de *V. cholerae* O1 (PLc), entonces este podría ser utilizado como materia prima en la obtención de una nueva estructura coclear. Para ello será necesario enfrentar el PLc al catión calcio e identificar, a través de estudios de microscopía electrónica si se forman estructuras tubulares y multilaminares con curvaturas que formen el patrón en espiral, característico de los cocleatos (17). El proceso de diálisis rotacional continua puede ser empleado para la obtención de

pequeños volúmenes de cocleatos a nivel de laboratorio. El mismo permite estudiar y controlar las interacciones entre los componentes que forman los proteoliposomas y el calcio para evitar la formación de agregados de estructura no coclear (9). Para la obtención de cocleatos por este método es necesario evaluar diferentes condiciones del proceso y ajustar los parámetros más importantes como la concentración de Ca, el flujo de diálisis y la extensión de la misma. Teniendo en cuenta estos aspectos: **¿podrá obtenerse una nueva estructura coclear a partir del PLc por el método de diálisis rotacional continua?**

Considerando que el PLc pueda ser transformado en nuevas estructuras cocleares, estas pudieran ser denominadas de forma experimental como AFCo2 (Adyuvante Finlay Cocleato 2). A pesar de que el proceso de transformación mediante diálisis rotacional continua es poco agresivo, la transformación estructural del PLc pudiera alterar la identidad e inmunogenicidad de los principales antígenos de *V. cholerae* incorporados en el AFCo2. Un grupo de técnicas de inmunotransferencia y electroforesis pueden ser utilizadas para estudiar estos cambios (18); sin embargo, la evaluación *in vivo* de la inmunogenicidad sería fundamental para determinar el efecto de dicha transformación sobre los antígenos del patógeno presentes en el PLc. El estudio de la respuesta inmune contra *V. cholerae* O1 se ha visto limitado porque los modelos animales existentes no reproducen la enfermedad que se produce en el hombre (19). No obstante, algunas aproximaciones han sido realizadas utilizando conejos, ratas y ratones. Varios autores han demostrado (20, 21) la inmunogenicidad de sus candidatos vacunales empleando el modelo de ratones Balb/c inmunizados por vía mucosal. Estas herramientas nos permiten estudiar si **¿la transformación del PLc en AFCo2 afectará la identidad e inmunogenicidad de los antígenos de *V. cholerae* O1?**

El AFCo2 pudiera potenciar la respuesta inmune contra los antígenos presentes en el PLc. Sin embargo, para sustentar su aplicación como una estrategia de adyuvación de

antígenos de patógenos entéricos es necesario evaluar su capacidad de potenciar la respuesta inmune contra antígenos no relacionados con el PLC. En este sentido el polisacárido Vi de *Salmonella Typhi* (Poli Vi) es un antígeno importante utilizado en la formulación de vacunas parenterales contra este patógeno (22) y aunque no se encontraron referencias sobre su posible uso por vía mucosal, el Poli Vi purificado constituye un antígeno de estructura definida y ampliamente estudiada que sería interesante evaluar. Por otro lado, existen evidencias de que la respuesta mucosal inducida contra el patógeno puede ser importante; como se ha demostrado con la vacuna oral atenuada Ty21a que confiere protección contra *S. Typhi* (23). Considerando estas razones sería importante evaluar si **¿tendrá el AFCo2 efecto adyuvante sobre el Poli Vi al ser coadministrados por vía intranasal?**

Atendiendo a los problemas planteados se formuló la siguiente **hipótesis**:

Los componentes del extracto de membrana externa de *V. cholerae* O1 formarán proteoliposomas que podrán ser transformados en estructuras cocleares con capacidad adyuvante para potenciar la respuesta inmune contra los antígenos que componen el proteoliposoma y sobre el polisacárido Vi de *S. Typhi* coadministrado por vía mucosal.

Para validar la hipótesis formulada se propusieron los siguientes objetivos:

1. Determinar los componentes proteicos y lipídicos del EMEt y la capacidad de estos para formar una estructura proteoliposómica (PLc) que sustente la posibilidad de su transformación en estructuras cocleares.
2. Obtener una nueva estructura coclear (AFCo2) a partir del PLc por el método de diálisis rotacional continua.
3. Determinar si la transformación del PLc en AFCo2 afecta la identidad e inmunogenicidad de los antígenos de *V. cholerae* O1

4. Evaluar si el AFCo2 tiene efecto adyuvante sobre el Poli Vi al ser coadministrados por vía intranasal

Objetivo 1:

- a) Cuantificación de LPS, proteínas y FLps totales en el EMET y sus fracciones purificadas
- b) Identificación de los principales antígenos proteicos y estructuras fosfolípicas
- c) Caracterización morfológica de las estructuras que forman el EMET

Objetivo 2:

- a) Producción del AFCo2 a escala de laboratorio por diálisis rotacional continua
- b) Determinación del porcentaje de incorporación de los principales componentes del PLc en el AFCo2
- c) Caracterización morfológica de las estructuras obtenidas

Objetivo 3:

- a) Identificación y evaluación de las propiedades inmunoquímicas de los principales antígenos de *V. cholerae* O1 incorporados en el AFCo2.
- b) Inmunogenicidad del PLc y el AFCo2 por vía intranasal en ratones Balb/c
- c) Evaluación de la actividad vibriocida del suero y respuesta de anticuerpos específicos IgG en suero e IgA en saliva y heces contra los antígenos en el PLc

Objetivo 4:

- a) Coadministración del AFCo2 y Poli Vi por vía IN a ratones Balb/c
- b) Evaluación de la respuesta inmune sistémica y mucosal inducida contra el poli Vi y el PLc

Novedad científica del trabajo:

1. Se demuestra que el extracto de membrana externa de *V. cholerae* O1 (EMET) contiene fosfolípidos y antígenos proteicos
2. Se demuestra que los componentes del EMET se encuentran ensamblados y formando parte de la estructura del proteoliposoma de *V. cholerae* O1 (PLc)

3. Se obtiene el Adyuvante Finlay Cocleato 2 (AFCo2) a partir del PLc y se demuestra que la transformación tiene efecto adyuvante sobre los antígenos de dicho PLc a nivel mucosal
4. Se demuestra, por primera vez, que el Poli Vi adyuvado y coadministrado por vía intranasal con AFCo2 es inmunogénico a nivel sistémico y mucosal

Importancia **práctica y económica** de los resultados obtenidos:

1. Los procedimientos utilizados para la caracterización del PLc y el AFCo2 pueden ser extendidos al estudio de nuevos derivados bacterianos con interés vacunal o adyuvante.
2. Se demuestra la utilidad del método de diálisis rotacional continua para la obtención de un cocleato a partir del proteoliposoma de un microorganismo diferente de *N. meningitidis* B, fortaleciendo al IF como propietario de esta tecnología y del nuevo adyuvante mucosal, AFCo2.

La importancia social radica en que el AFCo2 es efectivo para la adyuvación de antígenos de *V. cholerae* O1 y *S. Typhi* administrados por vía mucosal y pudiera ser utilizado como una estrategia de adyuvación para el desarrollo de formulaciones vacunales contra estos y otros patógenos entéricos que constituyen una de las principales causas de muerte de origen infeccioso a nivel mundial, principalmente en los países más pobres.

Este trabajo de tesis consta de 10 capítulos, Introducción (8 páginas), Revisión bibliográfica (21 páginas), Materiales y Métodos (15 páginas), Resultados (20 páginas), Discusión (15 páginas), Conclusiones (1 página), Recomendaciones (1 página), Bibliografía (154 citas, 7 páginas), Autobibliografía (4 páginas) y Anexos (3 páginas). Además, en las tres primeras páginas se muestra un índice con los epígrafes y subepígrafes de la tesis, seguido de una página con las abreviaturas empleadas en la tesis y luego una síntesis de una página.

Los resultados defendidos en este trabajo forman parte de tres publicaciones científicas en revistas nacionales e internacionales como Vaccimonitor, Vaccine y Methods y otra enviada y en proceso de revisión a la revista BBA Biomembranes. Los resultados también han sido utilizados para escribir un artículo de revisión para la revista Expert Review Vaccine y han sido presentados en múltiples eventos nacionales e internacionales. Se refieren además, en la autobibliografía del autor, 17 publicaciones relacionadas con el tema de adyuvantes, proteoliposomas y cocleatos que apoyan los resultados que se defienden en este documento, así como un premio de la Academia de Ciencias de Cuba, premios del Forum Nacional de Ciencia y Técnica y una patente aplicada.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Adyuvantes vacunales

Son numerosos los aspectos que sustentan el uso de los adyuvantes como componentes indispensables de las formulaciones vacunales. En primer lugar, las vacunas de aplicación masiva que han demostrado ser efectivas, han sido desarrolladas contra agentes en los que la infección natural confiere protección y donde utilizando métodos tradicionales, como la atenuación e inactivación del agente patógeno causal, es posible obtener candidatos efectivos. Sin embargo, estas metodologías no son aplicables a muchos microorganismos que han desarrollado mecanismos eficaces para evadir la respuesta inmune, entre los que se incluye la inducción de tipos de respuestas (Th1, Th2, Tr, etc.) no eficientes para la eliminación de la infección y la desviación de la respuesta inmune hacia epítopes no relevantes, entre otros. En estos casos, es imprescindible el uso de adyuvantes para modificar la interacción de los antígenos vacunales con el sistema inmune e inducir una respuesta que realmente sea efectiva para combatir la enfermedad (24). En segundo lugar, el campo del desarrollo de vacunas está marcado por el uso de estrategias cada vez más refinadas para la obtención de antígenos recombinantes, sintéticos o purificados. A pesar de que mediante estas metodologías es posible desarrollar vacunas mucho más seguras, los antígenos obtenidos generalmente son poco inmunogénicos debido a que carecen de señales de activación del sistema inmune y no son presentados apropiadamente a las células inmunocompetentes (24). Por último, la aparición de nuevos agentes patógenos y la adquisición de nuevas características que modifican los mecanismos de patogenia, pueden incrementar la virulencia o resistencia a antibióticos en estos e imponen nuevas presiones en la obtención de vacunas. De forma general, estos aspectos constituyen los principales retos de la vacunología moderna, muchos de

los cuales pueden ser resueltos con el uso de adyuvantes efectivos como parte de las formulaciones vacunales (24, 25).

Hasta el momento, pocos son los adyuvantes aprobados para su uso en humanos y la mayoría sólo lo consigue como parte de la formulación vacunal; esto trae como inconveniente que no puedan utilizarse libremente con cualquier antígeno, como suele ocurrir con las sales de aluminio. Estas últimas son, por lo tanto, las más utilizadas por los productores para evadir problemas de propiedad y formulación (26). El fosfato y el hidróxido de aluminio han demostrado una elevada seguridad e inducen una potente respuesta de anticuerpos, sin embargo su uso ha sido inefectivo para la inducción de patrón Th1, particularmente en la activación de CTL (23). El mecanismo de acción de las sales de aluminio se basa fundamentalmente en un efecto de depósito del antígeno en el sitio de administración y la inducción de un patrón de respuesta Th2, a través de la activación del complejo inflamasoma (27), por lo que no favorece la adyuvación de antígenos poco inmunogénicos, alergénicos y patógenos intracelulares como virus y parásitos. Debido a las desventajas de las sales de aluminio y la gran necesidad de nuevos adyuvantes, en los últimos años se ha incrementado considerablemente el trabajo encaminado al diseño de nuevas formulaciones. Los estudios, en este sentido, han abarcado una gran variedad de sustancias con diferentes estructuras y fuentes de obtención (derivados de bacterias, plantas, aceites minerales y compuestos sintéticos), aunque el mayor número de trabajos se ha centrado en los productos bacterianos o derivados de estos que actúan como fuente de señales de peligros para el sistema inmune tales como el LPS, ADN, toxinas, peptidoglicanos y proteínas, entre otros (28). A pesar de que los mecanismos de acción de la mayor parte de los adyuvantes existentes no se conocen con claridad, los conocimientos actuales del sistema inmune permiten hacer algunas consideraciones sobre las funciones de los adyuvantes para potenciar y mantener durante un espacio de tiempo considerable la respuesta inmune inducida (3, 24), entre estos se encuentran:

- Promover la activación y maduración de las células dendríticas a través de estructuras inmunoestimuladoras como los denominados PAMPs (LPS, DNA, porinas, etc).
- Actuar como sistemas de liberación de antígenos y señales de peligro (PAMPs) que promueven su captación por células presentadoras de antígenos.
- Inducir un ambiente de citocinas adecuado para la polarización de la respuesta inmune, aspecto condicionado por la forma de activación de las células dendríticas.
- Prolongar la exposición del antígeno y otras señales en el sitio de inmunización.

II-1.1 ADYUVANTES INMUNOESTIMULADORES Y POLARIZADORES

El LPS es un potente activador del sistema inmune, su actividad está mediada por la interacción con receptores de reconocimientos a patógenos (24) que se encuentran en las células presentadoras de antígenos y particularmente en células dendríticas. Específicamente, el LPS interactúa con el TLR4 y polariza la respuesta inmune hacia un patrón de respuesta Th1 (29), sin embargo, debido a la elevada toxicidad de este, se ha trabajado arduamente en la búsqueda de derivados no tóxicos como el monofosforil lípido A (MPL) que se obtiene a partir del LPS de *Salmonella minnesota*. El MPL constituye una parte de la molécula del LPS en la que se retiene la capacidad de activar el sistema inmune pero con toxicidad reducida (30). Ha sido empleado en numerosos estudios donde ha inducido la activación y migración de las células dendríticas, la producción de interleucina-12 e IFN γ (3) incluso ha sido administrado por vía mucosal (31). Actualmente se encuentran licenciadas dos formulaciones vacunales que combinan el MPL con las sales de aluminio (AS04, propiedad de Glaxo Smith Kline, GSK) para adyugar antígenos de HepB y del VPH (Tabla 1)

Tabla 1. Adyuvantes en vacunas actualmente licenciadas para uso en humanos (3, 7, 8)

Adyuvantes	Mec. Acción		Antígenos (Vacunas)	Productor
	SL	IE/IP		
Sales de Aluminio*	X	Th2	D.P.T,VHB,VPI, HiB, etc (varias)	Varios
Emulsión o/w	X	Th1	H1N1 (Fluad™)	Novartis

MF59			H5N1 (Focetria™)	
Emulsion o/w AS03	X	Humoral (Th?)	H5N1 (Prepandrix™), H1N1 (Arepanrix™)	GSK
Emulsion o/w AF03	X	Humoral (Th?)	H1N1 (Humenza™)	Sanofi Pasteur
MPL+Alum (AS04)	X	Th2/Th1	VHB (Fendrix™) VPH (Cervarix™)	GSK
RC529+Alum	X	Th1	VHB (Supervax™)	Dynavax
Virosomas	X	Th2/Th1	H5N1 (Inflexal™) VHA (Epaxal™)	Crucell
Proteoliposoma	X	Th1	<i>N. meningitidis</i> (VA-MENGOC-BC™)	Instituto Finlay
CTB	-	IgA	<i>V. cholerae</i> (Dukoral™)	SBL

Abreviaturas: SL, sistema de liberación; IE/IP, inmunoestimulador y/o inmunopolarizador; GSK, Glaxo Smith Kline; VLP, partículas semejantes a virus (del inglés virus like particles); D.P.T, se refiere a antígenos de difteria, pertussis y tétanos combinados o formulados por separado; HxNx, antígenos de virus de Influenza; VHB, antígenos de virus de hepatitis B; VPI, virus de polio intramuscular; HiB, antígenos de *Haemofilus influenzae* B ; VHA, antígenos del virus de hepatitis A; VPH, virus del papiloma humano; CTB, subunidad B de toxina de cólera, es el único adyuvante mucosal aprobado como parte de la vacuna de cólera inactivada.

*Las sales de aluminio incluyen al menos tres estructuras que se utilizan en dependencia de las características químico-físicas del antígeno y su adsorción al gel que se forma al hidratar la sal: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio.

La propiedad estimuladora de las secuencias no metiladas o CpG presentes en el ADN de las bacterias, ha sido también usada para el desarrollo de adyuvantes. Los motivos CpG son reconocidos por el TLR9 y promueven la maduración de las células dendríticas y la producción de interleucinas 6, 1, 12 y TNF α generando potentes respuestas de tipo Th1 (32, 33). Las secuencias CpG también han sido administradas por vía mucosal con muy buenos resultados (34). Sin embargo, ya se han reportado algunas reacciones adversas asociadas con su uso en humanos (35). Otro grupo de adyuvantes en estudio, son los glucósidos triterpenoides o saponinas purificadas de *Quillaja saponaria* (3). Estos compuestos tienen propiedades tensoactivas que pueden perturbar las membranas celulares y ejercer actividad inmunopotenciadora. El uso de este tipo de adyuvantes se fundamenta en su capacidad de interactuar con los receptores de reconocimientos a patógenos, activar la producción de citocinas e inducir una respuesta de tipo Th1(3). Entre este grupo de adyuvantes se encuentra el QS-21, que ha sido el más usado en ensayos clínicos como parte de candidatos vacunales

contra el cáncer y enfermedades infecciosas (VIH, malaria, herpes, influenza y hepatitis B) con algunos resultados alentadores, aunque también su uso ha provocado reacciones locales adversas moderadas y severas (36). Las citocinas purificadas también han sido empleadas como adyuvantes en ensayos preclínicos y clínicos, entre ellas se encuentran la interleucina 1, interleucina 12, $IFN\gamma$, $IFN\alpha/\beta$, interleucina 2 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (37). Sin embargo, debido a problemas de estabilidad, toxicidad y el elevado costo de los procesos de obtención, su uso como adyuvantes es limitado aunque a nivel terapéutico han encontrado gran aplicación (37, 38). Otros productos naturales como polisacáridos de plantas, lectinas y agentes tensoactivos, han encontrado aplicación como adyuvantes vacunales con buenos resultados a pesar de que se han reportado algunas reacciones adversas y los mecanismos de acción de forma general no se encuentran esclarecidos (37). La lista de compuestos inmunoestimuladores puede ser inmensa, lo importante es analizar cada una de las opciones y determinar en la práctica la más beneficiosa.

II-1.2 SISTEMAS DE LIBERACIÓN

Existe un gran número de sustancias que han sido evaluadas como sistemas de liberación para el desarrollo de formulaciones vacunales y adyuvantes, entre ellos se pueden mencionar los geles, las emulsiones y las nano/micropartículas como los liposomas, proteoliposomas, cocleatos, derivados poliméricos, etc (39, 40). La clasificación entre nano y microestructuras proviene de las distintas características y aplicaciones que pueden tener algunas estructuras, en dependencia de su tamaño, aceptando límites de escala para nano < 100 nm y micro > 1 μ m (40) aunque no existe un consenso general al respecto y la mayoría de las nanoestructuras utilizadas como sistemas de liberación poseen tamaños entre 100 nm y 1 μ m. La principal función de estos sistemas aplicados al campo de la vacunología, consiste en entregar las señales

antigénicas al sistema inmune, sin embargo su combinación con inmunoestimuladores puede incrementar el efecto adyuvante sobre los antígenos con que se formulan (40).

Entre los compuestos oleosos y las emulsiones aceite-agua estudiadas, el MF59 (mezcla de aceite de escualeno, surfactantes y agua, propiedad de Novartis) ha sido el más utilizado (3). Este adyuvante se encuentra actualmente licenciado para su aplicación en humanos como parte de formulaciones vacunales contra el virus de la influenza (Tabla 1) y ha sido también empleado en ensayos clínicos contra VIH, VHC y VHB con resultados promisorios (3). Recientemente, nuevas formulaciones de emulsiones aceite en agua han sido licenciadas en vacunas contra el virus de la Influenza (Tabla 1). Entre los mecanismos de acción propuestos para este tipo de adyuvante, se encuentra el de ejercer un efecto de depósito de antígenos con una liberación lenta, aunque también ha sido demostrado que pueden activar las células dendríticas por mecanismos independientes de la activación de TLR (40).

Quizás las nanoestructuras más estudiadas como sistemas de liberación/adyuvante son los liposomas. Estos se pueden obtener a partir de lípidos comerciales purificados, sintéticos o mezclas de ambos. Las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas que gobiernan las interacciones entre determinado grupo de lípidos y el medio acuoso permiten la formación de vesículas. Los liposomas prolongan la exposición de los antígenos al sistema inmune y promueven su captación por las células presentadoras de antígenos (39). Por otro lado, se han obtenido estructuras similares a los liposomas a partir de extractos de virus y bacterias. Por ejemplo, los virosomas son proteoliposomas obtenidos a partir de la mezcla de lípidos exógenos (comerciales) y componentes proteicos virales que constituyen señales de activación para el sistema inmune (41). Concretamente, dos variantes de virosomas han sido aprobadas para su uso en humanos (3), una contra el virus de la influenza y la otra contra el virus de la hepatitis A (Tabla 1). Por su lado las vesículas de membrana externa (VME) derivadas

de *N. meningitidis* B también son consideradas proteoliposomas y han sido utilizadas en humanos para inducir respuestas protectoras contra el patógeno (42); pero también como adyuvantes de antígenos heterólogos, demostrando en cada caso su capacidad para activar eficientemente las células dendríticas e inducir respuestas Th1 potentes (8, 43).

II-1.3 ADYUVANTES MUCOSALES

La vía de administración más utilizada para la aplicación de vacunas es la parenteral, no obstante, por esta vía solo es posible inducir inmunidad a nivel sistémico, aunque las vacunas polisacáridicas conjugadas han sido efectivas para inducir alguna respuesta a nivel mucosal (44). Las vacunas de administración mucosal no solo favorecen la eliminación del patógeno a nivel sistémico sino que también previene su adherencia y colonización en las mucosas como ha sido demostrado con la vacuna oral de Polio atenuada (23) y las inactivadas de *V. cholerae* (45).

Por otro lado, las estrategias mucosales eliminan los riesgos de contaminaciones cruzadas por el uso incorrecto de agujas para inyecciones y no requieren de personal especializado para ser aplicadas, por lo que las personas pueden ajustarse mejor a los planes de vacunación. Por estas razones son consideradas también más adecuadas para campañas de inmunizaciones masivas (46). A pesar de las numerosas ventajas de esta vía, CTB es el único adyuvante mucosal aprobado en humanos como parte de la vacuna oral inactivada contra *V. cholerae*, Dukoral (Tabla 2). Hasta el momento, los estudios en este campo han estado dominados por el uso de sustancias inmunoestimuladoras como la toxina de *V. cholerae* O1 y la toxina lábil al calor de *Escherichia coli* (47). Desafortunadamente, ambas toxinas producen reacciones adversas severas en humanos lo que limita su uso como adyuvantes (48). Numerosas variantes mutadas de estas toxinas han sido obtenidas y han demostrando ser capaces de potenciar la respuesta de IgAs, anticuerpos séricos e inducir respuesta de linfocito T

citotóxicos frente a un grupo de antígenos (49). Sin embargo, los estudios de mutagénesis demuestran una fuerte asociación de la toxicidad con las propiedades adyuvantes (48).

Tabla 2. Vacunas Mucosales Licenciadas (23, 50)

Vacuna	Vía de Aplicación	Nombre Comercial	Productor
Vacuna viva atenuada contra virus de la Influenza	Nasal	FluMist®	MedImmune Vaccines, Inc
Vacuna viva atenuada trivalente contra polio virus	Oral	OPV	IPOL, Aventis Pasteur
Vacuna viva atenuada anti-tifoídica Ty21a	Oral	Vivotif®	Berna Biotech, Ltd
Vacuna viva atenuada contra el Rotavirus, pentavalente	Oral	RotaTeq®	Merck
Vacuna contra el Rotavirus, viva atenuada, monovalente	Oral	RotaRix®	GlaxoSmithKline
Vacuna contra <i>Vibrio cholerae</i> O1, inactivada/CTBr	Oral	Dukoral®	SBL, Suecia
Vacuna contra <i>Vibrio cholerae</i> O1, viva atenuada CVD103-Hg R	Oral	Orochol® Mutacol®	Berna Biotech, Ltd. Suiza.
Vacuna bivalente inactivada contra <i>Vibrio cholerae</i> O1 y O139	Oral	Sanchol®	Shanta Biotechniques

Los sistemas de liberación nano y microparticulados también constituyen un importante tema en el diseño de vacunas y adyuvantes mucosales. Entre los polímeros naturales más utilizados se encuentran la quitina y la quitosana. Se han empleado principalmente por vía IN y su principal potencial, como sistema de liberación de antígenos a nivel mucosal, se debe a la presencia de numerosos grupos cargados positivamente en su estructura que le confieren propiedades mucoadhesivas (51). Por otro lado, el carbopol es un polímero sintético de alto peso molecular que ha sido utilizado para mejorar la absorción de péptidos a través de las mucosas, pues por su elevado peso molecular debilita las uniones inter-epiteliales e incrementa la permeabilidad a los principios activos (52).

El uso de vectores vivos atenuados genéticamente que expresan antígenos heterólogos de otros agentes patógenos, han sido estudiados como sistemas de liberación con resultados conservadores, no obstante continúan optimizándose los

sistemas de expresión de las proteínas. Entre los vectores más utilizados se encuentran *E. coli* y variantes atenuadas de *S. Typhi* y *Bordetella pertussis* (50, 53). Por otro lado el desarrollo en el campo de la transgénesis ha permitido la expresión de antígenos en plantas comestibles, donde también se han obtenido resultados alentadores, aunque es necesario realizar mayor número de ensayos con diferentes antígenos debido al riesgo de inducción de tolerancia por la vía oral (50).

Estudios comparativos y nuevos conocimientos sobre el sistema inmune mucosal, apuntan hacia el uso de micropartículas como adyuvantes mucosales. Esto está sustentado principalmente por la elevada capacidad pinocítica de las células M en las superficies mucosales, para transportar antígenos particulados (mayores de 5 μ m) hacia las células presentadoras de antígenos (54). La administración oral de partículas de PLG demostró ser eficiente en ensayos preclínicos, para inducir protección contra algunos patógenos que colonizan o penetran a través de las mucosas (40), sin embargo esta vía puede ser agresiva para antígenos sensibles a las condiciones del tracto gastrointestinal.

La vía IN resulta muy interesante para la administración de vacunas, y fármacos en general, ya que estos pueden ser adsorbidos a nivel local, pulmonar o sistémico en dependencia de las características del sistema de liberación (55): por ejemplo las partículas mayores de 10 μ m son preferentemente retenidas en las vías respiratorias superiores, mientras que las menores son llevadas directamente hacia los pulmones o son ingeridas durante el proceso de aclaramiento mucosal (56). Los derivados bacterianos, como proteoliposomas y cocleatos, también han sido utilizados por vía mucosal. Del campo J y colaboradores (57, 58) han demostrado que la inmunización IN de estas estructuras tienen efecto adyuvante sobre antígenos de virus del herpes tipo 2 y ovalbúmina en ratones Balb/c; mientras que Holst J y colaboradores reportan el uso de VME de *N. meningitidis* B por vía IN en humanos con un aceptable perfil de

seguridad e inmunogenicidad (59). De manera general, un gran número de adyuvantes mucosales han sido estudiados o se encuentran en investigación (47, 50) y solo se han mencionado algunos de ellos.

II-2 Proteoliposomas derivados de microorganismos

El término proteoliposoma fue utilizado inicialmente para describir estructuras liposomales en las que se incluían proteínas (60) con el objetivo de estudiar las biomembranas. Actualmente, existe toda una rama de la investigación dedicada al estudio y tecnología de liposomas con fines vacunales (61). Sin embargo, las estructuras con mayor aplicación hasta el momento son las derivadas de microorganismos. Las VME derivadas de bacterias están formadas por una bicapa lipídica compuesta principalmente por Flps, proteínas y LPS. Las VME pueden ser obtenidas de forma natural durante el cultivo del microorganismo (62) o a partir de la biomasa bacteriana mediante un proceso de extracción con detergentes (63). Varios autores se han referido a las VME como proteosomas (64) o proteoliposomas (17), este último es el término que se utilizó en este trabajo para referirse a las vesículas de microorganismos. Estas estructuras se comportan como sistemas de liberación de las señales antigénicas y de peligro (e.g PAMPs) provenientes del propio microorganismo o no relacionadas con este (heterólogas) que pueden ser insertadas en su estructura (43). VA-MENGOC-BC™ y MeNZB™ son ejemplos de dos vacunas obtenidas por Cuba y Nueva Zelanda, respectivamente, basadas en el proceso de extracción de proteoliposomas de la membrana externa de *N. meningitidis* B con detergentes y que han demostrado ser efectivas en el control de la enfermedad, principalmente en situaciones epidémicas (42, 65). Los proteoliposomas son estructuras muy complejas, como se ha mencionado anteriormente, y es necesario realizar un profundo estudio para caracterizarlas, tanto desde el punto de vista químico, físico como biológico (66).

II-2.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS PROTEOLIPOSOMAS

La caracterización química de los proteoliposomas implica el uso de una serie de técnicas que permitan identificar sus principales componentes estructurales: los Flps pueden ser evaluados a través de la cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masa (67); sin embargo la cromatografía en capa delgada es un método mucho más rápido, económico y sensible para identificar las especies de Flps presentes en la mayoría de las células bacterianas; a través de esta metodología también es posible cuantificar los Flps, ya sea por la determinación del fósforo inorgánico o por el análisis densitométrico de las manchas reveladas (68). La identificación y cuantificación de antígenos proteicos también es muy importante. Para el análisis del contenido total de proteínas se pueden realizar diversos ensayos colorimétricos, sin embargo en la mayoría de los casos se han utilizado modificaciones del ensayo de Lowry porque tienen menos interferencias con el resto de los componentes de los proteoliposomas (66, 69). Por otro lado es importante identificar los antígenos proteicos en los proteoliposomas ya sea a partir del análisis de los perfiles electroforéticos de las proteínas o con estudios de proteómica (70). No obstante, si se cuenta con un panel de anticuerpos monoclonales (AcM) que reconozcan epítopes importantes en los principales antígenos de la muestra que se analiza, es posible no solo identificarlos sino que también se puede determinar si sus propiedades inmunoquímicas se afectan o no durante el proceso de extracción (66). La caracterización física de las vesículas obtenidas mediante el método de extracción con detergentes, se basa principalmente en demostrar que sus principales componentes (proteínas, LPS y Flps) se encuentran ensamblados y formando una estructura proteoliposómica. Esto es muy importante ya que las propiedades biológicas de los proteoliposomas están muy asociadas a su estructura particulada (66). Para su caracterización estructural se han empleado técnicas de microscopía electrónica de transmisión, barrido, congelación y fractura, etc. Por otro lado el tamaño, dispersión y

carga superficial de las estructuras puede ser determinado a través de estudios de espectroscopía de correlación fotónica y evaluación del potencial Z, respectivamente (69).

II-3 Estructuras Cocleares

Las membranas lipídicas pueden adoptar diferentes conformaciones en dependencia de su composición y las condiciones del medio en que se encuentran. En 1974, durante estudios de procesos de fusión de vesículas lipídicas en presencia de cationes divalentes como calcio y magnesio, Paphadjopoulos y colaboradores describieron por primera vez la formación de un complejo estable, insoluble y multilaminar de cationes y Flps aniónicos, formado por el enrollamiento en espiral de bicapas lipídicas (71). En estas estructuras, los cationes divalentes se sitúan entre las bicapas formando puentes iónicos, las cargas positivas del catión interactúan electrostáticamente con los grupos aniónicos de la cabeza polar de los fosfolípidos entre membranas adyacentes y estabilizan la estructura. (Anexo 1). Estos autores utilizaron el término cocleato derivado del griego “koclíao” que significa caracol con concha en espiral para identificar las nuevas estructuras (13). Posteriormente ha sido demostrado que los liposomas y los cocleatos son estructuras con gran aplicación para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas profilácticas y terapéuticas (72). La fusión de las vesículas constituye un evento clave en la formación de las estructuras cocleares y está en estrecha relación con la agregación de estas, el incremento de la permeabilidad de la membrana y el cambio de fase de las cadenas hidrocarbonadas desde el estado líquido-cristalino al estado gel (73). Todos estos eventos se desencadenan de una forma altamente cooperativa con respecto al incremento de la concentración de calcio, el cual neutraliza las cargas negativas de la superficie externa de las vesículas e induce la transición de fase facilitando la agregación (74). Durante el proceso de fusión, ocurre la mezcla de componentes de las diferentes membranas involucradas siendo este un proceso muy desfavorable energéticamente debido a la alta estabilidad de las membranas lipídicas.

No obstante, el cambio de fase inducido por el calcio, podría alterar la energía del sistema permitiendo la formación de un estado transitorio inestable de relativamente baja energía de activación que favorece el proceso de fusión (75). De esta forma, las perturbaciones ocasionadas por los iones de calcio sobre membranas que contienen fosfolípidos cargados negativamente y los subsiguientes eventos que se desarrollan, favorecen la formación de los cocleatos.

II-3.1 COCLEATOS DERIVADOS DE PROTEOLIPOSOMAS BACTERIANOS

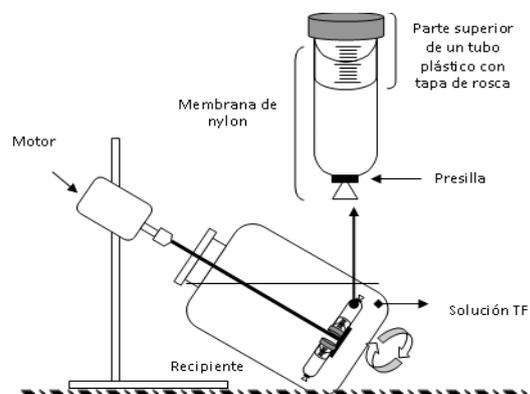
Los cocleatos poseen algunas ventajas con relación a los liposomas, ya que son más resistentes y pueden ser utilizados por vía oral o ser liofilizados sin que se afecte su estructura, además permiten, a diferencia de los liposomas, elevados porcentajes de encapsulación de moléculas con diferentes características físico-químicas (e.g hidrofóbicas, hidrofílicas, etc.) (72). Por lo tanto no es extraño que hayan sido considerados para el desarrollo de vacunas y adyuvantes (76). Un acercamiento a este problema, fue realizado por Pérez O y colaboradores quienes patentaron un método para obtener cocleatos a partir de proteoliposomas derivados de microorganismos (Anexo 2) en lugar de utilizar los Flps sintéticos y/o comerciales (9). Para ello desarrollaron un proceso de diálisis rotacional continua, como se observa en la Figura 1.

El proceso provee de un soporte rígido (tubo plástico) a las membranas de nylon que sirven de contenedor para los proteoliposomas resuspendidos en detergente; el dispositivo es de fácil manipulación bajo condiciones asépticas, de cierre hermético y a la vez permeable a los solventes (18). La disposición casi vertical de los tubos de diálisis permite, que una vez puesta en marcha la rotación, las burbujas del interior realicen una homogenización mecánica muy efectiva tanto del contenido de éste como del tampón de calcio en el exterior (Figura 1). Con este procedimiento es posible controlar las interacciones entre los componentes del proteoliposoma dentro del tubo

de diálisis y el calcio en el tampón de formación que va penetrando al tubo a través de la membrana de diálisis. El AFCo1 derivado del proteoliposoma de *N. meningitidis* B fue la primera estructura obtenida con este procedimiento (9).

Estudios microscópicos han demostrado que el AFCo1 es una estructura tubular y multilaminar (17), aunque no ha sido posible determinar si están formados por una única lámina que se enrolla sobre sí misma como plantea Papahadjopoulos D y colaboradores (13) o si estas se forman y se ensamblan independientemente. De cualquier forma no resultaría extraño que así fuera, ya que los cocleatos derivados de proteoliposomas bacterianos tienen en su composición estructuras muy diferentes (proteínas, LPS, etc) a las descritas en los cocleatos derivados de Flps comerciales o sintéticos, que también pueden agregarse y ensamblarse de distintas maneras, principalmente, cuando se obtienen a partir de cationes diferentes al calcio o mezclas de Flps; dando origen a estructuras multilaminares con formas esféricas y hojas multilaminares planas (77).

Figura 1. Representación esquemática del sistema de diálisis rotacional utilizado. Tomado de Bracho G. 2004 (18)



II-3.2 APLICACIONES DE LOS COCLEATOS

Desde el punto de vista práctico las estructuras cocleares pueden tener numerosas aplicaciones. En general, constituyen estructuras muy atractivas para el diseño de sistemas de liberación ya que se han podido encapsular y adyugar antígenos de diversa naturaleza (proteínas, péptidos, ADN, LPS, polisacáridos, glicoproteínas, etc.) (8, 76). Por otro lado, la presencia de múltiples capas arrolladas sobre sí, permite la

protección de las moléculas en las capas interiores frente a la oxidación y a condiciones agresivas del medio (enzimas degradativas, pH extremos, etc.). De esta forma los antígenos de *Neisseria* encapsulados en el AFCo1, a diferencia de los encapsulados en AFPL1, conservaron sus propiedades inmunogénicas cuando se enfrentaron *in vitro* a pH extremos que simularon las condiciones del tracto gastrointestinal. De igual forma, ha sido demostrado que los cocleatos derivados de lípidos comerciales pueden proteger los antígenos incorporados en su estructura y acceder a las placas de Peyers para activar la respuesta inmune mucosal cuando se administran por vía oral (76). Los cocleatos también pueden ser liofilizados y almacenados a temperatura ambiente por largo tiempo sin que se afecte su estructura (72, 76).

La transformación del AFPL1 en AFCo1 demostró tener efecto adyuvante sobre los antígenos de *Neisseria* ya que se incrementó la respuesta inmune contra estos tanto a nivel sistémico como mucosal cuando se administraron por vía IN o intragástrica en ratones Balb/c (18, 58). Además, el AFCo1 ha sido efectivo para la adyuvación de antígenos de *Leishmania* (78), *Plasmodium* (79) y Virus de Herpes Simple (VHS) (57), entre otros. En estos trabajos se demostró que la respuesta inmune inducida contra los antígenos adyuvados se caracteriza por altos títulos de anticuerpos a nivel de mucosa (IgA) y sistémico (IgG) y proliferación de células T. De igual forma, AFCo1 indujo protección contra el VHS en un modelo de ratón inmunizado por vía IN (57). Sin embargo, las aplicaciones más exitosas de los cocleatos han sido, hasta el momento, como vehículos para la administración de vitaminas, nutrientes y principios activos (anti-inflamatorios y antibióticos) para el tratamiento de infecciones bacterianas, virales y fúngicas. Estas aplicaciones se encuentran lideradas por la compañía "Biodelivery Science Internacional (BDSI)" fundada por Gould-Fogerite y Mannino los que han generado numerosas patentes relacionadas con la obtención de cocleatos a partir de

lípidos comerciales (80) y han registrado una formulación para el tratamiento de infecciones causadas por *Candida albicans* con anfotericina B (81).

II-4 Principales bacterias causantes de enfermedades diarreicas

Entre los principales agentes bacterianos causantes de enfermedades diarreicas se incluyen *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1 y O139 y gran variedad de especies de los géneros *Salmonella* y *Shigella*, responsables de la disentería bacteriana; también se pueden mencionar cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Escherichia coli* enteropatógena que son las principales causas de la diarrea del viajero. Todos ellos son responsables de más de 2 millones de muertes cada año y los niños menores de 5 años son sus principales víctimas (1).

II-4.1 *VIBRIO CHOLERAЕ*

V. cholerae es una bacteria mótil, Gram-negativa perteneciente a la familia *Vibrionaceae*. Inicialmente se conoció como *Vibrio comma*, por su forma curvada y fue identificado en 1883 por Robert Koch en heces de pacientes con la enfermedad. Más de 200 serogrupos han sido identificados hasta el momento de acuerdo a las diferentes características del antígeno O del LPS del microorganismo. Hasta 1992 el serogrupo más importante de *V. cholerae*, desde el punto de vista clínico, era el O1. Este se divide en dos biotipos: Clásico y El Tor, que se identifican en base a criterios bioquímicos y fenotípicos. Estos biotipos a su vez pueden ser clasificados a través de métodos serológicos en tres serotipos: Ogawa, Inaba e Hikojima, aunque este último aparece raras veces. En 1992 ocurrió una epidemia de cólera en Madras, India, donde por primera vez se reportaron casos de cólera originados por una cepa de *V. cholerae* de serogrupo no-O1, que fue clasificada posteriormente como el serogrupo O139 (45)

II-4.1.1 EL CÓLERA

El cólera es una infección intestinal que produce vómitos y diarrea acuosa aguda; es causada por la bacteria *V. cholerae* del serogrupo O1 u O139. La enfermedad está muy relacionada con los elevados niveles de pobreza y la difícil situación socioeconómica en diversas regiones del mundo, principalmente de África y Asia. Una de las principales vías de transmisión del patógeno es de persona-persona por vía fecal/oral y a través de alimentos y agua contaminados, razón por la cual, la carencia de agua potable, el hacinamiento y falta de higiene son factores que predisponen a la enfermedad. Estudios epidemiológicos conservadores estiman que anualmente más de 1 millón de personas enferma por esta causa y más de 100 000 mueren, principalmente niños menores de 5 años (45). La OMS ha dictado medidas y apoyado campañas para mejorar la situación hídrica e higiénica, sin embargo no han sido efectivas debido al aumento de la emigración rural, las infraestructuras insuficientes, el cambio climático y la competencia que se establece entre las distintas prioridades sanitarias de las regiones afectadas. Es por ello que las vacunas se han convertido en una estrategia a corto plazo para mitigar los efectos de tan devastadora enfermedad. Diversas estrategias vacunales han sido evaluadas pero solo las vacunas orales de células enteras (Tabla 2) han tenido éxito (1)

II-4.1.2 FACTORES DE VIRULENCIA Y MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Las etapas en el proceso infeccioso de *V. cholerae* O1 u O139, incluyen la adherencia y colonización de la mucosa del intestino delgado y la producción de enterotoxinas entre las que se encuentra la toxina de cólera, una proteína multimérica que consiste en una subunidad activa A (CTA) y cinco subunidades B (CTB). La CTB es la responsable de la unión entre la toxina de cólera y los gangliósidos GM1 en la superficie de las células epiteliales, mientras que la CTA causa hipersecreción de fluidos y electrolitos a través de la estimulación de la adenilato ciclasa. La expresión de esta toxina es corregulada con la del Pili denominado TCP (TCP- del Inglés Toxin

Corregulated Pili) (82), identificado como un importante factor de colonización. Se han identificado otras toxinas como la Toxina de la Zónula Ocluída (ZOT- del inglés “zonula occludens toxin”) que aumenta la permeabilidad de la mucosa del intestino delgado o la enterotoxina accesoria de cólera (ACE - del inglés “Accesory Cholera Enterotoxin”), cuya acción sobre el íleon ligado de conejo produce la acumulación de grandes volúmenes de fluido. El mecanismo de acción de esta toxina no está completamente dilucidado, pero se piensa que favorece la formación de canales iónicos en las membranas intestinales (83).

Otra proteína muy relacionada con los pili es la Hemaglutinina Sensible a Manosa (MSHA del inglés mannose-sensitive hemagglutinin), varios estudios han demostrado que la aplicación de anticuerpos policlonales o monoclonales anti-MSHA a ratones infantiles induce protección y además previenen la acumulación de fluido en el intestino ligado de conejos; estos resultados sugieren que la MSHA juega un papel importante en la colonización de *V. cholerae* (84, 85). Otras proteínas de membrana externa asociadas con la patogenicidad de *V. cholerae* son las porinas. Particularmente, la OmpT (40 kDa) y la OmpU (38 kDa) que están bajo el control de ToxR (86). Se ha demostrado que OmpU media la adherencia a las células epiteliales humanas *in vitro* y que genera anticuerpos en voluntarios infectados experimentalmente con *V. cholerae* O1 (87).

II-4.1.3 RESPUESTA INMUNE

La respuesta humoral es importante para la protección contra el cólera. Los anticuerpos específicos contra *V. cholerae* en humanos con certeza juegan un papel en la protección, pero no existe evidencia directa acerca del isotipo o subclase que se requiere para garantizar la inmunidad contra este patógeno (10). Existen dos puntos de vista acerca del isotipo de anticuerpos que participan en la protección frente a *V. choleare* en humanos.

El cólera es una infección entérica y durante mucho tiempo se supuso que la IgAs específica era secretada al interior del lumen intestinal lo que podría facilitar el desarrollo de una respuesta protectora. Hoy se conoce que los anticuerpos IgAs constituyen el isotipo mayoritario en las secreciones mucosales y que su principal mecanismo de acción se basa en la inmunoexclusión y/o neutralización de microorganismos y toxinas, por lo que efectivamente, este pudiera ser el principal mecanismo de defensa contra el patógeno (88, 89). Ciertamente, altos niveles de IgAs específica frente al LPS de *V. cholerae* se han encontrado en sueros de pacientes convalecientes y en secreciones intestinales de pacientes restablecidos de la infección (90). La IgAs puede obstruir la colonización de *V. cholerae* interfiriendo con el LPS que recubre la vaina flagelar y reducir el movimiento y acceso a determinadas áreas de preferencia en el intestino. El otro isotipo de anticuerpos importante producido contra *V. cholerae* es el IgG. Estos anticuerpos están presentes en el suero y son, en su mayoría, específico contra el LPS del patógeno (91). La protección contra cólera se correlacionó con los anticuerpos IgG séricos a partir de ensayos que involucraban inmunizaciones parenterales con *V. cholerae* inactivado (92). Los anticuerpos IgG con actividad vibriocida presentes en el suero son la respuesta inmune mejor caracterizada en las infecciones causadas por *V. cholerae* O1. Luego de una infección natural contra el patógeno se generan fundamentalmente anticuerpos séricos con actividad bactericida en presencia de complemento (93). Se argumenta que los anticuerpos IgG en secreciones mucosales son más sensibles a la acción de las proteasas y por eso son menos efectivos que la IgAs, sin embargo el papel de los anticuerpos IgG en la protección necesita ser establecida.

Varias estrategias de vacunación han sido utilizadas para combatir a *V. cholerae*. En primer lugar, se obtuvieron las vacunas parenterales de células enteras inactivadas, que actualmente no son recomendadas por la OMS debido a su elevada reactogenicidad y baja eficacia (1). En su lugar, las vacunas orales han demostrado ser

más seguras y eficaces por lo que se han licenciados dos tipos principales: las vacunas de células enteras inactivadas y las vivas atenuadas (Tabla 2). La vacuna inactivada Dukoral™ producida por SBL, Suecia, se encuentra licenciada en más de 50 países y ha mostrado protección contra el serogrupo O1. El adyuvante mucosal CTB que es utilizado en esta vacuna ha mostrado un efecto sinérgico en la protección (94). Por otro lado la vacuna inactivada Sanchol, que es una variante tecnológica de Dukoral™ pero sin el componente CTB, se produce y está licenciada en Vietnam y la India. Esta vacuna ofrece protección además contra el serogrupo O 139 (45).

Las vacunas atenuadas han demostrado también ser efectivas. Sin embargo la vacuna Orochol™ compuesta por la cepa CVD 103-HgR fue retirada del mercado después de ser demostrado en ensayos clínicos que en condiciones de cólera-endémico inducía bajos niveles de protección (13,5% de eficacia). Sin embargo otros candidatos de vacunas atenuadas continúan desarrollándose como los candidatos vacunales 638 (95) y Perú 15 (96) que han mostrado ser muy inmunogénicos en los ensayos clínicos realizados.

II-4.2 SALMONELLA

Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos de aproximadamente 0,7-1,5 x 2-5 µm, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*). Son anaerobios facultativos con una temperatura óptima de crecimiento de 35-37°C y pH óptimo de crecimiento: 6,5-7,5 (97). *Salmonella* queda dividido en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* que posteriormente se dividen en 6 subespecies. El género *Salmonella* ha sido clasificado en varios grupos serológicos según el esquema de Kauffmann-White basado en la identificación de antígenos somáticos de superficie (O), capsular (K o Vi), y antígenos flagelares (H) derivados de los perfiles antigénicos por aglutinación con antisueros específicos (98). Dentro de la especie *Salmonella enterica* se destacan serovares de

interés como: *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) y serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), entre otros.

II-4.2.1 LA FIEBRE TIFOIDEA

La infección por *Salmonella* (salmonelosis) incluye varios síndromes que afectan a los seres humanos pero los más frecuentes son la fiebre tifoidea y la gastroenteritis (99). Reportes de la OMS, estiman que anualmente se producen entre 16 y 33 millones de casos de fiebre tifoidea que causan la muerte de más de 500 000 personas, principalmente niños y jóvenes con edades entre 5 y 19 años (1). Dentro de las vacunas licenciadas contra *S. Typhi*, se encuentran la inactivada de células enteras, que por su elevada reactogenicidad ha dejado de ser usada en muchos países; las vacunas de polisacárido Vi de *S. Typhi* (Poli Vi) y la viva atenuada compuesta por la cepa Ty21a. La vacuna de Poli Vi es de aplicación parenteral, se administra con una sola dosis e induce anticuerpos anti-Poli Vi protectores a nivel sistémico (22). Esta vacuna ha demostrado más de 70% de eficacia en varios ensayos clínicos con adultos y niños mayores de dos años, aunque no induce memoria y su efectividad en niños más pequeños es cuestionada (1). La vacuna viva atenuada es de aplicación oral e induce respuesta inmune, principalmente, contra antígenos proteicos y LPS a nivel sistémico y mucosal (22), pero debido a que requiere múltiples dosis para su efectividad (3-4 cápsulas) y no debe usarse en individuos inmunodeprimidos (vacuna viva) se continúan evaluando otras estrategias (1).

II-4.2.2 FACTORES DE VIRULENCIA Y MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

La virulencia de *Salmonella* spp. está estrechamente relacionada con el hospedero (100), causando diferentes síndromes en dependencia del reservorio animales que infeste. Los antígenos en la superficie de la bacteria juegan un papel crucial en el proceso de colonización en el íleon y el colón; una vez ingerido el bacilo, este alcanza rápidamente el intestino delgado se adhiere y penetra la mucosa por transcitosis a

través de las células M y los enterocitos (101). La bacteria invade las células epiteliales del colón y macrófagos, mediante mecanismos que involucran la unión a receptores D-manosa en las células epiteliales con las fimbrias y a través de un sistema de secreción tipo III (TTSS- del inglés "Type Three Secretory System"). El TTSS es codificado en las islas de patogenicidad en el cromosoma bacteriano (102) y media el contacto entre la bacteria y las células epiteliales. Las *Salmonellas* son patógenos intracelulares que también pueden causar la apoptosis de los macrófagos infectados y con ello iniciar una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias que incluyen interleucina 1 e interleucina 8 (103, 104). La habilidad de *Salmonella* para sobrevivir en macrófagos es definitivamente importante en la virulencia (105). Estudios realizados por Monack y colaboradores demuestran el papel del TTSS-2 en los mecanismos de sobrevivencia del microorganismo en células epiteliales y macrófagos (106), mientras que otros estudios sugieren que la estimulación de TLR puede afectar la expresión de TTSS-2 (107).

II-4.2.3 RESPUESTA INMUNE

Las infecciones naturales o experimentales con *Salmonella* tienen como resultado la estimulación de la respuesta humoral y la inmunidad mediada por células que fundamentalmente está dirigida contra el LPS, proteínas de membrana externa y el polisacárido capsular. Aunque las evidencias indican que la infección con cepas salvajes de *Salmonella* confiere inmunidad protectora y que esta además es serotipo específica; el número y la variedad de anticuerpos con distintas especificidades y el grado de reactividad cruzada, así como su actividad funcional en relación a su especificidad no ha sido bien dilucidada (108). La respuesta innata involucra una gran variedad de tipos celulares y diversos componentes (citocinas, quemoquinas, etc) que contribuyen a la inducción de respuesta inmune específica en el hospedero; varios estudios revelan la importancia de los macrófagos y neutrófilos en las etapas tempranas de la infección (109, 110).

La respuesta inmune específica puede contribuir grandemente en la eliminación del patógeno: amplificando la capacidad fagocítica y lítica de los macrófagos (estrés oxidativo) y potenciando el efecto citotóxico de células T CD8⁺ (CTL) (111). Por otro lado es importante tener en cuenta la inducción de respuesta inmune mucosal. La vacuna oral atenuada Vivotif (Tabla 2) ha demostrado ser efectiva, en la protección o inmunidad de grupo ya que no solo elimina el patógeno a nivel sistémico sino que lo neutraliza y excluye a nivel mucosal (112). Sin embargo la cepa atenuada no produce Poli Vi y no se han realizado ensayos comparativos concluyentes que permitan a la OMS recomendar una u otra vacuna para casos de epidemia (1). Actualmente se trabaja en estrategias que permitan aprovechar los beneficios de la administración mucosal y la inducción de respuesta contra Poli Vi, tal es el caso de una nueva variante atenuada productora del polisacárido y una vacuna conjugada que se encuentran en ensayo clínico (112).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III-1 Caracterización de un extracto de membrana externa de *V. cholerae* O1

El EMEt derivado de la Cepa C7258 *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa se obtuvo según proceso referido por Pérez JL y colaboradores 2006 (14). En primer lugar se cultivó la cepa C7258 en un medio compuesto por Peptona de carne (MERCK) 3 g/L, Triptona (MERCK) 17 g/L, K₂HPO₄ (MERCK) 2,5 g/L y NaCl (MERCK) 5 g/L, pH 7,2, durante 6h a 37°C y 200 rpm de agitación rotacional. A continuación el cultivo se centrifugó a 17 700 x g durante 1h a 4°C y la biomasa se lavó dos veces con SSTF y se resuspendió en una solución tampón 30 mM Tris y 2 mM EDTA pH 8,5 a razón de 210 mg/mL del tampón. Para la extracción se utilizó una solución al 15% del detergente Duodecil Sulfato de Sodio (SDS), de la que se añadieron, lentamente y con agitación, 0,0,25 mL por gramo de biomasa resuspendida. La suspensión se incubó en baño de agua con hielo durante 1h en agitación lenta y posteriormente se centrifugó a 17 700 x g durante 1h a 4°C, se desechó el sedimento y el sobrenadante se sometió a un tratamiento con DNasa y RNasa (Sigma, EUA) (0,1mg/20mL) durante 1h a 37°C. A continuación, la muestra tratada se centrifugó a 33 300 x g durante 30 min. a 4°C, el sedimento se desechó y el sobrenadante se ultracentrifugó a 65 000 x g durante 8h a 4°C. El sedimento que se obtuvo de la ultracentrifugación se resuspendió en 10 mL de una solución tampón 30 mM Tris pH 7,5 y se filtró a través de filtros sartorius Minisart-plus de 0,45 y 0,22 µm respectivamente y se almacenó a 4°C. Esta suspensión se denominó como extracto de membrana externa de *V. cholerae* O1 (EMEt). Una parte del sedimento se resuspendió en tampón 30 mM Tris - 2 mM EDTA pH 8,5 y se purificó por cromatografía de exclusión molecular. Para ello se utilizó una columna cromatográfica XK 16/100, empaquetada con Sephacryl S-1000 (Pharmacia) y equilibrada con 30 mM Tris-2 mM EDTA-SDS 0,5% a pH 8,5. Se aplicaron 4mL

(8mg/mL) de la muestra, lo que representa aproximadamente el 2% del volumen total de la columna. La cromatografía se desarrolló con un flujo volumétrico de 0,4 mL/min. (12cm/h) usando un Uvicord SII (280 nm, Pharmacia) y un Recorder Rec-102 (Pharmacia). Las 2 fracciones que componen el EMEt fueron denominadas como F1 y F2.

III-1.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Las proteínas se cuantificaron en las muestras mediante la técnica de Lowry (113). En todos los casos, se utilizó una curva estándar de albúmina de suero bovino (material de referencia del Instituto Finlay, Cuba) en un rango de concentración de 0,036 a 0,18 mg/mL.

III-1.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

El análisis electroforético se realizó en gel de acrilamida (Merck, Alemania) al 12,5%, de 1 mm de espesor y en condiciones reductoras con SDS al 0,1% (SDS-PAGE) (114). Las muestras se prepararon a una concentración de 1 mg/mL de proteína en el tampón para el tratamiento de las muestras (2% (p/v) SDS, (5% v/v) 2-mercaptoetanol (Merck, Alemania), 60 mmol/L TrisHCl pH 6,8, 10% (v/v) glicerol (Merck, Alemania), 0,001% (p/v) bromofenol azul (Sigma, EUA)) y se calentaron a 100°C durante 10 min. Las muestras se aplicaron a razón de 5-20 µg de proteína (determinado por Lowry, acápite III-1.1) por carril. Para evaluar el perfil de proteínas expresadas por la cepa C7258, se ajustó una suspensión celular a 10⁶ UFC/mL en SSTF y se lisó en el tampón de tratamiento de muestra e incubación a 100 °C durante 5 min. y se aplicaron 10 µL de cada muestra en el gel. Las corridas electroforéticas se realizaron a 80 V, durante 90 min. y los geles se tiñeron con azul Coomassie R-250 (LKB, Suecia). Las bandas se visualizaron y analizaron en un digitalizador de imágenes (ImageMaster, Pharmacia Biotech, Suecia).

III-1.3 INMUNOTRANSFERENCIA: IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS PROTEICOS EN EL EXTRACTO

El ensayo de inmunotransferencia se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Burnett WN (115). Brevemente, se realizó el SDS-PAGE a las muestras (acápite III-1.2) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond™-C extra, EUA) en cámara sumergida (BioRad, EUA) durante 14-16 horas, a 4°C, con una intensidad de corriente de 30 mA. Después de la transferencia, se procedió a bloquear los sitios libres de la membrana con leche descremada (Merck, Alemania) al 3% en SSTF, pH 7,2 durante 1 hora, a temperatura ambiente. Posteriormente, se utilizó un panel de AcM suministrados por el Instituto Finlay para identificar los principales antígenos en las muestras: anti-LPS Ogawa (2B4G5) (116), anti-TCP (10E10E1) (117), anti-MHSA (2F12F1) (118), anti-CTB (4E1G5), anti-CTA (1G10G5) (119), y anti-OmpU (9H12E6) (120). Los anticuerpos se diluyeron 1:200 en SSTF con leche descremada al 1% (p/v) y Tween 20 (Sigma, EUA) al 0,01% (v/v) y se incubaron 2 horas 37 °C. En el siguiente paso se adicionó un conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa (Sigma, EUA) diluido 1:5000 en SSTF y Tween 20 al 0,01% (v/v) durante 1 hora de incubación a temperatura ambiente. Por último, se realizó el revelado de las bandas mediante la adición de la solución de sustrato que contenía peróxido de hidrógeno (0,015%, v/v) (Fluka, Suiza), diaminobencidina (Sigma, EUA) (0,5 mg/mL), dimetilsulfóxido (1%, v/v) (Merck, Alemania) en tampón citrato (ácido cítrico 0,1 mol/L y Na₂HPO₄ 0,2 mol/L (BDH, Reino Unido), pH 5). Entre cada paso de incubación se realizaron cinco lavados de 5 min. cada uno, con SSTF y Tween 20 al 0,01% (v/v).

III-1.4 CUANTIFICACIÓN DE LPS

Las muestras, así como diferentes diluciones de un estándar de LPS obtenido y purificado en el Instituto Finlay a partir de la cepa C7258, se aplicaron en un gel de poliacrilamida (12,5%) en presencia de SDS y se realizó la electroforesis SDS-PAGE

como se describe en el acápite III-1.2. Posterior a la etapa de la electroforesis, los antígenos se transfirieron desde el gel a un papel de nitrocelulosa (Hybond™-C extra, EUA). La inmunotransferencia de las muestras se realizó como se describe en el acápite III-1.3 con la particularidad de que el AcM que se utilizó para la detección de las muestras fue el anti-LPS (2B4G5). El perfil reactivo obtenido se evaluó por densitometría, en un ImageMaster, Pharmacia. Con este programa se realizó la calibración del estándar del LPS purificado. Se obtuvo una curva de regresión con los valores de intensidad de las bandas y las cantidades correspondientes del estándar (3, 2, 1, 0,5 µg de LPS). Para cuantificar la cantidad de LPS en las muestras (EMEt, F1 y F2) se extrapoló el valor de intensidad de cada banda en la ecuación de regresión.

III-1.5 CUANTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS TOTALES

La concentración de fosfolípidos totales se determinó mediante el método de mineralización de Fiske Subbarow (121) que es reactivo al fósforo inorgánico. Las muestras a cuantificar se calentaron en baño de arena a 200°C hasta su evaporación. Posteriormente, se añadió 0,5 mL de HClO₄ (Merck, Alemania) al 70% con agitación vigorosa y los tubos se calentaron nuevamente a 200°C hasta su completa decoloración (1 hora). Luego se dejaron enfriar las muestras antes de añadir 7,5 mL de NH₄Mo₇O₂₄ (BDH, Reino Unido) al 0,22% y se agitó vigorosamente. Posteriormente, se adicionó 0,3 mL del reactivo de Fiske Subbarow (NaHSO₃ 30 g (BDH, Reino Unido), Na₂SO₃ 1 g (Merck, Alemania) y ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (ANSA, Merck, Alemania) 0,5 g en agua bidestilada) y se agitó nuevamente. Finalmente, se calentó 15 min. a 100°C en baño de agua (Retomed, Cuba) y se determinaron los valores de absorbancia a 832 nm (Ultrospec IIII, Pharmacia, Suecia). La concentración de fosfatos en las muestras se determinó utilizando una curva patrón de KH₂PO₄ (Merck, Alemania) a 2x10⁻⁴ mol/L y se convirtió a concentración de fosfolípidos por medio de un factor gravimétrico de 25.

III-1.6 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

Para la extracción de lípidos se utilizó el sedimento (50 miligramos de peso húmedo) sin resuspender del EMEt y se aplicó una variación del método de Folch, utilizada por Rahman y colaboradores (122). Brevemente, se añadió una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) al EMEt con una relación Volumen:Peso húmedo de 17:1 y se agitó 30 min. A continuación la muestra se centrifugó 3000 g por 30 min. y se colectó el sobrenadante. El sedimento se volvió a tratar con cloroformo:metanol y se colectó el sobrenadante. Los dos sobrenadantes se mezclaron y se les añadió dos volúmenes del reactivo de Folch con agitación hasta formar una sola fase. Las fases son separadas por centrifugación a baja rpm por 1 minuto. La fase superior y el precipitado en la interface son desechados y se colectó la fase inferior (cloroformo/FIps) que se secó al vacío y se almacenó a 2-8 °C hasta su análisis. El reactivo de Folch se preparó con una mezcla de cloroformo:metanol:agua (3:48:47) y cloruro de potasio al 0,74% (cloroformo 0,3 mL:metanol 4,8mL:agua 4,7mL y KCl 72,5mg).

III-1.7 IDENTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS

Con el objetivo de estudiar los lípidos presentes en el EMEt, se realizó un estudio de cromatografía en capa delgada (123, 124). La muestra de lípidos extraída con el protocolo anterior se disolvió en 10 µL de cloroformo y se aplicaron en forma de punto en dos placas de sílica gel 60 con soporte de vidrio (5 µL por cada placa). Las placas se introdujeron en una cámara con una atmósfera que se dejó saturar con una mezcla de cloroformo:metanol:agua (65:25:4) durante 1 hora. Luego de la corrida se dejaron secar las placas a temperatura ambiente y se revelaron con dos sistemas diferentes. Una de ellas se roció con 2.5 mL de reactivo Dittmer (Sln A=4g de óxido de molibdeno en 100 mL de H₂SO₄ y Sln B=0,18 g molibdeno en 50 mL de SlnA: Se preparan 50mL de Sln A+50 mL de Sln B) disuelto en 5 mL de agua y 7,5 mL de etanol absoluto, se deja reposar 15 min. a temperatura ambiente. La otra placa se roció con reactivo de

Ninhidrina (0,2 g de Ninhidrina se disolvieron en 100 mL de butanol, la mezcla se saturó con agua, agitó y dejó reposar durante 1 hora; finalmente se extrajo y utilizó la fase inferior) y se secó a 100°C en el horno. Las muestras se analizaron por densitometría con el digitalizador de imágenes y el paquete de programas ImageMaster1D elite (Pharmacia, Suecia). Este programa permite determinar el porcentaje que representa cada mancha (Flps), con relación al resto, de acuerdo a su intensidad. Además, con el programa se puede calcular el Rf para cada mancha. El Rf mide la relación entre la longitud que migra cada una de las manchas y la longitud que recorre el solvente; esto permitió estimar las especies de Flps en las muestras (Anexo 3).

III-1.8 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN. TINCIÓN NEGATIVA

Se prepararon las rejillas (125) con membranas Formvar/Carbón y se colocó una gota de las muestras resuspendidas en tampón Tris 30mM y se secaron con papel de filtro sobre un fragmento de papel parafilm. Posteriormente se aplicó sobre la rejilla 20 µL (200 mesh) de una solución acuosa al 1 % de vanadato de metilamina (Nanovan; Nanoprobes, Stony Brook, NY, USA) y se secó inmediatamente con papel de filtro para eliminar el exceso. Las muestras secas se examinaron en un microscopio de transmisión electrónico LEO 912 operando a 120 kV de energía. Las imágenes digitales de alto contraste se obtuvieron con una cámara CCD Proscan de 14 bit /2K.

III-1.9 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las muestras se colocaron en láminas de cristal (125) y se sumergieron en una mezcla líquida de propano/isopentano (3:1, v:v), posteriormente se secaron por punto crítico (toda la noche a temp=-80°C) y se realizó un proceso de metalizado con oro y paladio (Metalizador Polaron SC515). Las muestras se observaron en un microscopio JSEM 6400 que trabajó con un voltaje entre 6 y 3 kV y con una interfaz digital ADDA3.

III-1.10 ESPECTROSCOPIA DE CORRELACIÓN FOTÓNICA Y POTENCIAL Z

Estos análisis se realizaron con un Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Los experimentos para determinar el tamaño de las vesículas se realizaron con una fuente de láser fija con una potencia de 4,5mW, máxima salida de 5mW a 670nm y ángulo de luz desviada a 90°. Se analizó el diámetro medio y polidispersión de las partículas. Por otro lado, se evaluó el potencial Zeta con el mismo equipo. Se utilizó un límite de rango entre -120 y +120V en modo automático. Las muestras se diluyeron en Tris 30mM y 1mM de NaCl a una concentración de 0,15mg/mL. Se realizaron diez réplicas en cada uno de los lotes experimentales evaluados y se determinó la media aritmética de la talla y el potencial de membrana con sus correspondientes desviaciones estándar (DE).

III-1.11 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

En primer lugar, las muestras se delipidaron como lo describen Uli L y colaboradores(70). Brevemente, se mezclaron 4-6 volúmenes de éter etílico con el EMEt (1 mg proteína/mL) en solución acuosa y se agitó durante 10 min. a temperatura ambiente. Después de una breve centrifugación a 10 000 g la fase superior (lípidos) se desechó y el proceso se repitió tres veces con la fase inferior. Esta fase acuosa se secó por centrifugación-evaporación y el sedimento se disolvió en la solución de rehidratación (7,5 M urea, 1,5 M thiourea, 2% CHAPS, 0,5% ASB-14, 15% glicerol, 1% ditiotretitol, 1% anfolitos con rango pI entre 3–10).

El análisis de focalización de punto isoeléctrico (primera dimensión) se realizó en un equipo IPGphor (Amersham Biosciences) con tirillas pre-preparadas de 18 cm de largo con un rango de separación de pI entre pH 3-10 (NL Immobiline™ gel strips). Las tirillas se prehidrataron a temperatura ambiente toda la noche. La focalización se realizó con un gradiente de voltaje (28 kV/h) a 20°C. Posteriormente las tirillas se incubaron en tampón para equilibrar las cargas de las proteínas con SDS [50 mM Tris-

Cl, pH 8,8, 6M urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS, 0,001% (p/v) bromofenol azul, y 1% (m/v) ditiotreitól por 15 min. y a continuación se incubaron con este mismo tampón pero en lugar del ditiotreitól se utilizó 2,5% de iodoacetamida (m/v) por 15 min. más. La separación en la segunda dimensión fue realizada en un equipo de electroforesis Ettan Daltsix (Amersham Biosciences) sobre un gel de poliacrilamida al 10% y 1 mm de grosor a 17 W por gel durante 4 horas. La tinción de los geles se realizó con azul Coomassie R-250 (LKB, Suecia), y posteriormente se escanearon con un procesador de imágenes (Fujifilm LAS 300) y analizaron con el programa Progenesis PG240 versión 2006 (Nonlinear dynamics Ltd., Reino Unido).

III-2 Obtención del AFCo2 a partir del PLc

A partir de los resultados obtenidos con la caracterización del EMET se determinó renombrar las estructuras que lo componen como PLc y este se utilizó como materia prima para la obtención del AFCo2. Para ello se realizó un proceso de diálisis rotacional continua con cuatro variantes que permitieron seleccionar las mejores condiciones para obtener los cocleatos eficientemente. Para la primera variante (V1) se utilizó un protocolo estándar referido por Bracho G. 2004 (18). Brevemente, el PLc se resuspendió en tampón de resuspensión (TR) compuesto por: Tris-hidroxi metilaminometano (Tris) 30 mmol/L (Fluka, Suiza), ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA) 0,02 mmol/L (BDH, Reino Unido) y desoxicolato de sodio al 1,5% (DOC, Merck, Alemania). La concentración de proteínas de esta solución fue ajustada a $1,1 \pm 0,3$ mg/mL (Lowry, acápite III-1.2). A continuación, la suspensión se colocó en tubos con membrana de nylon como muestra la Figura 1 y se dializó contra un tampón de formación (TF) compuesto por Tris 30mm, NaCl 100mM y CaCl₂ 5mM. Se realizaron 5 cambios del TF a razón de 4 horas entre cada uno de ellos.

En la segunda variante (V2) solo se eliminó el EDTA del TR y se mantuvieron el resto de las condiciones antes descritas.

En la tercera variante (V3) se eliminó también el EDTA del TR pero además se incrementó la concentración del CaCl_2 en el TF a 10 mM.

En la última variante (V4) se eliminó también el EDTA del TR, igual que la V2, pero en lugar de hacer los cambios cada 4 horas estos se realizaron cada 2 horas y se adicionó un cambio extra, o sea 6 en total.

En todos los procesos se utilizó una membrana de nylon de nitrocelulosa regenerada (7 Spectra/Por Membrana, EUA), con tamaño de poro de 10 KDa. El tubo con la membrana acoplada (Figura 1) se calentó hasta ebullición en una solución de Na_2HCO_3 (BDH, Reino Unido) al 1% durante 10 min. y se esterilizó a 121°C , 1 atmósfera de presión por 15 min. (ASH260, ICEM, Cuba) en agua destilada. El PLC se resuspendió en el TR, incubó 20 min. a 37°C y finalmente se sonicó durante 30 min. en baño de sonicación con hielo (RetoMed, Cuba). Posteriormente, la resuspensión se filtró (0,22 μm , Minisart, Sartorius, Alemania) directamente al tubo acoplado con la bolsa de diálisis en la propela del homogenizador (Janke and Kunkel, Alemania). En el proceso de diálisis rotacional continua ocurrió la adición de calcio y la eliminación simultánea del detergente a pequeña escala (1,5 – 50 mL). La transformación estructural del PLC en AFCo2 se evaluó mediante microscopía óptica y electrónica (ver acápites III-1.8, III-1.9, III-2.2.1 y III-2.2.2).

III-2.1 DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE INCORPORACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL PLC EN EL AFCo2

La eficiencia de la incorporación se evaluó a partir de la determinación del porcentaje de Flps y proteínas del PLC que se encapsularon en el AFCo2. Para ello se utilizó la capacidad que tienen las suspensiones, como el AFCo2, para sedimentar espontáneamente o luego de una centrifugación leve. Entonces, se calculó la relación entre el contenido total de Flps y proteínas en la suspensión, denominado como AFCo2tot, y en el sedimento que se obtiene luego de dejar reposar la formulación o

centrifugarla 3000 g X 15min, eliminar el sobrenadante y resuspenderla en TF (AFCo2res). La formula general que se aplicó fue: $\%Inc = AFCo2res / AFCo2tot \times 100$,

III-2.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ESTRUCTURAS OBTENIDAS

III-2.2.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

Para la observación al microscopio óptico, se montó una gota de la muestra de AFCo2 en un portaobjeto y se cubrió con un cubre objeto. La observación se realizó en un microscopio óptico con contraste de fase, y un aumento de 400 veces (OPTON Standard 25, Alemania). Las muestras se prepararon en TF (dilución 1:10) y las micropartículas se contaron en una cámara de Neubauer. El tamaño de las estructuras se determinó a partir de una escala graduada acoplada a el lente del ocular (retículo ocular 10:100, 19 mm, W-Kpl 10x/18, Carl Zeiss, México) del microscopio mediante la medición de la longitud (μm) de 200 partículas en cada muestra. Los resultados se procesaron como la media aritmética del análisis de 3 lotes experimentales y su DE.

III-2.2.2 MICROSCOPIA DE CONGELACIÓN Y FRACTURA

Las muestras se colocaron entre dos láminas de cobres (Bal-tec, Lichenstein) y enfriaron rápidamente por inmersión en una mezcla criogénica de propano/isopentano 3:1 (v:v) a $-190\text{ }^\circ\text{C}$.. La fractura se realizó a $-100\text{ }^\circ\text{C}$ y 10^{-6} torr (Jeol JFD-9010C) y luego las muestras se sombrearon con platino/carbón (PtC, Agar Scientific, Reino Unido) a un ángulo de irradiación de 45° y recubrieron con carbón a un ángulo de 90° . Las replicas se limpiaron con acetona y se colocaron en las rejillas de cobre (100 mesh) y dejaron secar hasta su análisis en un microscopio de transmisión electrónico LEO 912 que se trabajó a 80 kV de energía. Las imágenes digitales de alto contraste se obtuvieron con una cámara CCD Proscan de 14 bit /2K.

III-2.2.3 PREPARACIÓN Y OBSERVACIÓN DEL AFCO2 CON SONDA FLUORESCENTE

AFCo2 se mezcló con Ova-TR (Invitrogen, Ltd. Reino Unido) por 10 min con agitación a 100 rpm. La mezcla se lavó tres veces con TF. Este proceso se realizó por

ultrafiltración (10 000 rpm X 1h) con una membrana Amicon de 100 000 kDa y las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su análisis. A continuación una de las muestras se sometió a un proceso de sonicación (15 min. baño de sonicación) para disociar la mayor cantidad de Ova-TR posible adsorbida o asociada superficialmente con el AFCo2. La muestra se lavó por ultrafiltración nuevamente y se guardó a 4°C hasta su análisis. Las muestras se observaron en un microscopio de epi-fluorescencia (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Alemania) y las imágenes fueron obtenidas con una cámara acoplada al equipo (Canon 350D DSLR).

III-3 Determinación del efecto de la transformación del PLc a AFCo2

Se compararon los perfiles proteicos del PLc y el AFCo2 a través de electroforesis en condiciones reductoras y tinción con azul Coomassie R-250 como se describió en el acápite III-1.2. El efecto sobre la identidad de los principales antígenos identificados se evaluó a través de la técnica de inmunotransferencia con AcM según el epígrafe III-1.3. Finalmente para la determinación de la inmunogenicidad del AFCo2 y su efecto sobre el Poli Vi de *S. Typhi* se realizaron los siguientes estudios de inmunogenicidad.

III-3.1 ANIMALES DE LABORATORIO

Los estudios en animales se realizaron en ratones Balb/c procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba. Se emplearon ratones hembras con 6-8 semanas de edad y 20 ± 2 g de peso corporal al inicio de los experimentos. La atención de los animales se realizó de acuerdo a las normas institucionales establecidas, según la Guía para el cuidado y empleo de los animales de laboratorio de la Comunidad Económica Europea (126) y con la aprobación de los Comité de Ética para el trabajo con animales de laboratorio. Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24°C), humedad (20-25%), ciclo alternativo de luz/oscuridad de 12 horas, así como recibieron alimentación y agua acidulada con HCl a un pH entre 2,5 y 2,8 *ad libitum*. Para todos

los experimentos, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en grupos individuales de 5 animales.

III-3.2 INMUNIZACIONES Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

El efecto *in vivo* de la transformación del PLc en AFCo2 se evaluó a través de dos esquemas de inmunización. El primer esquema consistió en la administración de dos dosis espaciadas 28 días por vía IN y el otro esquema se realizó con tres dosis espaciadas 7 días por la misma vía. Las muestras se obtuvieron después de la última dosis en ambos esquemas: saliva y heces a los 7 días y suero a los 14 días. Se utilizaron 4 grupos de ratones Balb/c (n=5) que se inmunizaron con 10 μ L en cada fosa nasal con las formulaciones siguientes:

- ❖ AFCo2:100 μ g (proteína)/ 20 μ L
- ❖ PLc:100 μ g (proteína)/ 20 μ L
- ❖ Candidato atenuado 638 (Lote 5003, Instituto Finlay): 5×10^8 UFC/ 20 μ L
- ❖ Placebo: SSTF/ 20 μ L

En el segundo experimento se evaluó el efecto del AFCo2 sobre el Poli Vi (IFA: Lote 8003, Instituto Finlay). Para ello se mezclaron diferentes cantidades de AFCo2 y Poli Vi y se coadministraron o administraron ambos por separado en los ratones Balb/c. Estos grupos se inmunizaron por vía IN con el esquema de tres dosis y 10 μ L en cada fosa nasal. También se utilizó un esquema de una sola dosis de 100 μ L por vía IM con la Vacuna vax-TyVi como control positivo del experimento (suministrada por el Instituto Finlay, Lote 9009) y los correspondientes grupos placebo. La saliva y heces de los animales se colectaron y procesaron a los 7 días posteriores de la última dosis. De igual forma el suero se obtuvo a los 14 días después de la última dosis. A continuación se describen los grupos que se evaluaron:

Intranasal (IN)	Intramuscular (IM)
❖ ACo2 (100 µg)+Poli Vi (25 µg)/ 20 µL	❖ vax-TyVi 5 µg/ 100 µL
❖ Poli Vi (25 µg)/ 20 µL	❖ Placebo (SSTF)/ 100 µL
❖ ACo2 (100 µg)/ 20 µL	
❖ Placebo (SSTF)/ 20 µL	

III-3.2.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO

En todos los casos, la extracción de sangre se realizó mediante punción retroorbital con capilares heparinizados. Las muestras de sangre se incubaron durante 1 hora a 37°C, posteriormente se centrifugaron a 12500 g durante 20 min. y se extrajo el suero. Los sueros fueron conservados a -20 °C hasta su evaluación.

III-3.2.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SALIVA

Para la extracción de muestras de saliva, se estimuló la salivación en los animales con la aplicación intraperitoneal de 100 µL de pilocarpina al 0,5% (IMEFA, Cuba) por ratón. Las muestras se obtuvieron en forma de mezclas o individuales y se mantuvieron sobre hielo durante la extracción. Finalmente se inactivaron a 56°C durante 15 min. y se centrifugaron a 9 500 g durante 15 min. a 4°C. El sobrenadante se colectó y conservó a -20°C hasta su evaluación.

III-3.2.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE HECES

De 3 a 6 piezas de heces frescas con un peso total aproximado de 100-200 mg fueron recolectadas y resuspendidas con agitación fuerte en una solución inhibidora de proteasas [1 mM fenylmetil sulfonilfluoruro en etanol, 5 µg/mL de aprotinina, 1 µg/mL de leupeptina, antipaina y pepstatina (Sigma, EUA)] en una proporción de 20 µL por mg de heces frescas. Finalmente las muestras individuales se centrifugaron a 10 000 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante se conservó a -20°C hasta su evaluación.

III-3.3 ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS (ELISA). DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS

En todos los ELISAs realizados se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos MaxiSorp, Nunc (PLc) o PoliSorp, Nunc (Poli Vi). Las placas se recubrieron según el ensayo con: PLc (5 $\mu\text{g/mL}$) o Poli Vi (10 $\mu\text{g/mL}$) a 4°C y se incubaron durante 12-18 horas. Las placas que se recubrieron con Poli Vi fueron tratadas previamente con Poli-L-Lisina 3 $\mu\text{g/mL}$ (1h en cámara húmeda a 20-25°C) para mejorar la adhesión del polisacárido a la placa (127). En todos los casos, el bloqueo se realizó con 100 μL /pozo de la solución de bloqueo (SB), 1% de albúmina de suero bovino en SSTF más 0,05% de Tween 20 durante 1 hora a 37°C y se añadieron las muestras y el conjugado como se describe en los siguientes acápite. Para revelar se utilizó 100 μL /pozo de una solución que contenía: 0,4 mg/mL del cromógeno o-phenylenediamina (Sigma, EUA) y 0,012% de peróxido de hidrógeno diluidos en tampón sustrato (ácido cítrico 0,1 M y Na_2HPO_4 0,2 mol/L, pH 5) a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. Luego de detener la reacción mediante la adición de 50 μL de HCl 2,5 mol/L (BDH, Reino Unido), se realizó la lectura de la DO a 492 nm en un lector de placas de ELISA (Titertek, Multiskan Plus; Labsystem). Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda y seguido a cada paso de incubación, se realizaron 4 lavados con SSTF y Tween 20 al 0,05% (v/v).

III-3.3.1 ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IgG EN SUERO CONTRA PLC Y POLI VI

Los sueros procedentes de los animales en estudio se adicionaron por duplicado con una dilución 1:100 en SB y se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se adicionó un conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa (Sigma, EUA) diluido 1:2500 en la SB y la placa se incubó 1 hora a 37°C.

III-3.3.2 ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IgA EN SALIVA Y HECES CONTRA PLC

Las muestras de saliva o heces se prepararon en una dilución de 1:2 en SB y luego se incubaron 2 horas a 37°C. Posteriormente, se añadió un conjugado anti-IgA de ratón-peroxidasa (Sigma, EUA) diluido 1:1000 en SB y se incubó la placa 2 horas a 37°C.

III-3.2.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD VIBRIOCIDA DEL SUERO

Se siguió un procedimiento previamente descrito por Cedré y colaboradores (128). Brevemente, El día anterior a la prueba se sembró la cepa de referencia VC12, *V. cholerae* O1, Clásico Ogawa en placas de agar BHI (Agar cerebro corazón) y se incubaron toda la noche a 37°C junto con dos cuñas del mismo medio sin inocular. Al día siguiente se tomaron colonias aisladas de las placas y se sembraron en las cuñas, las cuales se incubaron por 4 horas a 37°C. A continuación se preparó una suspensión celular con SSTF y se ajustó a una DO entre 0.9-0.95 a 550 nm, de la cual se realizó posteriormente una dilución de 1:10. En el siguiente paso se realizaron diluciones seriadas de los sueros a evaluar desde 1:10 hasta 1:20480 en una placa de microtitulación de 96 pozos estéril y a continuación se le adiciona a cada pozo 25 µL de una mezcla (v:v) de bacteria y el complemento de gazapo que se diluye inicialmente 1:5. Las placas se incubaron 1 hora a 37°C y se les añadió 150 µL/pozo de caldo LB con glucosa y púrpura de bromocresol, ambos al 2% (los pozos toman color púrpura). Las muestras se incubaron nuevamente por 3 horas a 37°C y se procedió a la lectura por observación visual. El título se define como la mayor dilución del suero que causa inhibición completa del crecimiento bacteriano dado por la invariabilidad del color del medio de cultivo. Se consideraron como animales respondedores a aquellos cuyo título de actividad vibriocida era igual o mayor que 1:40. Los resultados se expresaron como la media del logaritmo del título de anticuerpos vibriocidas en el suero y la DE de estos.

III-4 Análisis Estadístico

Para todos los análisis estadísticos realizados, se utilizó el paquete de programas GraphPad Prism v4.00 (GraphPad Software Inc. 2003). La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Barlet. En los casos necesarios, se realizaron transformaciones de los datos para lograr normalidad. Las diferencias significativas entre las medias se determinaron por la prueba t-Student o el análisis de comparaciones múltiples, prueba de Tukey, previa comprobación de diferencias entre los grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. Los datos para los cuales no fue posible un ajuste a una distribución normal, se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y las medias se compararon con la prueba de Dunns. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas para valores de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV-1 Composición del EMET y caracterización estructural

El EMET se obtuvo través del método descrito por Pérez JL y colaboradores (14) y se identificaron y cuantificaron importantes componentes estructurales y antigénicos. Los estudios morfológicos demostraron que estos componentes se encuentran ensamblados y formando vesículas que se denominaron como PLc.

IV-1.1 CUANTIFICACIÓN DE LPS EN EL EXTRACTO

El LPS es uno de los antígenos más importantes reconocidos en la protección contra *V. cholerae* por lo tanto es muy importante determinar qué cantidad hay en las muestras que se evaluaron. Para ello se utilizó un método de inmunotransferencia que no sólo permitió su cuantificación sino que también brindó información sobre las propiedades inmunoquímicas del LPS. Como se observa en la Figura 2 en los carriles del 1 al 4 se utilizó un estándar de LPS purificado y se calibró la curva utilizando el programa ImageMaster (Figura 2B). En el carril 5 se evaluó una muestra del EMET (Figura 2A) y se analizó teniendo en cuenta la curva de calibración. En la Tabla 3 del siguiente acápite se muestran los resultados obtenidos en las muestras analizadas. De manera general la relación entre LPS/Proteína fue de 0,284 (0,71:2,5), lo que indica que el LPS representa aproximadamente el 30% (p/p) con respecto a las proteínas totales en el EMET.

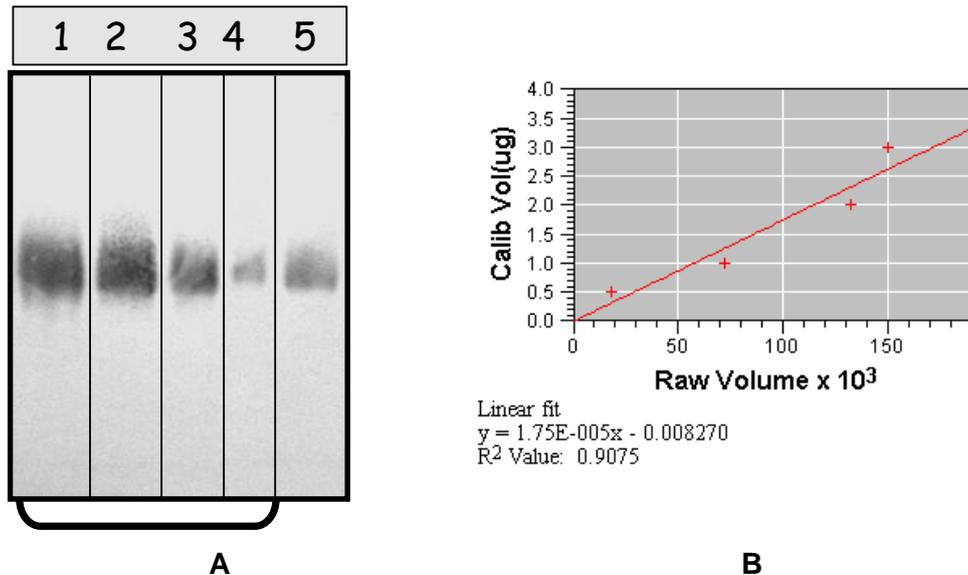


Figura 2. Cuantificación del LPS por inmunotransferencia. El perfil reactivo muestra el reconocimiento del AcM 2B4G5 (anti LPS Ogawa) en los carriles del 1 al 4, a una curva estándar de LPS con 3, 2, 1 y 0,5 µg de LPS respectivamente. En el carril 5 se transfiere una muestra del EMEt (2,5 µg de proteínas) en la que se detectan 0,71 µg de LPS. B muestra la regresión de los resultados calibrados por el programa ImageMaster.

IV-1.2 IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS EN EL EXTRACTO Y LAS FRACCIONES PURIFICADAS

El extracto está compuesto por dos fracciones cromatográficas como lo describen Pérez JL y colaboradores (14) y se muestra en la Figura 3A. Dentro de este acápite se muestran resultados relacionados con la identificación de antígenos en ambas fracciones:

-Para cuantificar las proteínas totales en el EMEt y en las fracciones 1 y 2 (F1 y F2) que se observan en la Figura 3A, se realizó el método de Lowry (113) y luego se analizaron a través de electroforesis e inmunotransferencia. En la Figura 3B puede observarse el perfil electroforético de las fracciones y el EMEt obtenido por SDS-PAGE. En el EMEt se detectaron varias bandas entre los pesos moleculares de 94 y 14,4 kDa con una banda mayoritaria de 38 kDa. En la F1 predominó solo la señal de la banda de 38 kDa, mientras que F2 mostró un perfil similar al EMEt pero con menor intensidad que las bandas representadas en el EMEt, particularmente en la banda de 38 kDa (Figura 3B).

El EMEt se analizó a través de una electroforesis bidimensional (2-D) para corroborar los resultados del SDS-PAGE e identificar señales de proteínas que son imposibles de identificar con electroforesis en una sola dimensión (1-D).

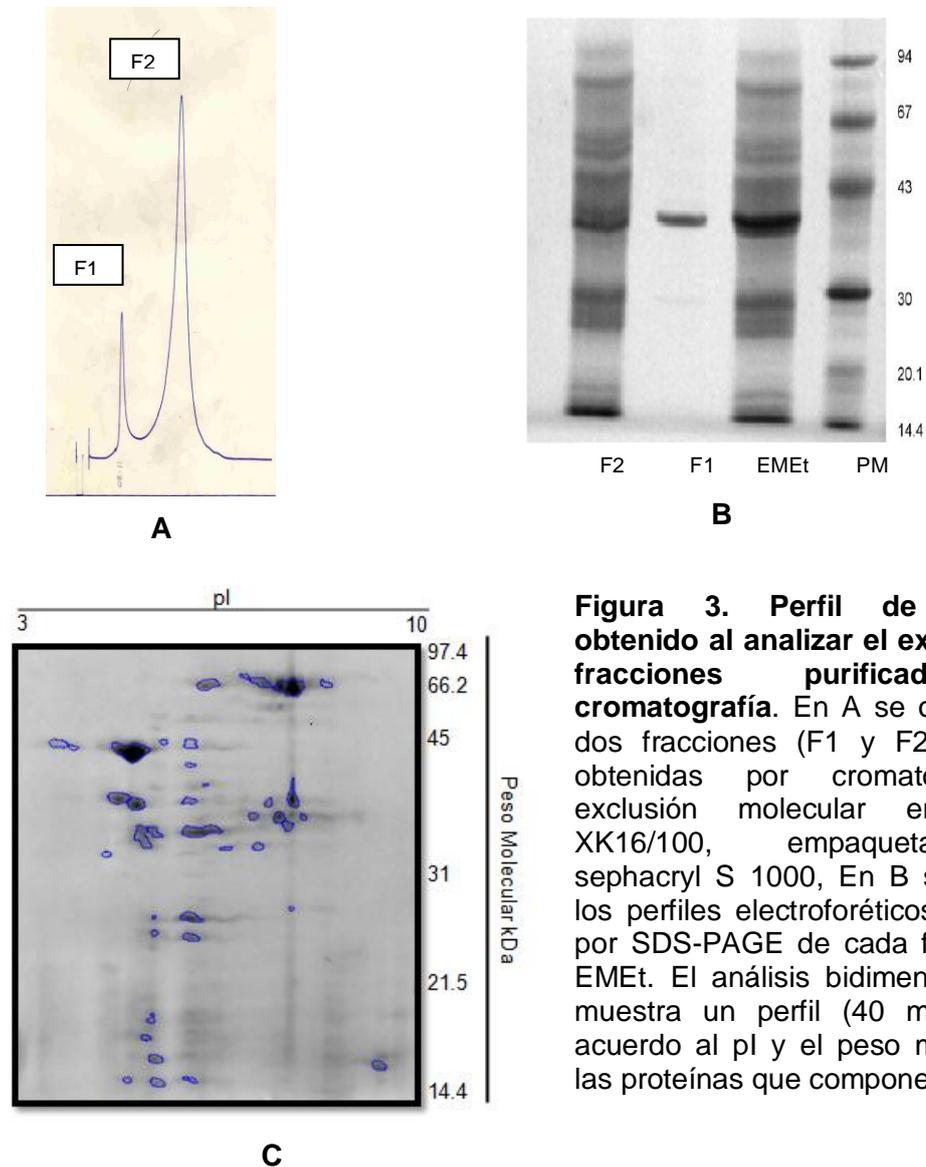


Figura 3. Perfil de proteínas obtenido al analizar el extracto y las fracciones purificadas por cromatografía. En A se observan las dos fracciones (F1 y F2) del EMEt obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en columna XK16/100, empaquetada con sephacryl S 1000, En B se observan los perfiles electroforéticos analizados por SDS-PAGE de cada fracción y el EMEt. El análisis bidimensional en C muestra un perfil (40 manchas) de acuerdo al pI y el peso molecular de las proteínas que componen el EMEt.

El análisis en 2-D de esta muestra se observa en la Figura 3B y reveló 40 manchas, principalmente en el rango entre 30-97 kDa, que pueden estar relacionadas con un número mayor de proteínas que las identificadas por el SDS-PAGE. De igual forma se observó una mancha mayoritaria de peso aproximado 38 kDa que representó \approx el 30 % del total de las manchas que se observan. Para realizar la electroforesis 2-D se delipidaron previamente las muestras con una modificación del protocolo realizado por

Uli L y colaboradores (70), donde se incrementó el proceso de extracción de 4 a 6 volúmenes de éter etílico, ya que con 4 volúmenes se formó un mezcla viscosa que no se pudo fraccionar en las sucesivas etapas de centrifugación.

-Para identificar la composición antigénica del extracto se utilizó una batería de AcM dirigidos contra los antígenos más importantes de *V. cholerae* O1. Como puede observarse en la Figura 4B se corroboró la presencia de LPS en el EMEt e identificaron dos importantes proteínas en su composición: la MSHA (17 kDa) y la porina de membrana OmpU (38 kDa). Sin embargo no fueron detectados otros antígenos proteicos como CTA, CTB o TCP. En la Figura 4A puede observarse que en el lisado de la cepa C7258 tampoco se detectaron estos antígenos

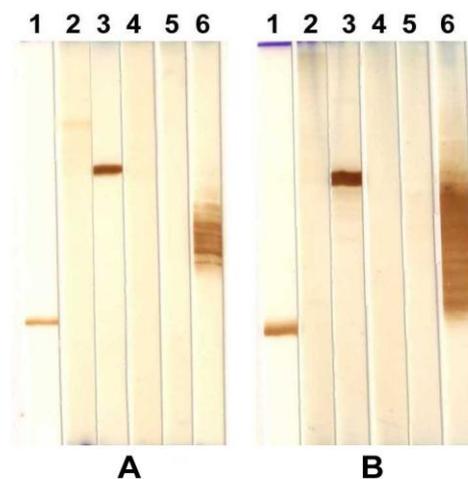


Figura 4. Identificación de antígenos de *V. cholerae* por inmunotransferencia.

En A se transfiere un lisado celular de la cepa *V. cholerae* C7258 y se enfrenta a un panel de AcM: en el carril 1, 3 y 6 hay reconocimiento a los AcM 2F12F1 (anti-MSHA), AcM 9H12E6 (anti-OmpU), AcM 2B4G5 (anti-LPS Ogawa) respectivamente, mientras que en los carriles 2, 4 y 5 los AcM 10E10E1 (anti-TCP), AcM 4E1G5 (anti-CTB) y AcM 1G10G5 (anti-CTA), respectivamente no hay reconocimiento. En B se transfieren muestras del EMEt y se observa que el reconocimiento fue igual que en A al LPS (30 kDa), OmpU (38 kDa) y MSHA (17 kDa)

Para determinar la composición antigénica de las fracciones se realizó un ensayo de inmunotransferencia donde se enfrentaron F1, F2 y el EMEt a los AcM anti-LPS y anti-OmpU. Como se observa en la Figura 5, ambas fracciones también contienen LPS y la banda de proteína de 38 kDa que se observó en los estudios de electroforesis

corresponde con la OmpU. Esta proteína también se encuentra distribuida heterogéneamente en las dos fracciones.

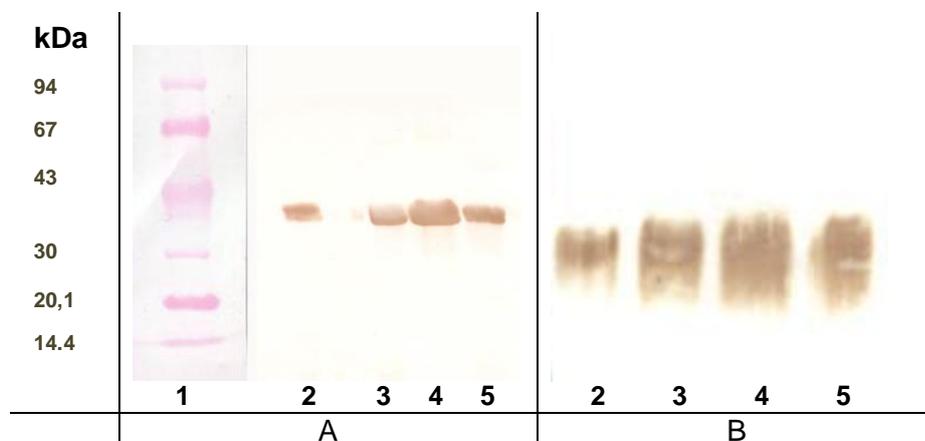


Figura 5. Análisis de las fracciones por inmunotransferencia . En este ensayo F1, F2 y EMEt se enfrentan a (A) AcM anti-OmpU y (B) AcM anti-LPS. En el carril 1 el PPM y en el resto de los carriles se observa que el reconocimiento es positivo en cada caso a los anticuerpos enfrentados: carril 2- lisado celular de El Tor Ogawa *V. cholerae* O1 C7258, carril 3-EMEt, carril 4-F1, carril 5-F2. En ambos ensayos se aplicaron las siguientes cantidades de proteína: 8 μ g de EMEt, 5 μ g de F1 y 10 μ g de F2.

IV-1.3 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS

Para la cuantificación de Flps totales se utilizó el método de mineralización de Fiske-Subarrow (121) y se determinó el contenido de fósforo inorgánico. Al ajustar por un factor gravimétrico se estimó la concentración total de Flps en las muestras. Como se observa en la Tabla 3 los Flps representaron el 60 % de las proteínas totales en el EMEt y más del 20 y 30% para las F1 y F2 respectivamente.

Tabla 3. Composición del extracto y las fracciones

Muestra	Proteína mg/mL	LPS mg/mL	Flps mg/mL
EMEt	1	0,28 (0,06)	0,62 (0,12)
F1	1	0,46 (0,1)	0,25 (0,15)
F2	1	0,25 (0,07)	0,32 (0,11)

En la siguiente tabla se observa el contenido de LPS y fosfolípidos cuantificados por inmunotransferencia y el método de mineralización de Fiske-Subarrow, respectivamente. Los valores de concentración están referidos contra 1 mg/mL de proteínas totales en el EMEt, F1 y F2 que fueron calculadas utilizando el método de Lowry. Los resultados se expresan como las medias y la DE de las muestras analizadas.

La identificación de los Flps se realizó a través de cromatografía en capa delgada . Los

Flps se extrajeron del EMEt a través de una variación del método de Folch (122) y las

muestras se aplicaron en las placas de cromatografía. Como se observa en la Figura 6A se identificaron 4 manchas en la fracción lipídica del EMEt con el reactivo Dittmer, que se utiliza para detectar el grupo fósforo de los Flps. También se determinó por densitometría el porcentaje de cada mancha con relación al total de las detectadas y se comparó el valor práctico de Rf de cada mancha con el teórico que poseen algunas especies de fosfolípidos (ver Anexo 3)

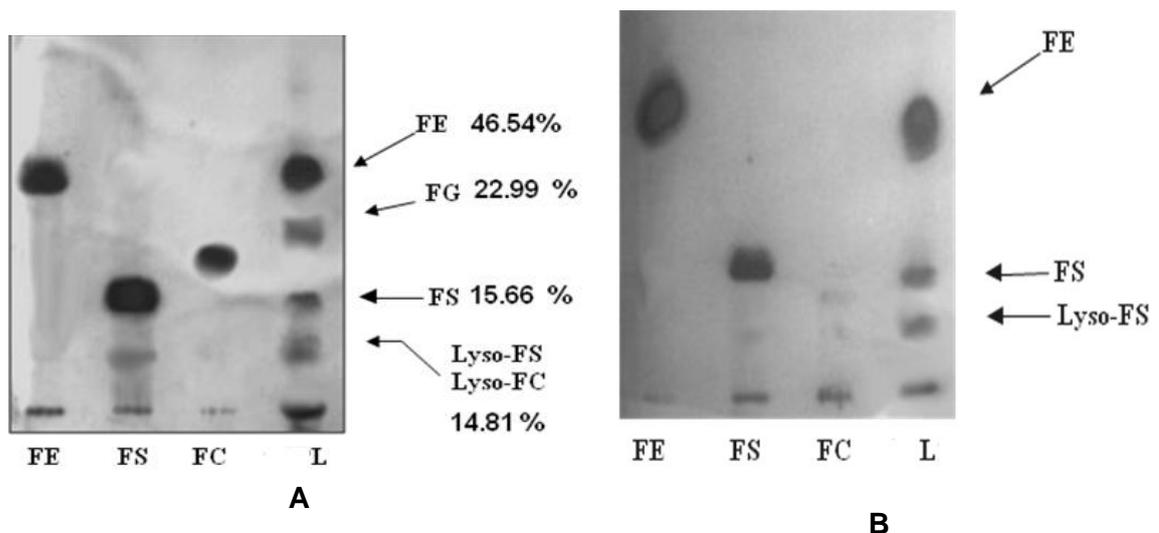


Figura 6. Cromatografía en capa delgada para identificar los fosfolípidos que forman el extracto. En A se observan 4 manchas reveladas con reactivo Dittmer específico para detectar fósforo en lípidos. De acuerdo a la relación entre Rf Práctico:Rf Teórico, las manchas reveladas corresponden con fosfatidil etanolamina (FE=0,78:0,79), fosfatidil glicerol (FG=0,62:0,60), fosfatidil serina (FS=0,36:0,34), y Lyso-FS (0,20:0,18) o Lyso-FC (0,20:0,22). También se observan los por cientos de cada especie analizado por densitometría. En B se realiza la detección de los grupos aminos libres con reactivo de Ninhidrina, no se observa la mancha con Rf en 0,62 y la especie con Rf=0,20 reacciona por lo que es muy probable que ambas manchas correspondan con FG y Lyso-FS respectivamente.

A partir de este análisis (Figura 6A) se determinó que la mancha con un Rf de 0,78 puede corresponder con la FE y la que posee un Rf de 0,36 con la FS, sin embargo la mancha con Rf= 0,20 pudiera ser cualquiera de las dos Liso formas que migran cercanas a este valor: la lyso-FS o la lyso-FC. Cuando se reveló la placa con reactivo Ninhidrina, que es específico para detectar grupos aminos libres, se observó que el grupo correspondiente con Rf de 0,62 no reaccionó, lo que sería característico de una especie sin grupos aminos con Rf cercano al antes expuesto, como el FG (Figura 6B) y

que la lyso forma en 0,2 reacciona por lo que esta mancha puede presentar una especie de fosfolípido que posea un grupo amino libre y ésta pudiera corresponder con la lyso-FS.

IV-1.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Los ensayos que se realizaron para caracterizar la morfología y la forma en que se ensamblan los componentes del extracto comprendieron estudios de microscopía electrónica (barrido y transmisión), ECF y medición del potencial de membrana.

En la microfotografía que se obtuvo por MEB, Figura 7, se observaron estructuras de forma esférica menores de 0,5 μm (500 nm) con una superficie lisa y regular donde no se identifican poros u otros defectos de membrana. En la microfotografía obtenida por MET, Figura 8, se observaron vesículas menores de 200 nm con una membrana semipermeable que no permitió el paso del vanadato (tinción negativa) hacia el interior de las vesículas. En ambas microfotografías también se apreció que las vesículas poseían tamaños heterogéneos.

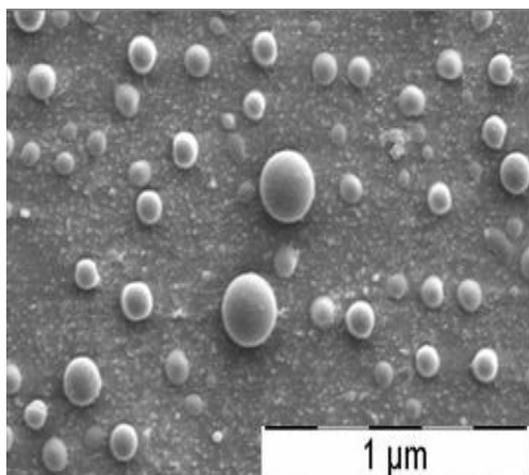


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido (MEB). Se observan nanopartículas esféricas con tallas menores de 0,2 micra

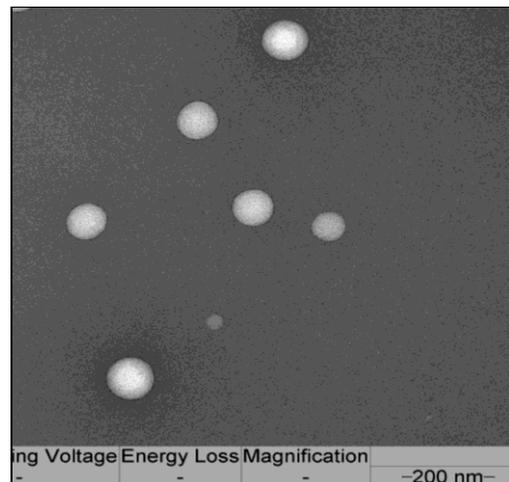


Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión (MET). Se observan vesículas impermeables a la tinción negativa y con tallas menores a 200nm.

El análisis por ECF de tres lotes experimentales demostró, que las vesículas que forman el extracto poseen una talla media de 152,27 nm y una DE de 20,05 nm. También se determinó que la media del índice de polidispersión en estos lotes es de 0,42 que es característico de sistemas nanoparticulados con una distribución de tamaños heterogénea (Tabla 4). Además, se evaluó el potencial de membrana de las vesículas y se determinó que estas tienen carga neta superficial negativa como se muestra en la Tabla 4.

A partir de este momento el EMEt comenzó a nombrarse como proteoliposoma de *V. cholerae* O1 o PLc.

Tabla 4. Determinación del tamaño y potencial Z del PLc

Proteína (mg/mL)	Vol (μL) Tris-NaCL 1mM	Talla (nm)	índice de Polidispersión	Zeta (mV)
0,15	5	152.27 (20,05)	0,42 (0,12)	-28,3 (4,21)

La talla y el índice de polidispersión se expresan como la media de las mediciones obtenidas por ECF en tres lotes experimentales analizados y su DE. El potencial Zeta se determina también en estos lotes a partir de la diferencia de la motilidad de las partículas inducida por diferentes campos eléctricos y se representa como la media de los potenciales y su DE

IV-2 Obtención del AFCo2 a partir del PLc

Para la transformación del PLc en AFCo2 se realizó un proceso de diálisis rotacional continua como muestra la Figura 1. La velocidad con que reaccionan los componentes del PLc y el catión divalente calcio es un punto crítico en la obtención de cocleatos, por lo tanto se evaluó la influencia del EDTA, el calcio y el intervalo de tiempo entre los cambios de formación (Tabla 5), manteniendo invariables otros parámetros importantes como la porosidad de la membrana y la configuración del sistema (velocidad de rotación, volumen de tampón formación, etc.). Las estructuras que se obtuvieron se caracterizaron a través de microscopía óptica, electrónica y fluorescencia.

Tabla 5. Determinación de parámetros que afectan la formación de cocleatos

Procesos	No. de Micro-partículas	% Inc. Proteínas totales	% Inc. Fosfolípidos totales	Observaciones
V1	+/-	42,5 (3,4%)	51,6 (6,2%)	Inc. No óptima (<80%)
V2-Sin EDTA	++	72,3 (5,1%)	78,1 (7,5%)	Mejora Inc.
V3-CaCl ₂ 10 mM	+++	98,3 (1,4%)	97,8 (2,8%)	Inc. Óptima. Agregados
V4-Sin EDTA/2h X cambios+1	+++	95,3 (2,1%)	98,8 (1,5%)	Inc. Óptima. Túbulos

En la tabla se observan los 4 procesos evaluados para determinar las condiciones de obtención de los cocleatos a partir del PLC. Los resultados se obtienen con 3 réplicas para cada proceso y la cantidad de proteínas y Flps que se incorporaron en las estructuras se expresan como la media de los valores en por ciento y su DE o semicuantitativamente de acuerdo al No. de partículas: +/- representa 10-40 micropartículas; ++ representa 40-80 micropartículas; +++ representan más de 100 micropartículas por campo.

IV-2.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN EL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN DEL PLC EN AFCo2

En la Tabla 5 se observan las cuatro variantes que se utilizaron para determinar las mejores condiciones de obtención de los cocleatos. En cada una se observó la formación de micropartículas que formaron una suspensión de color blanquecino como la que se muestra en la Figura 9A. Uno de los principales parámetros que se tuvo en cuenta para la selección de la variante fue la evaluación del porcentaje de incorporación de proteínas y Flps en las estructuras que se forman. Para ello se determinó la relación entre el contenido total de estos componentes en la suspensión, denominado como AFCo2tot (Figura 9A) y la resuspensión del sedimento (AFCo2res) que se forma luego de dejar en reposo la formulación, como lo muestra la Figura 9B. Por otro lado, la inspección visual y óptica fue fundamental para identificar la formación de las estructuras, estimar su tamaño y cantidad.

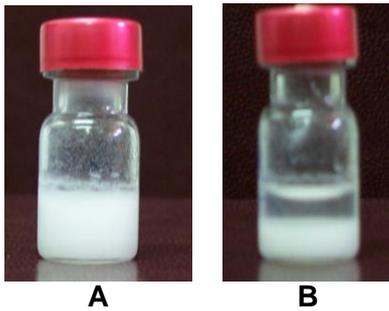
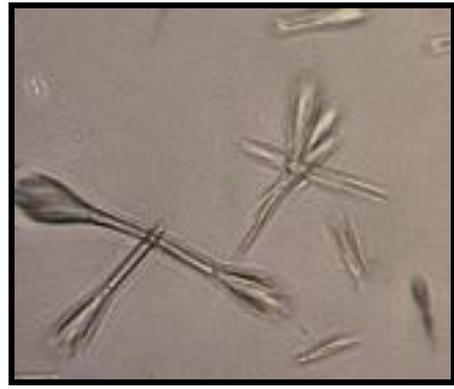


Figura 9. Apariencia de la suspensión obtenida por el proceso de diálisis rotacional continua. Se observa en A la formación de una suspensión blanquecina luego de la interacción del calcio con el PLc. Esta fracción es denominada como **AFCo2tot**. Se observa en B como las partículas sedimentan espontáneamente luego de 1-2h o por centrifugación. Este sedimento es colectado y resuspendido en tampón Tris-Ca para análisis posteriores y es denominado como **AFCo2res**. Las fotografías fueron realizadas a un Lote experimental obtenido con la variante V4.

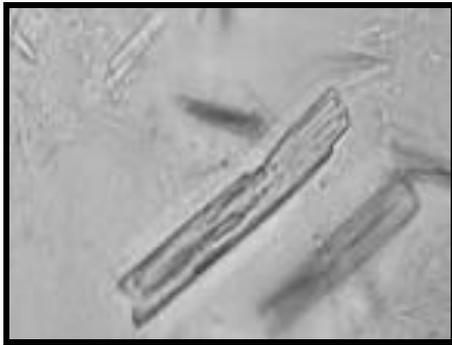
Para la variante 1 (V1) se utilizaron las condiciones (Tabla 5) descritas por Bracho G en 2004 para transformar el AFPL1 en AFCo1 (18). Con estas condiciones se observó que los proteoliposomas se transformaron en estructuras tubulares pero el porcentaje de incorporación de proteínas y Flps fue muy bajo (Tabla 5). En la variante V2 se eliminó el EDTA del TF y como resultado se incrementó el número de estructuras tubulares que se formaron, aunque el porcentaje de incorporación de Flps y proteínas no alcanzó valores óptimos, por encima del 80%. En la variante V3 se eliminó también el EDTA del TF pero además se incrementó la concentración del calcio en el TF. Como resultado se incrementó la incorporación de los componentes proteicos y Flps en las nuevas estructuras (Tabla 5) pero estas tienden a la formación de agregados semejantes a erizos y con extremos abiertos como se muestra en la Figura 10 A y B respectivamente. En la variante V4 se redujo el intervalo entre los lavados de formación a 2 horas y se mantuvo la concentración del calcio en 5mM y sin EDTA en el TF; en estas condiciones se obtuvieron estructuras tubulares (Figura 10C) como las reportadas por Pérez O y colaboradores (9). Adicionalmente, más del 90 % de los componentes fosfolipídicos y proteicos se incorporaron en las estructuras (Tabla 5).



A



B



C

Figura 10. Microscopía óptica de estructuras obtenidas con las diferentes variantes. En A y B se observan estructuras obtenidas con la variante V3 (incremento en la concentración del calcio) donde predominan la formación de agregados con forma de erizos y estructuras tubulares con extremos abiertos respectivamente. En C pueden observarse las estructuras tubulares obtenidas con el tratamiento V4 donde no se utiliza EDTA y se acorta el tiempo entre lavados de formación.

IV-2.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL AFCo2

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la variante V4 se realizaron los estudios morfológicos a las estructuras obtenidas por este procedimiento que comienzan a denominarse en lo adelante como AFCo2. La microscopía óptica (Figura 10) es fundamental para identificar la formación del AFCo2 a partir de los proteoliposomas pero también permite hacer mediciones para determinar su tamaño (longitud). En la Figura 11 se muestra que el tamaño (longitud) de las partículas obtenidas con la variante V4 en tres lotes experimentales tiene un valor medio de 16,25 μm con DE de 4,57 μm . Sin embargo, los cocleatos son estructuras muy complejas que poseen otras características morfológicas, a través de las cuales pueden ser caracterizados.

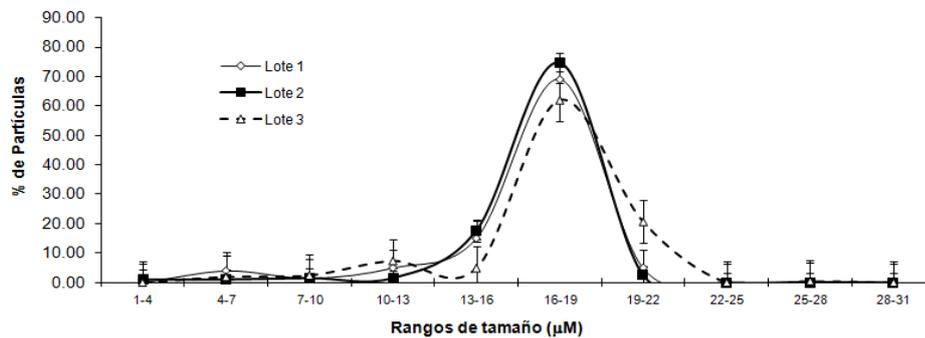


Figura 11. Tamaño de las partículas obtenidas con la variante V4. Se midieron y agruparon por rangos de tamaños 200 partículas en cada uno de los tres lotes evaluados. Las mediciones se realizaron con una escala graduada en el lente ocular del microscopio utilizado. Más del 60 % de las estructuras en los lotes analizados poseen una longitud media de 16,25 µm con DE de 4,57 µm

Los resultados de MEB, Figura 12A y B, muestran que las estructuras están formadas por múltiples láminas y en los bordes de los túbulos se observan aberturas o poros entre las capas que se forman.

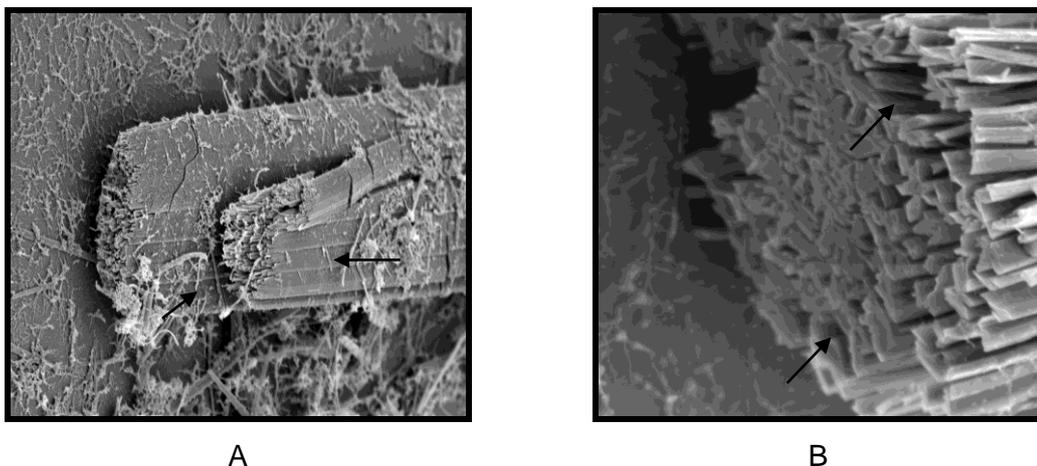


Figura 12. Microscopía electrónica de barrido (MEB). En A se observan las múltiples láminas (flechas) que componen los túbulos obtenidos luego de tratar los proteoliposomas con calcio, según la variante V4. En B pueden observarse aberturas o poros (flechas) entre las capas que forman la estructura.

Los estudios realizados por MECF confirman que las microestructuras obtenidas están formadas por múltiples capas (Figura 13A). En la Figura 13B también puede observarse que las capas se encuentran dispuestas una sobre otra semejante a la formación de un patrón en espiral.

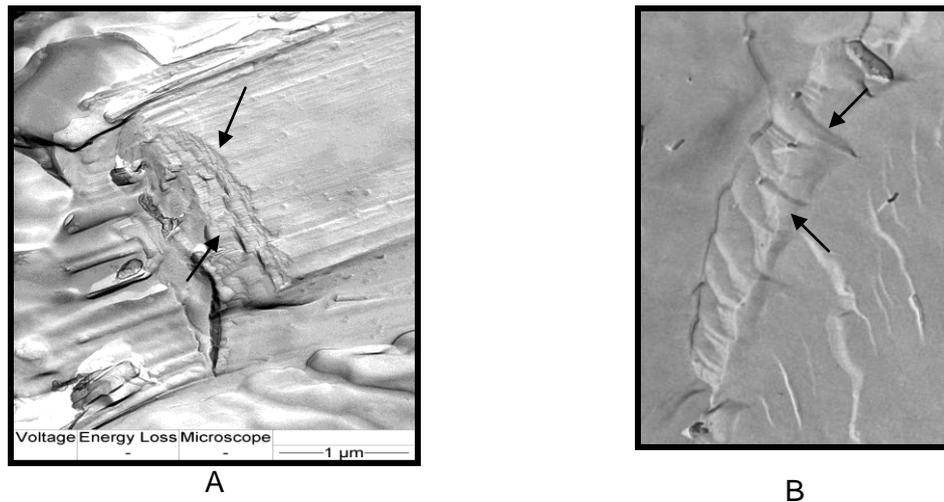


Figura 13. Microscopía electrónica de Congelación y fractura (MEB). En A se observan las diferentes láminas o capas que componen la estructura (flechas) del AFCo2 luego de tratar el PLc con calcio, según la variante V4. En B pueden observarse el patrón en espiral que forman estas láminas (flechas) cuando se superponen una sobre la otra.

IV-2.2.1 PERMEABILIDAD DE LAS ESTRUCTURAS COCLEARES A MOLÉCULAS DE VARIADOS TAMAÑOS.

Cuando se analizó el AFCo2 por MET se observó que la tinción se invirtió con respecto a la realizada al PLc (Figura 8), o sea que las zonas oscuras se encuentran hacia el interior de los cocleatos mientras que el fondo se mantuvo brillante (Figura 14), aunque la tinción (zona oscura) dentro del AFCo2 se distribuyó de manera heterogénea.



Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión (MET). En esta microfotografía se observa el AFCo2 obtenido por la interacción de los proteoliposomas con calcio, según la variante V4. La tinción penetra heterogéneamente en la estructura y el fondo permanece claro.

Para determinar si el AFCo2 era permeable a moléculas de mayor tamaño que el vanadato (tinción), se mezcló con una sonda fluorescente formada por una molécula de

ovoalbúmina conjugada al fluorófono Texas red (Ova-TR). Posteriormente se ultrafiltró por una membrana de 100 000 kDa y el complejo AFCo2+Ova-TR se resuspendió en un volumen adecuado de TF para separar la fracción de la sonda que no se había asociado a su estructura. En la Figura 15A se observa que, al menos, una parte de la sonda se mantuvo asociada al AFCo2. Adicionalmente, la mezcla obtenida de AFCo2+Ova-TR se sonicó y ultrafiltró nuevamente para tratar de separar toda la sonda que pudiera estar asociada a la superficie o incorporada en el AFCo2. En la Figura 15B puede observarse que la sonicación provocó la ruptura del AFCo2, sin embargo no se eliminó la señal de la sonda proveniente del AFCo2, al contrario, la emisión de esta fue más intensa que la observada antes de sonicar el AFCo2. También se analizó el potencial de membrana en los lotes experimentales obtenidos con la variante V4 y este resultó ligeramente negativo con una media de $-7,3$ mV y DE de $2,21$ mV.

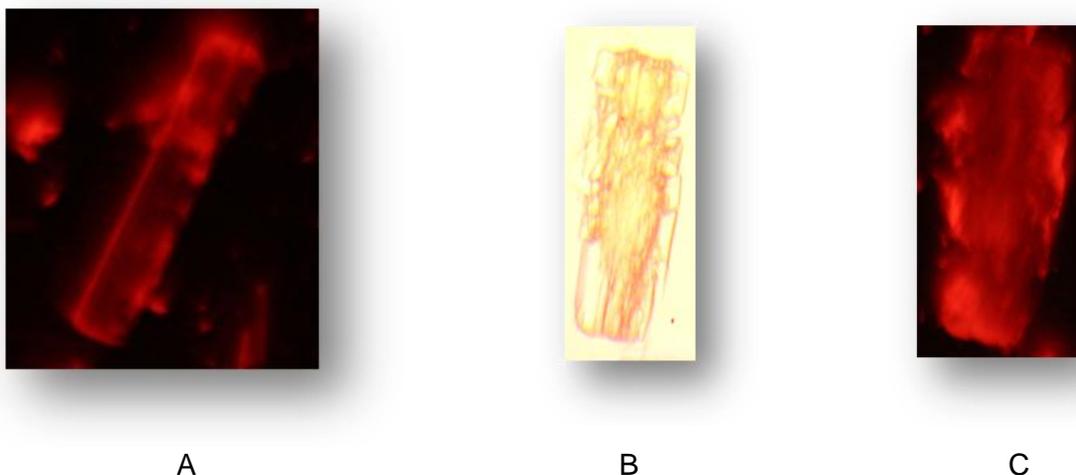


Figura 15. Evaluación de incorporación de la sonda fluorescente Ova-TR en el AFCo2 por microscopía óptica y de fluorescencia. En A se observa la señal fluorescente de la sonda que se asocia al AFCo2 luego de ultrafiltrar (lavar) una mezcla de ambos. En B se observa por microscopía óptica el efecto del tratamiento con sonicación. En C se observa la señal de la Ova-TR asociado al AFCo2 luego del proceso de sonicación/lavado, cuya intensidad es mayor que en A.

IV-3 Efecto de la transformación del PLc a AFCo2 en la identidad e inmunogenicidad de los antígenos de *V. cholerae* O1

Para determinar si los antígenos proteicos se afectaron debido a los cambios estructurales que se producen durante la transformación del PLc en AFCo2, se compararon los perfiles electroforéticos de ambas estructuras. En la Figura 16A pueden observarse los resultados obtenidos con el análisis por SDS-PAGE. El perfil del AFCo2 no se afectó y el análisis densitométrico mostró, que más del 90 % de las bandas del PLc coincidían con las del AFCo2.

Para corroborar estos resultados se realizó una electroforesis bidimensional donde se obtuvieron los perfiles electroforéticos para PLc (Figura 16B) y AFCo2 (Figura 16C) de acuerdo al pI y peso molecular de las proteínas que los componen. De igual forma, el análisis densitométrico demostró un elevado nivel de coincidencias (>80%) entre las bandas de ambos perfiles.

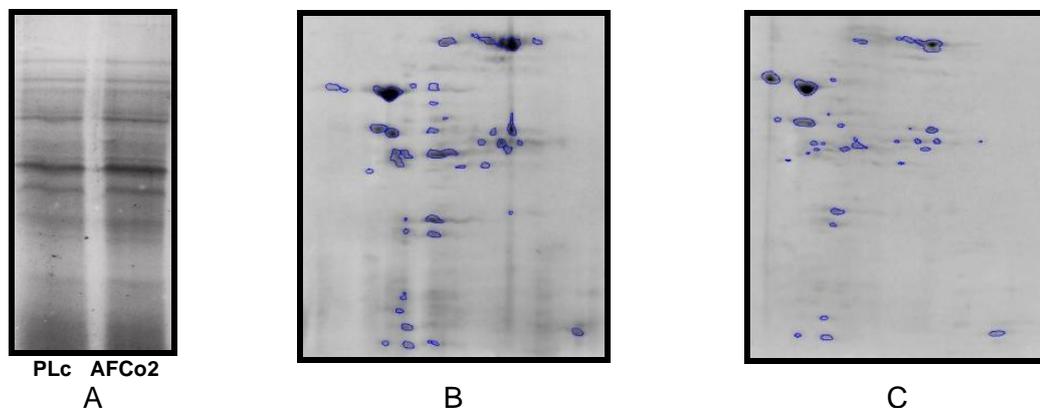


Figura 16. Perfiles electroforéticos de PLc y AFCo2. En A se muestran los perfiles del PLc y AFCo2 obtenidos por SDS-PAGE. En B y C se observan las bandas de PLc y AFCo2 respectivamente que se identificaron a través de electroforesis bidimensional. El análisis densitométrico en ambos sistemas de electroforesis mostró un elevado porcentaje de coincidencias entre las bandas de PLc y AFCo2.

A continuación se utilizó un panel de AcM que reconocen el LPS y las principales proteínas identificadas en el PLc para determinar, por inmunotransferencia, si las propiedades inmunoquímicas de estos antígenos y los epítopes identificados con los AcM, se afectaron durante la obtención del AFCo2. En la Figura 17 se puede observar

que la transformación del PLc (línea 1), en AFCo2 (línea 2), no afectó las propiedades inmunoquímicas de las proteínas o sus epítopes reactivos con los AcM que se utilizaron para identificar MSHA (Panel A), OmpU (Panel B) y el LPS (Panel C) ya que hubo un reconocimiento positivo en cada caso..

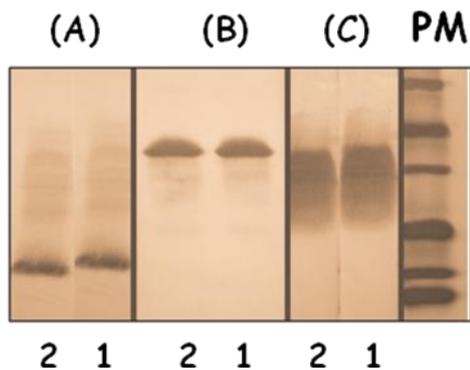


Figura 17. Propiedades inmunoquímicas de antígenos en el PLc y AFCo2. Se realiza un ensayo de inmunotransferencia para comparar el reconocimiento de un panel de anticuerpos monoclonales frente PLc y AFCo2. En A el reconocimiento se realiza con el AcM 2F12F1 (anti MSHA), en B con el AcM 9H12E6 (anti OmpU) y en C con el AcM 2B4G5 (anti LPS Ogawa). La identificación fue positiva en cada caso para el PLc en el carril 1 y el AFCo2 en el carril 2.

La evaluación de las propiedades inmunoquímicas *in vitro* es importante porque permite identificar rápidamente si los antígenos en el PLc se afectan durante su transformación en AFCo2, sin embargo para determinar si estos antígenos son realmente funcionales e inmunogénicos se impone la evaluación *in vivo* de las formulaciones.

IV-3.1 RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA. ACTIVIDAD VIBRIOCIDA Y ANTICUERPOS IGG EN SUERO

Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía intranasal con el PLc, el AFCo2 o el candidato vacunal atenuado 638 utilizando un esquema de dos o tres dosis. A los 14 días posteriores a la última dosis se colectó el suero, se evaluó su actividad vibriocida y la respuesta de anticuerpos IgG específica contra los antígenos presentes en el PLc. En la Tabla 6 se puede observar que no hubo diferencias significativas en la respuesta de IgG inducida ni en la actividad vibriocida (más del 75% de los animales fueron respondedores en este ensayo) del suero entre los grupos inmunizados con PLc y AFCo2 en cualquiera de los dos esquemas utilizados. Las respuestas inducidas por estos grupos tampoco tuvieron diferencias significativas cuando se compararon con la

inducida por el candidato vacunal 638 administrado con el esquema de 2 dosis, porque cuando este se administró con el esquema de tres dosis, indujo una respuesta inmune sistémica significativamente menor a la que se observó en el resto de los grupos.

Tabla 6. Respuesta inmune sistémica inducida por los dos esquemas de inmunización

Grupos	IgG ^a		Actividad Vibriocida ^b	
	Dos dosis	Tres dosis	Dos dosis	Tres dosis
PLc	0,626 (0,047)	0,633 (0,09)	2,054 (0,41)	2,024 (0,29)
AFCo2	0,661 (0,14)	0,571 (0,12)	2,271 (0,33)	2,294 (0,42)
638	0,556 (0,22)	0,125 (0,09)**	2,415 (0,37)	1,512 (0,40)*

Los ratones se inmunizaron por vía IN (10 μ L/fosa nasal) con 100 μ g de AFCo2, 100 μ g PLc o 10^8 UFC del candidato 638. Los datos de tres experimentos independientes (n=5) se analizaron con la prueba de Tukey.

^a Los resultados se expresan como la media de la DO inducida por los sueros (dilución 1/100) evaluados con un ELISA indirecto y la DE en cada grupo.

^b Los resultados se expresan como la media de los \log_{10} del título de anticuerpos vibriocidas en el suero de los animales respondedores y su DE.

* Indica valores significativamente menores que tres dosis de PLc o AFCo2 ($p < 0,05$).

** Indica valores significativamente menores que tres dosis de PLc o AFCo2 ($p < 0,01$).

IV-3.2 RESPUESTA INMUNE MUCOSAL. ANTICUERPOS IGA EN HECES Y SALIVA

La respuesta inmune mucosal se evaluó a través de los anticuerpos IgA específicos inducidos en secreciones contra el PLc. Para ello se, evaluaron muestras de heces y saliva obtenidas de los ratones Balb/c a los 7 días posteriores a la última dosis de los dos esquemas utilizados. En la Figura 18 puede observarse que el grupo inmunizado con tres dosis de AFCo2 indujo mayor respuesta de IgA en saliva (Figura 18A) y en heces (Figura 18B) que el resto de los grupos inmunizados, sólo comparable con la inducida por el grupo inmunizado con el candidato vacunal 638 en el esquema de dos dosis porque este con el esquema de tres dosis induce respuestas significativamente menores que la del resto de los grupos.

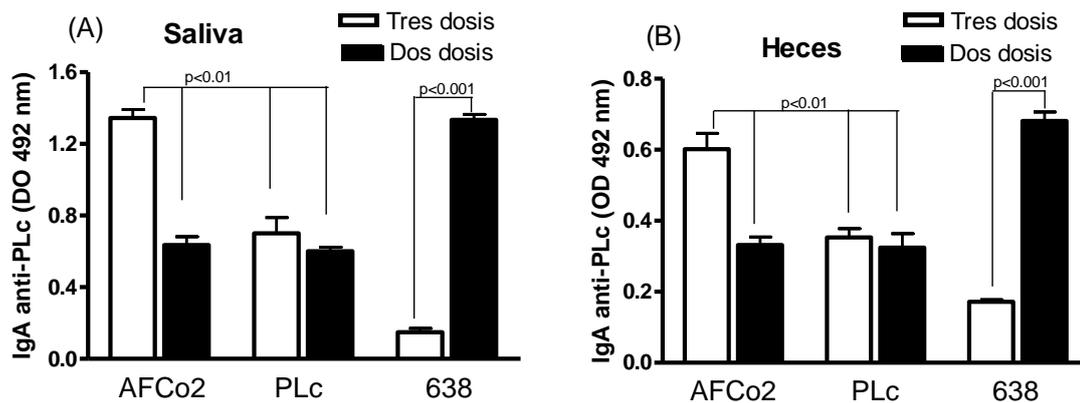


Figura 18. Respuesta de IgA en saliva (A) y heces (B) inducida por la administración IN de AFCo2 y PLc. Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía IN (10 μ L/fosa nasal) utilizando un esquema de dos dosis separadas 28 días (barras negras) o tres dosis separadas 7 días (barras blancas). Se administraron 100 μ g (proteína) de PLc o AFCo2 y 10^8 UFC del candidato 638. Las heces y saliva son colectadas a los 7 días posteriores de la última dosis y los niveles de anticuerpos específicos contra los antígenos presentes en el PLc son evaluados a través de un ELISA indirecto. El efecto del grupo placebo es sustraído del resto de los resultados y se muestran la media y desviaciones estándar de dos mediciones de tres experimentos independientes (n=5 cada uno). Las diferencias entre la medias se evaluaron por la prueba de Tukey para las heces y la prueba de Dunns para la saliva.

IV-4 Efecto adyuvante del AFCo2 sobre el Poli Vi

Para llevar a cabo este experimento se formuló el AFCo2 con el Poli Vi por adición y mezcla (AFCo2 100 μ g+ Poli Vi 25 μ g). Luego se inmunizaron los animales por vía IN con tres dosis espaciadas siete días y quedaron como control del experimento grupos de animales que se inmunizaron con el poli Vi (25 μ g) IN sin adyuvante (AFCo2) y la vacuna vax-TyVi que se administró por vía IM con una sola dosis (5 μ g).

IV-4.1 RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA Y MUCOSAL. ANTICUERPOS IGA E IGG CONTRA POLI VI EN SALIVA, HECES Y SUERO RESPECTIVAMENTE

Como se observa en la Figura 19 el grupo de ratones inmunizados vía IN con el Poli Vi adyuvado con AFCo2 (AFCo2+Poli Vi) indujo mayor respuesta de IgG anti-Poli Vi en suero que el grupo que se inmunizó con el Poli Vi solo (vía IN). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre la respuesta sistémica inducida por el grupo

AFCo2+Poli Vi por vía IN y la vacuna vax-TyVi que fue administrada con una sola dosis por vía IM.

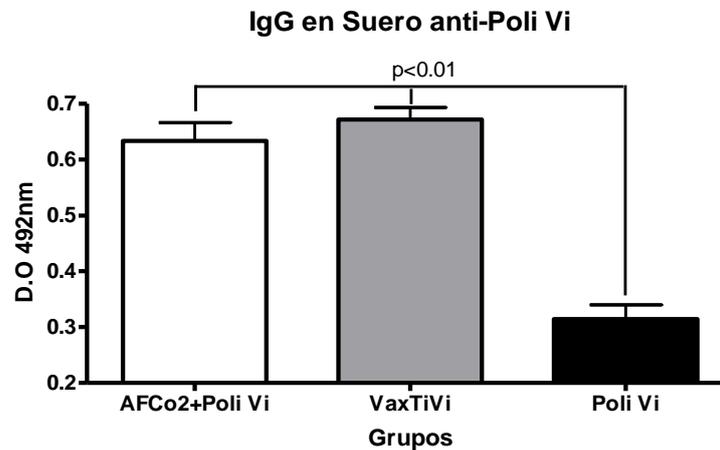


Figura 19. Respuesta de IgG en suero anti-Poli Vi inducida por coadyuvación con AFCo2 o PLc. Se administran 25 μg de Poli Vi solo o adyuvado con 100 μg (proteína) de PLc o AFCo2 por vía IN en ratones Balb/c (10 μL /fosa nasal) con un esquema de tres dosis separadas 7 días. También se administró una dosis IM de la vacuna vax-TyVi (5 μg /100 μL). El suero fue extraído a los 14 días posteriores de la última dosis y los niveles de anticuerpos específicos contra Poli Vi son evaluados a través de un ELISA indirecto. El efecto de los grupos placebos IN e IM es sustraído de los resultados según corresponden por la vía utilizada y se muestran la media y desviaciones estándar de dos mediciones de dos experimentos independientes ($n=5$ cada uno). Las diferencias entre la medias se evaluaron por la prueba de Tukey.

En la Figura 20 se puede observar que la respuesta anti-Poli Vi, en heces y saliva fue significativamente mayor cuando el Poli Vi se adyuvó y coadministró con el AFCo2, mientras que la vacuna vax-TyVi aplicada por vía IM no indujo respuesta a nivel mucosal.

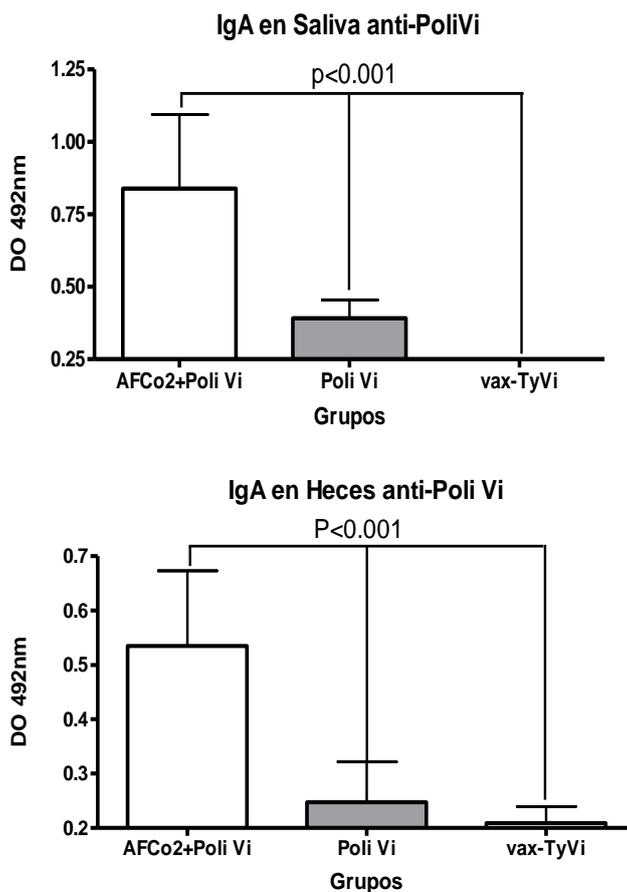


Figura 20. Respuesta de IgA en saliva (A) y heces (B) anti-Poli Vi inducida por coadyuvación con AFCo2. Se administran 25 μg de Poli Vi solo o adyuvado con 100 μg (proteína) de AFCo2 por vía IN en ratones Balb/c (10 μL /fosa nasal) con un esquema de tres dosis separadas 7 días. También se administró una dosis IM de la vacuna vax-TyVi (5 μg /100 μL). Las muestras son extraídas a los 7 días posteriores de la última dosis y los niveles de anticuerpos específicos contra Poli Vi son evaluados a través de un ELISA indirecto. El efecto de los grupos placebos IN e IM es sustraído de los resultados según corresponden por la vía utilizada y se muestran la media y desviaciones estándar de dos mediciones de dos experimentos independientes (n=5 cada uno). Las diferencias entre la medias se evaluaron por la prueba de Tukey y las letras indican diferencias significativas entre los grupos $p < 0,05$

IV-4.2 RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA Y MUCOSAL. ANTICUERPOS IGA E IGG CONTRA PLC EN SALIVA, HECES Y SUERO RESPECTIVAMENTE

En la Tabla 7 se observa el efecto que tiene la adyuvación del Poli Vi, pero en este caso en la respuesta inducida contra los antígenos de *V. cholerae*. De forma general no hubo diferencias significativas entre la respuesta sistémica y mucosal inducida por el AFCo2 en comparación con las inducidas por los grupos en que este se utiliza coadministrado (adyuvando) al Poli Vi.

Tabla 7. Respuesta de anticuerpos anti-PLc inducida por las formulaciones

Grupos	IgG anti-PLc	IgA anti-PLc	
		Saliva	Heces
AFCo2+Poli Vi	0,551 (0,105) ^a	0,641 (0,086) ^a	0,541 (0,064) ^a
AFCo2	0,497 (0,072) ^a	0,623 (0,071) ^a	0,565 (0,044) ^a
Poli Vi	0,221(0,031) ^b	0,271 (0,039) ^c	0,214 (0,019) ^c

Los ratones se inmunizaron con 100 µg de AFCo2 y/o Poli Vi 25 µg por vía IN (10µL/fosa) y un esquema de tres dosis. La saliva, heces y suero se colectaron a los 7 y 14 días posteriores a la última dosis, respectivamente. Se realizaron dos experimentos independientes (n=5 cada grupo).

Los resultados se expresan como la media de la DO inducida por los sueros (dilución 1/100), saliva o heces (dilución 1/2) evaluados con un ELISA indirecto y la DE en cada caso.

^{a,b,c} Las letras indican diferencias significativas entre los diferentes grupos analizados por la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

V. DISCUSIÓN

Las nano y micropartículas son consideradas vehículos apropiados para el diseño de adyuvantes y vacunas (40). En particular los proteoliposomas derivados de bacterias o virus son estructuras muy inmunogénicas, capaces de entregar al sistema inmune señales antigénicas e inmunoestimuladoras, que tienen un efecto adyuvante sobre el antígeno que presentan (43, 129). Sin embargo el “talón de Aquiles” de esta estrategia se encuentra en el tipo de estructura en sí debido a la variedad de componentes que la forman y las diferentes formas en que estos pueden ensamblarse. Tanto las VME (proteoliposomas provenientes de bacterias) como los virosomas (proteoliposomas provenientes de virus), son estructuras muy complejas y su caracterización requiere de la combinación de varias especialidades en el marco de la química, física y biología para estudiar su composición, morfología y función biológica.

El primer objetivo de este trabajo fue determinar los componentes estructurales de un EMEt obtenido por el método de extracción con detergentes (14) y evaluar si estos son capaces de formar una estructura proteoliposómica. Pérez JL y colaboradores 2006 (14) identificaron LPS en la composición del EMEt y la selección del SDS como detergente óptimo para realizar la extracción estuvo muy relacionado con su capacidad para extraer la mayor cantidad de LPS, razón por la cual los autores justificaron que este extracto fue el más inmunogénico comparado con los obtenidos con otros detergentes. El LPS es considerado por varios especialistas como el antígeno más importante de *V. cholerae* ya que induce respuesta inmune protectora tanto en animales como en humanos (130-132). Por esta razón es muy importante determinar qué cantidad de LPS hay en el extracto. Tradicionalmente se ha utilizado el método de determinación Kdo para cuantificar LPS de bacterias Gram negativas (133), pero este no permite cuantificar el LPS de *V. cholerae* ya que es necesario aplicar procesos de

hidrólisis fuerte para poder exponer su molécula de Kdo, que se encuentra fuertemente asociada en la región que enlaza el lípido A con el “núcleo” polisacárido del LPS (134). La relación entre la actividad endotóxica medida por el ensayo del “Limulus Amebocytes Lised” (LAL) y la cantidad de LPS ha sido propuesta como una alternativa para su cuantificación (14); sin embargo este es un ensayo costoso, consume gran tiempo de trabajo y puede subestimar la concentración de LPS en una mezcla compleja como un extracto de membrana o proteoliposomas. En este último el LPS puede estar internalizado en la estructura vesicular o asociado a su membrana donde es menos tóxico que cuando se encuentra en solución, donde el lípido A puede interactuar libremente con el TLR4 y desencadenar reacciones endotóxicas (135).

Para determinar la concentración de LPS se realizó un ensayo de inmunotransferencia con un patrón de LPS de *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa purificado y AcM anti-LPS producidos en el Instituto Finlay (117-120). Los resultados en la Figura 2 y Tabla 3 mostraron que el LPS representa el 30% con respecto a las proteínas totales en el EMEt pero se encuentra distribuido heterogéneamente en las fracciones F1 y F2 que se purificaron a partir de este. Al comparar los resultados con los de Pérez JL y colaboradores (14), se encontró que el LAL podía estar subvalorando, al menos, en un 10 %,el contenido del LPS en el EMEt. Este resultado apoya la hipótesis de que el LPS puede estar asociado a las estructuras que componen el EMEt y por lo tanto inducir menor actividad en el ensayo de LAL. Por otro lado, el ensayo de inmunotransferencia también brinda información sobre las propiedades inmunoquímicas del LPS, es más sencillo y menos costoso; por lo que es recomendable utilizarlo para casos en que sea necesario cuantificar LPS de otros microorganismos y no sea posible utilizar la técnica para detectar Kdo.

Pérez JL y colaboradores también refieren en sus trabajos que el extracto está compuesto por proteínas (14) aunque no se llegó a identificar si alguna de estas

constituía un antígeno importante en la inducción de respuesta inmune contra *V. cholerae* o si el SDS, que fue el detergente utilizado en el proceso de extracción, había afectado sus propiedades inmunoquímicas. Teniendo en cuenta que el EMEt puede ser estudiado a partir de las dos fracciones de partículas que se obtienen por cromatografía de exclusión molecular; fue necesario caracterizarlas independientemente y determinar si su aporte en componentes estructurales e inmunogénicos era importante para pasar a la etapa de obtención de cocleatos.

Se utilizó un panel de AcM, como se muestra en la Figura 4 y se identificaron en el EMEt las proteínas MSHA y OmpU. Esta última es mayoritaria y representa aproximadamente el 30% del total de proteínas en el EMEt (Figura 3B); OmpU ha sido reportada como una de las proteínas de membrana externa más abundantes en la superficie del microorganismo (136). Sperandio y colaboradores reportan que la OmpU media la adherencia a las células epiteliales humanas *in vitro* y que genera anticuerpos en voluntarios infectados experimentalmente con *V. cholerae* O1 (87). Por su parte la MSHA es un antígeno más controversial en cuanto a su papel en la generación de respuesta inmune protectora. Aún así, ha sido establecido que un anti-suero policlonal y AcM anti MSHA protegen a ratones infantiles y previenen la acumulación de fluido en el intestino de conejos, otros estudios genéticos indican que mutantes defectuosos de esta fimbria muestran una reducida colonización en conejos adultos, sugiriendo que la misma juega un papel importante en la colonización (84, 85).

Es importante subrayar que otras proteínas relevantes como el TCP y la toxina de cólera o sus subunidades no se encuentran representadas en el EMEt (Figura 4B), pero tampoco se identificaron en el lisado de la biomasa de la cepa C7258 que se utilizó como materia prima para la obtención del EMEt (Figura 4A). Este resultado era de esperar ya que las cepas de biotipo El Tor, como la C7258, expresan pocas cantidades de TCP y toxina de cólera, que requieren de condiciones especiales de

cultivo, diferentes a las que se utilizaron, para su expresión, (137). En general, se pudo concluir que ni el proceso de extracción ni el detergente utilizado afectaron las propiedades inmunoquímicas de los antígenos en el extracto. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que existan otras proteínas inmunogénicas que no fueron detectadas con el panel de AcM utilizado y pudieran ser identificadas con AcM específicos contra otras proteínas o si se complementan los resultados de la electroforesis 2-D (Figura 3D) con un estudio de proteómica como los que han sido realizados para la caracterización proteica de otros derivados bacterianos (70, 138). También se calculó la relación entre proteínas y Flps totales en el EMEt; esta fue aproximadamente de 2:1 (m/m) aunque la relación puede variar en dependencia de la fracción que se analice porque los Flps y proteínas se distribuyen, al igual que el LPS, heterogéneamente en F1 y F2 (Tabla 3).

Para identificar los Flps que componen el EMEt se realizó un proceso de extracción y posteriormente un análisis por cromatografía en capa delgada. Se encontraron especies de Flps cuyo Rf y reacción con reveladores específicos eran característicos de la FE, FG, FS y Lyzo-FS. Estos resultados se corresponden con los publicados por Saptarshi y colaboradores que encontraron alguna de estas especies (FE y FG) como parte de la composición fosfolipídica de la membrana externa de *V. cholerae* (139), no obstante una caracterización más profunda (67) es recomendable si se desea establecer el lipidoma del EMEt.

Los estudios morfológicos realizados por microscopía electrónica revelaron la existencia de nanopartículas en el EMEt. En las microfotografías obtenidas por MEB se observan partículas esféricas con tamaños heterogéneos y superficie regular (sin poros), mientras que en las obtenidas por MET se pudo corroborar la forma vesicular de las partículas y demostrar que estas poseen una membrana poco permeable a la tinción negativa y bien definida. Por esta razón las nanopartículas que componen el

EMEt se clasificaron como PLc, independientemente de que estas se encuentren distribuidas en la F1 o F2 y posean una distribución de Flps, proteínas y LPS diferente entre sí. Los estudios de ECF muestran que la talla promedio del PLc en las muestras evaluadas es 152,27 (20,05) nm y poseen un índice de polidispersión de 0,42 lo que corrobora que las partículas tienen una distribución de tamaño heterogénea. Estos resultados confirman los obtenidos durante el proceso de purificación, donde se encontraron las dos poblaciones de partículas (F1 y F2) con tamaños cercanos entre sí (Figura 3A).

También se evaluó el potencial zeta del PLc y se encontró que este se encuentra cargado negativamente (-28,3 mv). Varias moléculas pueden aportar estas cargas. La porina OmpU es la proteína más abundante (Figura 3D) y tiene punto isoeléctrico alrededor de 4 (140), por lo que al pH (ligeramente básico) en el que se resuspende el PLc, se encuentra cargada negativamente. De igual forma, el resto de las proteínas en el PLc tienen punto isoeléctrico cercano a 4 por lo que también aportan cargas negativas a la estructura (Figura 3D). Las especies de Flps identificadas como FG, FS y Lyso-FS son Flps negativos que también pueden contribuir a la carga negativa neta superficial en el PLc. En resumen, el EMEt de *V. cholerae* O1 está compuesto por proteoliposomas que contienen diferentes proporciones de Flps, antígenos proteicos y LPS. Si se limita la obtención de cocleatos a una de las fracciones purificadas se podrían perder importantes antígenos y Flps indispensables para que el proceso sea eficiente; por lo tanto se decidió evaluar la obtención de cocleatos a partir de todos los elementos que forman el EMEt o PLc como comenzó a llamarse.

Para la transformación del PLc en cocleatos se utilizó el método de diálisis rotacional continua propuesto y patentado por Pérez O y colaboradores (9). En este, el PLc se resuspendió en un tampón con DOC y se enfrentó a un TF compuesto por calcio (Figura 1). Varios parámetros se estudiaron para establecer las condiciones de

formación de las estructuras cocleares. En primer lugar se reprodujeron las condiciones de trabajo utilizadas por Bracho G. 2004, (18) para obtener estructuras cocleares a partir del proteoliposoma de *N. meningitidis* serogrupo B y que se denominó como variante 1 (V1). Con estas condiciones se obtuvieron pocas estructuras y un porcentaje de incorporación de proteínas y Flps bajo (Tabla 5), lo que indica que no hubo suficiente calcio para formar los cocleatos o que la velocidad de interacción entre el catión y los componentes estructurales del PLc fue muy lenta. Para actuar sobre este último punto, se eliminó el EDTA del TF (V2). El EDTA es un agente quelante del calcio y por lo tanto enlentece su reacción con los componentes del PLc, dentro de la bolsa de diálisis. Con este cambio se obtuvo un mayor número de micropartículas y mejores rendimientos de incorporación de proteínas y Flps (Tabla 5), aunque estos no sobrepasaron el 80% que es considerado un nivel óptimo (18), y por lo tanto se aumentó la concentración del catión calcio (V3). Con este nuevo cambio se incrementó el porcentaje de incorporación, sobrepasando el 80% (Tabla 5), pero el análisis microscópico reveló que durante el proceso (V3) se forman estructuras diferentes a los cocleatos reportados por diferentes autores (9, 18, 79). Las estructuras obtenidas por la variante V3 son agregados tubulares con forma de erizos (Figura 10A) y con prolongaciones tubulares en los extremos (Figura 10B). Es posible que esto ocurriera por que la velocidad de interacción entre el PLc y el calcio se incrementó demasiado, dando paso a la formación de estos agregados.

Se analizó entonces la posibilidad de incrementar el flujo de calcio a través de la membrana sin necesidad de incrementar la concentración del catión y así evitar la formación de agregados: el flujo o velocidad con que el calcio atraviesa la membrana de diálisis puede ser descrita por la ecuación de Fick (x): $J = \frac{1}{A} \frac{dc}{dt}$ donde J representa el flujo y A es el área de la membrana que tiene que atravesar el calcio (dc) en la unidad de tiempo (dt); por lo tanto si se reduce el tiempo entre los cambios de diálisis

(dt) se puede incrementar la velocidad (J) con que el calcio interactúe con el PLc. En resumen, para la variante V4 se redujeron los tiempos entre cambios de diálisis a 2 horas y se adicionó un cambio extra para entregarle más calcio al sistema. Los resultados en la Tabla 5 (V4) muestran que se logró una óptima incorporación de proteínas y Flps. Además no se formaron agregados y las estructuras microtubulares que se observan (Figura 10C) tienen las características morfológicas descritas por Pérez O y colaboradores para cocleatos derivados de bacterias (9). El tamaño/longitud de los microtubos o AFCo2, obtenidos con la variante V4, se determinó a través de una escala graduada en el lente de un microscopio óptico (141). Con una longitud media de 16,25 μm , el AFCo2 es una estructura con un tamaño de partícula casi 100 veces mayor que el PLc y su apariencia en formulación es la de una suspensión blanquecina (Figura 9A) que sedimenta (Figura 9B) luego de permanecer un tiempo en reposo (1-2h) o cuando es centrifugada. Esta propiedad es muy importante ya que nos permitió analizar el material (Flps y proteínas) que queda asociado con el AFCo2 y el que queda libre en el sobrenadante. Sin embargo, fue necesario determinar si los proteoliposomas se ensamblaron formando una estructura coclear pues existen otros tipos de estructuras supramoleculares con forma tubular que no deben ser confundidas con estructuras cocleares (72).

Varios autores (13, 72) han descrito a los cocleatos como estructuras formadas por una única lámina (bicapa) de Flps que se enrolla sobre sí misma y adoptan una formación multilaminar con un patrón en espiral que se asemeja a un caracol (Anexo 1). Diversas técnicas se han empleado para caracterizar este tipo de estructuras pero la microscopía electrónica continúa siendo la más adecuada para ello, principalmente si tenemos en cuenta que las estructuras que queremos caracterizar están compuestas por una mezcla de Flps, LPS y proteínas que pueden generar una organización supramolecular más compleja que las descritas hasta el momento para los cocleatos derivados de Flps comerciales (13, 72, 74). El AFCo2 se evaluó por MEB (Figura 12A)

y se observó que está formado por múltiples láminas dispuestas unas sobre otras, tal y cómo había sido reportado por Pérez O y colaboradores Cuando se refiere a la estructura del AFCo1(17). En la Figura 13A se observa una microfotografía obtenida por MECF que confirma que el AFCo2 está compuesto por múltiples capas y que estas se disponen formando un patrón en espiral, según se observa en la Figura 13B, sin embargo no se pudo identificar si las láminas tienen un origen común o se ensamblan independientemente.

Marone y colaboradores demostraron que la interacción entre diferentes mezclas de Flps con el calcio puede inducir a la formación de cocleatos con el patrón tubular y multilaminar “clásico” pero también se pueden formar partículas multilaminares esféricas y hojas multilaminares planas (77). Estos autores tuvieron resultados similares cuando enfrentaron los Flps a otros cationes como el magnesio y el zinc. Es posible que las interacciones entre el calcio, Flps, LPS y proteínas puedan generar una estructura coclear cuya organización supramolecular sea diferente de las propuestas por otros autores, no obstante este criterio debe ser evaluado a partir de técnicas como la cristalografía de rayos X que ha sido utilizada para el estudio de la estructura interna de los cocleatos (77).

Por otra parte también se realizaron estudios de MET y como se observa en la Figura 14, el vanadato, responsable de la tinción negativa, penetra en la estructura del AFCo2, a diferencia del PLc cuya membrana no es permeable a la tinción (Figura 8). Los cocleatos son considerados como estructuras muy compactas (72) debido a las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas que rigen el plegamiento de sus laminas, sin embargo AFCo2 parece tener poros o aberturas en sus extremos (Figura 12B) que pueden ser responsables de que la tinción penetre en la estructura. La capacidad para acomodar moléculas en su interior puede ser muy importante si se desea utilizar el AFCo2 como un sistema de liberación. Por lo tanto se diseñó un experimento para

determinar si una molécula de mayor tamaño como la ovoalbúmina (acoplada a una sonda fluorescente, Ova-TR) puede penetrar en el AFCo2. Entonces, se mezcló el AFCo2+Ova-TR y se sometió a diferentes procesos de lavados y sonicación para eliminar la mayor cantidad posible de la sonda que no estuviese asociada o encapsulada en el AFCo2. Estos procesos fueron monitoreados por microscopía de epi-fluorescencia. Los resultados mostraron que aun cuando se sonicó la mezcla y ultrafiltró por una membrana permeable solo a la Ova-TR, la señal de la sonda (Figura 15) continuó siendo detectada.

Particularmente, la intensidad de fluorescencia proveniente del interior de una de las estructuras que se rompió bajo el efecto del proceso de sonicación (Figura 15B) fue mayor que la que se observó cuando la estructura no fue sometida a este proceso, indicando que una parte de la sonda puede acomodarse en el interior del AFCo2. Sin embargo, es posible que la sonda se haya adherido a la superficie del AFCo2 aunque este tiene una carga ligeramente negativa que no favorece la interacción con Ova-TR que es una proteína ácida cargada negativamente. De forma general, la Ova-TR se asocia con el AFCo2 y una parte puede estar internalizada en su estructura, lo que incrementa el interés por utilizar el AFCo2 como sistema de liberación de antígenos; indudablemente nuevos estudios deberán ser realizados para determinar el tipo de relación que se establece entre AFCo2+Ova o cualquier otro antígeno.

Un punto extremadamente importante es identificar si la identidad y las propiedades inmunoquímicas de los antígenos en el PLC se afectan durante su transformación en AFCo2. Bracho G. 2004 (18) demostró que el proceso de diálisis rotacional continua no afectó la transformación del AFPL1 en AFCo1, sin embargo las interacciones del calcio con las proteínas, con el detergente en el que se resuspende el PLC y hasta el mismo proceso de resuspensión en sí pudieran afectar los antígenos de *V. cholerae* identificados. Utilizando las técnicas anteriormente descritas para el estudio de los

antígenos (inmunotransferencia, electroforesis, etc.), se comprobó que el reconocimiento antigénico en el PLc y AFCo2 fue igualmente positivo para la OmpU, MSHA y LPS (Figura 17), mientras que el análisis densitométrico de sus perfiles proteicos demostró que no se afectó la estructura de las proteínas, o al menos no las propiedades isoeléctricas y peso molecular de estas (Figura 16) durante el proceso de diálisis rotacional continua.

Luego de determinar que los antígenos identificados en el PLc conservaron sus propiedades inmunoquímicas fue importante determinar si estos eran inmunogénicos. Pérez JL y colaboradores (14) demostraron que los sueros de ratones inmunizados por vía IN con el EMEt tenían actividad vibriocida e inducían la formación de anticuerpos anti-LPS. Partiendo de este resultado se evaluó la respuesta inmune mucosal y sistémica inducida por el AFCo2 administrado por vía IN y se comparó con el PLc y también con un grupo inmunizado con el candidato vacunal atenuado 638. La Tabla 6 muestra que cuando se utilizó el esquema de 2 dosis por vía IN espaciados 28 días (barras negras) no hubo diferencias significativas entre las respuestas sistémicas inducidas en los grupos inmunizados con PLc, AFCo2 o el candidato 638. En este caso se evaluó por ELISA la respuesta de anticuerpos contra los antígenos totales en el PLc y no solo contra el LPS cómo había sido publicado anteriormente por Pérez JL y colaboradores (14).

Tampoco se apreciaron diferencias significativas entre la inducción de IgA en heces y saliva en los grupos inmunizados con AFCo2 y PLc (Figura 18) aunque el grupo inmunizado con el candidato 638 indujo mayor respuesta mucosal con este esquema (barras negras). Ello indica que la inmunogenicidad de los antígenos en el PLc tampoco se afectó durante su transformación en AFCo2. Sin embargo varios autores han propuesto que los esquemas de tres dosis por vía IN son mejores para estimular el sistema inmune mucosal (142, 143). Además Pérez O y colaboradores han demostrado

que los adyuvantes derivados de *N. meningitidis* B (AFPL1 y AFCo1) son más inmunogénicos cuando se utiliza este esquema (9), por lo tanto se evaluaron formulaciones con un esquema de tres dosis espaciadas siete días cada una. Los resultados demuestran que no hubo diferencias significativas entre las respuestas inmune sistémica inducidas por el AFCo2 y PLc con ambos esquemas (Tabla 6). Sin embargo al aplicar tres dosis de las formulaciones, como se observa en la Figura 18 (barras blancas), el AFCo2 induce mayor respuesta de IgA en saliva y heces que el PLc. Esto indica que la transformación del PLc en AFCo2 tiene efecto adyuvante a nivel mucosal, aunque el efecto es dependiente del esquema de inmunización. Por otro lado Bracho G 2004 (18) demostró que la cinética de anticuerpos inducida por proteoliposomas y cocleatos derivados de *N. meningitidis* B era similar, por lo que para encontrar diferencias en la inducción de anticuerpos era necesario analizar su comportamiento en el tiempo y no solo en un momento de este. Además sería necesario evaluar la respuesta de citocinas, quemoquinas y otros mediadores de la inmunidad para concluir si existen o no marcadas diferencias en la inducción de respuesta inmune entre el PLc y el AFCo2

Si tenemos en cuenta que PLc y AFCo2 tienen relativamente la misma composición antigénica e inmunoestimuladora, la principal diferencia en la respuesta inmune inducida pudiera explicarse a partir de los diferentes mecanismos de liberación de ambos sistemas: en primer lugar, partículas con tamaños mayores $5\mu\text{m}$ son mejor retenidas en los sitios de inducción de respuesta inmune mucosal y estimulan respuestas mucosales a nivel local, mientras que partículas menores, como el PLc, pueden escapar a la periferia dirigirse directamente a los ganglios linfáticos periféricos (144, 145), particularmente, Lewis D. ha propuesto que tamaños de partículas de aproximadamente $15\mu\text{m}$ son favorables para inducir respuestas mucosales a través de la administración IN (146). Por otro lado los cocleatos son estructuras que poseen propiedades fusogénicas y debido a su gran tamaño, según Forgerite S y

colaboradores (76), es posible que puedan interactuar y activar varias células dendríticas en un corto lapso de tiempo. Aunque estos autores se refieren a las propiedades estudiadas en cocleatos derivados de Flps comerciales, Bracho G. (18) encuentra resultados similares al estudiar la capacidad adyuvante del AFCo1 derivado de *N. meningitidis* B que lo llevan también a sustentar esta hipótesis. Sin embargo, nuevos experimentos deberán ser diseñados para determinar los mecanismos de adyuvación/liberación de antígenos del AFCo2 y PLc.

Por otro lado, el PLc y el AFCo2 deben tener un importante efecto inmunoestimulador ya que el LPS de *V. cholerae* O1 no es solo el antígeno más abundante en la superficie de la bacteria, sino que también es un importante PAMP que estimula la producción de citocinas y quemoquinas pro-inflamatorias como TNF α , MIP-3 α e IP-10 (147).

Otro resultado que llamó la atención en estos experimentos fue que el candidato atenuado 638 no indujo respuestas inmunes mucosales o sistémicas cuando se aplicó con el esquema de tres dosis. Esto puede deberse a que las dosis repetidas pueden dificultar la colonización y el establecimiento del microorganismo atenuado en las mucosas. Es conocido que las vacunas atenuadas requieren, por lo general, una sola dosis para inducir respuesta inmune protectora y memoria en humanos, mientras que las reinmunizaciones a corto plazo pueden dificultar la colonización del microorganismo y por tanto limitar su potencial vacunal (23). De forma general, es muy importante que AFCo2 y PLc induzcan respuesta sistémica y mucosal contra *V. cholerae*. Por una parte la actividad vibriocida del suero es considerada como un correlato de protección clínica en humanos (148) y por otro lado muchos autores sostienen que la respuesta mucosal es necesaria para eliminar el patógeno (54, 149) e inducir inmunidad de grupo (en inglés "herd immunity") que es un beneficio adicional para los individuos no vacunados que se protegen al eliminar los estados de portador en parte de la población

que si se inmuniza, esto ha sido demostrado en ensayos clínicos realizados con la vacuna oral de cólera inactivada (150).

Finalmente se evaluó si el AFCo2 tenía efecto adyuvante sobre un antígeno de un patógeno entérico no relacionado con *V. cholerae* O1 y para ello se utilizó el Poli Vi purificado de *S. Typhi*. Este polisacárido constituye la materia prima activa de la vacuna cubana vax-TyVi y otras licenciadas en varias partes del mundo contra la fiebre tifoidea; su aplicación por vía parenteral puede inducir más del 70% de protección en los vacunados (1). A pesar de una extensa búsqueda, no se encontraron ejemplos en la literatura de administración del Poli Vi por vía IN, así que el AFCo2 y el Poli Vi se coadministraron por vía IN con un protocolo de tres dosis espaciadas siete días cada una. También se inmunizó un grupo con Poli Vi sin adyuvante con el mismo esquema IN y otro con la vacuna vax-TyVi como control positivo del experimento (127, 151) pero por vía IM y con una sola dosis. Como se observó en los resultados, el AFCo2 tiene efecto adyuvante sobre el Poli Vi e induce una respuesta sistémica de IgG anti-Poli Vi similar a la inducida por vax-TyVi (Figura 19). Sin embargo esta vacuna no induce respuestas de IgA anti-Poli Vi en saliva ni heces, a diferencia de la formulación adyuvada con AFCo2 que si es efectiva a este nivel (Figura 20).

El efecto adyuvante del AFCo2 puede estar muy relacionado con sus características estructurales. Si tenemos en cuenta que el AFCo2 posee poros y/o aberturas que lo hacen permeables a pequeñas y grandes moléculas, es muy probable que un antígeno como el Poli Vi se asocie o incorpore a su estructura durante el proceso de coadministración (adición y mezcla). Entonces, el AFCo2 pudiera facilitar la interacción del Poli Vi con las células presentadoras de antígenos a nivel mucosal. Como se comentó anteriormente, varios autores (9, 18, 72) han propuesto que los cocleatos pueden tener propiedades fusogénicas e interactuar con estas células en los sitios de inducción de respuesta inmune mucosal y entregar las señales antigénicas. El tamaño

y forma de los cocleatos también puede favorecer sus propiedades mucoadherentes ya que partículas de gran tamaño ($>10\mu\text{m}$) son preferentemente retenidas en el tracto respiratorio superior (56). Tampoco se puede descartar el efecto inmunoestimulador del LPS u otras moléculas en el AFCo2 que modulen o activen las células presentadoras de antígenos.

El Poli Vi es un polisacárido de alto peso molecular (152) y ha sido reportado que polímeros y polisacáridos con estas características, como el carbopol y la quitosana, poseen propiedades mucoadhesivas (5, 52) y de alguna forma pudieran favorecer la interacción de la formulación AFCo2+Poli Vi con la mucosa nasal. De hecho, el Poli Vi no parece interferir con la respuesta inmune inducida contra los antígenos de *V. cholerae* en el AFCo2 (Tabla 7) Sin embargo nuevos estudios serán necesarios para determinar las interacciones entre adyuvante-antígeno y los mecanismos de acción que se inducen.

Las respuestas sistémicas de anticuerpos inducidas por las vacunas polisacáridicas contra *S. Typhi* han demostrado ser protectoras en modelos murinos (151) y también en seres humanos (153). Por esta razón sería muy interesante evaluar si los anticuerpos anti-Poli Vi inducidos a nivel sistémico por la formulación de Poli Vi+AFCo2 son realmente protectores. Por otro lado, se desconoce si la respuesta inmune mucosal (IgA) contra el Poli Vi pudiera jugar algún papel en la protección mucosal contra *S. Typhi*. Lo cierto es que el Poli Vi se expresa poco a nivel de la mucosa intestinal y no participa en los procesos de adhesión, invasión (111); sin embargo, una vez que *S. Typhi* atraviesa las mucosas, el Poli Vi comienza a expresarse y es considerado como un factor importante para evadir la respuesta inmune, ya sea por su capacidad de enmascarar físicamente los PAMPs del patógeno o interferir sobre algún mecanismo de inflamación (102). La inmunidad mucosal, mediada por anticuerpos (IgA), previene la colonización e invasión de microorganismos en el epitelio (lumen) pero también

participa en la neutralización de virus, toxinas y antígenos en la zona subepitelial (54), quizás a este nivel pudiera ser efectiva la respuesta de IgA mucosal anti-Poli Vi, facilitando la neutralización y exclusión del patógeno una vez que este atraviesa el epitelio y comienza a encapsularse.

La administración oral ha sido la vía de elección para inducir respuesta inmune contra patógenos entéricos (23) ya que se plantea que la vía IN no induce buenas respuestas mucosales en sitios distales del tracto gastrointestinal y que las encontradas, principalmente de IgA, provienen de la circulación hepatobiliar y trasudación desde la sangre (54). Los resultados de esta tesis no contradicen los de estos autores, ya que identificar la procedencia de la IgA no fue un objetivo de los experimentos realizados, pero sí es evidente la importancia de la vía IN para evaluar adyuvantes y candidatos vacunales contra *V. cholerae* y otros patógenos entéricos como *S. Typhi*. Fries LF y colaboradores también demostraron en ensayos clínicos que la vía IN era efectiva para inducir respuestas inmunes sistémicas y mucosales con un candidato vacunal contra *Shigella* (154). La vía IN evade las difíciles condiciones del tracto gastrointestinal e induce buenas respuestas a nivel sistémico, mientras que la vía oral requiere condiciones especiales de administración como la atenuación del pH gástrico y mayores dosis de antígenos (23, 89). En resumen, la vía IN no debe ser descartada sin antes realizar un análisis práctico de sus beneficios o desventajas en relación con otras vías de aplicación.

La obtención de productos derivados de microorganismos con capacidad adyuvante y vacunal es cada vez mayor, no solo en el caso de *V. cholerae* sino también con otros patógenos como *N. meningitidis*, *Pseudomonas*, etc (21, 43). El principal problema de esta estrategia se encuentra en que las formulaciones son muy complejas y requieren de una profunda caracterización para determinar sus composición, estructura, inmunogenicidad y seguridad; hoy se cuenta con las técnicas y métodos para hacerlo,

por lo que nuevos candidatos serán formulados, teniendo en cuenta las propiedades intrínsecas que poseen estos derivados para entregar señales antigénicas e inmunoestimuladoras al sistema inmune. Ello constituye no solo una estrategia para el desarrollo de vacunas parenterales, como lo ha sido en su mayor aplicación, sino para obtener vacunas mucosales.

VI. CONCLUSIONES

1. Los componentes del extracto de membrana externa de *V. cholerae* O1 forman proteoliposomas. Ello confirma la utilidad de la metodología de extracción desarrollada en el Instituto Finlay para la obtención de nuevos proteoliposomas.
2. Se obtiene una nueva estructura coclear (AFCo2) a partir del proteoliposoma de *V. cholerae* O1. Por lo que se logró extender la metodología, propiedad del Instituto Finlay, a la obtención de nuevos cocleatos con capacidades adyuvantes y vacunales.
3. El AFCo2 administrado por vía intranasal indujo respuesta inmune específica, sistémica y mucosal contra los antígenos que componen el proteoliposoma de *V. cholerae* O1. Se confirma que la transformación del proteoliposoma en AFCo2 no afecta las propiedades inmunogénicas de estos antígenos.
4. El AFCo2 administrado por vía intranasal indujo superior respuesta mucosal que el proteoliposoma. Esto sugiere la posible utilidad práctica del AFCo2 para el diseño de formulaciones mucosales.
5. El AFCo2 administrado por vía intranasal potenció la respuesta inmune sistémica y mucosal contra el polisacárido Vi de *S. Typhi*. Esto constituye una evidencia de la capacidad adyuvante del AFCo2 y sugiere su utilidad para el diseño de formulaciones vacunales de aplicación mucosal contra *S. Typhi*.

VII. RECOMENDACIONES

1. Profundizar en la caracterización de proteínas y fosfolípidos que componen el PLc a través de estudios de proteómica y lipidómica.
2. Evaluar las interacciones que rigen la organización supramolecular del AFCo2 y los mecanismos de adyuvación que ejerce sobre los antígenos adyuvados.
3. Profundizar en la evaluación de la respuesta inmune mucosal y sistémica inducida por el AFCo2 contra los antígenos de *V. cholerae* O1 y el Poli Vi.
4. Evaluar la capacidad adyuvante del AFCo2 contra otros antígenos, particularmente provenientes de patógenos entéricos y explorar otras vías de aplicación mucosal.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. State of the art of new vaccine research and development. 2005 [updated 2010 Septiembre; cited 2010 Enero]; Available from: http://www.who.int/vaccine_research/documents/stateoftheart/en/index.html.
2. Sarno ML, Mattos AP, Lee P. Intranasal vaccines for protection against respiratory and systemic infection. *Vaccines* 2007; 6(3):419-29.
3. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology* 2008; 30(1):23-32.
4. Freytag L C, Clements J D. Mucosal adjuvants. *Vaccines* 2005; 23(15):1804-13.
5. Davis S S. Nasal Vaccines. *Advances Drug Delivery Reviews* 2001; 51:21-42.
6. EMEA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Guideline on Adjuvants in Vaccines. EMEA/CPMP/VEG/17/03/v 5/Consultation 2004.
7. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* 2010; 28S:25-36.
8. Pérez O, Lastre M, Cabrera O, del Campo J, Bracho G, Cuello M, et al. New Vaccines Require Potent Adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scandinavian Journal of Immunology* 2007; 66:271-7.
9. Pérez O, Bracho G, Lastre M, Sierra G, Campa C, Mora N, et al. Método de obtención de estructuras cocleares, composiciones vacunales y adyuvantes basados en estructuras cocleares. Concedida. OCPI23313 (Oficina Cubana de Propiedad Intelectual) 2008.
10. Provenzano D, Kovác P, Wade W. The ABCs(Antibodies,B cells,and carbohydrate epitopes) of Cholera Immunity:Consideration for and Improved Vaccine. *Microb Immunol*2006; 50(12):899-927.
11. Sengupta DK, Sengupta TK, Ghose AC. Antibodies to outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* induce protection by inhibition of intestinal colonization of vibrios. *FEMS Microbiol Immunol* 1992;4(5):261-6.
12. OMS. *Weekly Epidemiological Record*. 2009;50(84):517-32.
13. Papahadjopoulos D, Vail WJ, Jacobson K, Poste G. Cochleate lipid cylinders: Formation of unilamellar lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1975; 394:438-91.
14. Pérez JL, González Y, Año G, Cedré B, Valmaseda T, Álvarez M, et al. Obtaining *Vibrio cholerae* 01 outer membrane extracts with different detergents. *VacciMonitor* 2006; 15(1):1-7.
15. Unger EC, inventor Method for delivering bioactive agents using cochleates. USPTO patent 6,403,056. 2002.
16. Fogerite S, Mannino RJ, inventors; Cochleate delivery vehicles.USPTO patent 5,994,318. 1999.
17. Pérez O, Lastre M, Bracho G, del Campo J, Zayas C, Acevedo R, et al. Natural Neissera derive proteoliposome and cochleate as potent vaccine adjuvants. *PharmacologyOnline* 2006; 3:762-4.
18. Bracho G. Capacidad adyuvante de estructuras supramoleculares derivadas de proteoliposomas de *Neisseria meningitidis* B [Doctorado]. Habana: Universidad de la Habana; 2004.
19. Ritchie JM, Waldor MK. *Vibrio cholerae* interactions with the gastrointestinal tract: lessons from animal studies. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 337:37-59.
20. Silva AJ, Mohan A, Benitez JA. Cholera vaccine candidate 638: intranasal immunogenicity and expression of a foreign antigen from the pulmonary pathogen *Coccidioides immitis*. *Vaccines* 2003; 21:4715-21.
21. Schild S, Nelson EJ, Camilli A. Immunization with *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles Induces Protective Immunity in Mice. *Infect Immun* 2008; 76(10):4554-63.
22. Garmory HS, Brown KA, Titball RW. Salmonella vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiology Reviews* 2002; 26:339-53.

23. Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Lang AB, Viret JF. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine* 2003; 21:678-83.
24. O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Rev* 2003; 2:727-35.
25. Rino Rappuoli. Bridging the knowledge gaps in vaccine design. *Nat Biotechnol* 2007; 25(12):1361-6.
26. Harandi AM, Medaglini D, Shattock RJ. Vaccine adjuvants: A priority for vaccine research. *Vaccine* 2010; 28(12):2363-6.
27. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008; 453:1122-6.
28. Lahiri A, Das P, Chakravorty D. Engagement of TLR signaling as adjuvant: Towards smarter vaccine and beyond *Vaccine* 2008; 26 6777-83.
29. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology* 2009; 21(4):317-37.
30. Tagliabue A, Rappuoli R. Vaccine adjuvants: the dream becomes real. *Hum Vaccin* 2008; 4(5):347-9.
31. Baldrige JR, Yorgensen Y, Ward JR, Ulrich JT. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration. *Vaccine* 2000; 18:2416-25.
32. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, et al. Toll like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001; 31(10):3026-37.
33. Von Hunolstein C, Mariotti S, Teleni R, Alfarone G, Romagnoli G, Orefici G, et al. The adjuvant effect of synthetic oligodeoxynucleotide containing CpG motif converts the anti-*Haemophilus influenzae* type b glycoconjugates into efficient anti-polysaccharide and anti-carrier polyvalent vaccines. *Vaccine* 2001; 19:3058-66.
34. Harandi AM, Holmgren J. CpG DNA as a potent inducer of mucosal immunity: implications for immunoprophylaxis and immunotherapy of mucosal infections. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2004; 5(2):141-5.
35. DeFrancesco L. Dynavax trial halted. *Nat Biotechnol* 2008; 26:484.
36. Waite DC, Jacobson EW, Ennis FA, Edelman R, White B, Kammer R, et al. Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21 *Vaccine* 2001; 19:3957-67.
37. O'Hagan DT, Mackichan ML, Singh M. Recent developments in adjuvants for vaccine against infectious diseases *Biomol Eng* 2001; 18(3):69-85.
38. Murtaugh MP, Foss DL. Inflammatory cytokines and antigens presenting cell activation. *Vet Immunol and Immunopathol* 2002; 87:109-21.
39. Rawat M, Singh D, Saraf S. Lipid Carriers: A versatile delivery vehicle for proteins and peptides. *Yakugaku Zasshi* 2008; 128(2):269-80.
40. Singh M, Chakrapani A, O'Hagan D. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6(5):797-808.
41. Gluck R, Moser C, Metcalfe IC. Influenza virosomes as an efficient system for adjuvanted vaccine delivery. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4(7):1139-45.
42. Sierra G, Campa HC, Varcacel NM, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: Protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 1991; 14(2):195-210.
43. Rodriguez T, Perez O, Menager N, Ugrinovic S, Bracho G, Mastroeni P. Interactions of proteoliposomes from serogroup B *Neisseria meningitidis* with bone marrow-derived dendritic cells and macrophages: adjuvant effects and antigen delivery. *Vaccine* 2005; 23:1312-21.
44. Zhang Q, Finn A. Mucosal immunology of vaccines against pathogenic nasopharyngeal bacteria. *J Clin Pathol* 2004; 57(10):1015-1021.

45. OMS. Weekly Epidemiological Record. 2010;85:117-28.
46. Giudice EL, Campbell JD. Needle-free vaccine delivery. *Adv Drug Deliver Rev* 2006; 58(1):68-89.
47. Kataoka K, Fujihashi K. Dendritic cell targeting DNA based mucosal adjuvants for the development of mucosal vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8(9):1183-93.
48. Fujihashi K, Koga T, Van Ginkel FW, Hagiwara Y, McGhee JR. A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. *Vaccine* 2002; 20:2431-8.
49. Simmons CP, Mastroeni P, Fowler R, Ghaem-maghami M, Lycke N, Pizza M, et al. MHC Class I - Restricted Cytotoxic Lymphocyte Responses Induced by Enterotoxin-Based Mucosal Adjuvants *The Journal of Immunology* 1999; 163:6502-10.
50. Yuki Y, Kiyono H. Mucosal Vaccines: novel advances in technology and delivery. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8(8):1083-97.
51. Davis SS, Illum L. Absorption Enhancers for Nasal Drug Delivery. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42(13):1107-28.
52. Leuben HL, Lehr CM, Rentel CO, Noach ABJ, de Boer AG, Verhoef JC, et al. Bioadhesive polymers for the peroral delivery of peptide drugs. *J Control Release* 1994; 29:329-38.
53. Eriksson K, Holmgren J. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:666-72.
54. Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces *Vaccine* 2007; 25:5467-84.
55. Chadwick S, Kriegel C, Amiji M. Delivery strategies to enhance mucosal vaccination. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9(4): 427-40.
56. Yang W, Peters JI, Williams RO. Inhaled nanoparticles-A current review. *Int J Pharm* 2008; 356:239-47.
57. Del Campo J, Lindqvist M, Cuello M, Cabrera O, Persson J, Perez O, et al. Intranasal immunization with a proteoliposome-derived cochleate containing recombinant gD protein confers protective immunity against genital herpes in mice. *Vaccine* 2010; 28(5):1193-200.
58. Del Campo J, Zayas C, Romeu B, Acevedo R, González E, Bracho G, et al. Mucosal immunization using proteoliposome and cochleate structures from *Neisseria meningitidis* serogroup B induce mucosal and systemic responses. *Methods* 2009; 49:301-8.
59. Haneberg B, Dalseg R, Wedege E, Hoiby A, Haugen IL, Oftung F, et al. Intranasal administration of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces persistent local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans. *Infect Immun* 1998; 66(4):1334-41.
60. Racker E. Reconstitution of cytochrome oxidase vesicles and conferral of sensitivity to energy transfer inhibitors. *J Membr Biol* 1972; 10:221-35.
61. Gregoriadis G, editor. *Liposome Technology: Interactions of Liposomes with the Biological Milieu*. Third Edition ed 2007.
62. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & Dev* 2005; 19:2645-55.
63. Huergo CC, Sierra VG, Gutiérrez MM, Biset G, García LG, Puentes G, et al., inventors; Method of producing *Neisseria meningitidis* B vaccine, and vaccine produced by method. United State Patent Office. patent 5,597,572. 1997.
64. Lowell GH, Ripley BW, Smith LF, Wirtz RA, Zollinger WD, Hockmeyer WT. Proteosome-lipopeptide vaccines: Enhancement of immunogenicity for malaria CS peptides. *Science* 1988; 240:800-2.
65. Oster P, Lennon D, O'Hallahan J, Mulholland K, Reid S, Martin D. MeNZBTM: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine* 2005; 23:2191-6.

66. Martínez I. Aportes de la metodología analítica para el control de la calidad de los antígenos de la vacuna VA-MENGOC BCTM y de una nueva vacuna antitifoídica [Doctorado]: Universidad de la Habana; 2002.
67. Cui Z, Thomas MJ. Phospholipid profiling by tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2009; 877:2709-15.
68. Xu G, Waki H, Kon K, S. A. Thin-Layer Chromatography of Phospholipids and Their Lyso Forms: Application to Determination of Extracts from Rat Hippocampal CA1 Region. *Microchemical Journal* 1996; 53:29-33
69. Arigita C, Jiskoot W, Westdijk J, Ingen CV, Hennink WE, Crommelin DJA, et al. Stability of mono- and trivalent meningococcal outer membrane vesicle vaccines. *Vaccine* 2004; 22:629-42.
70. Uli L, Castellanos-Serra L, Betancourt L, Domínguez F, Barberá R, Sotolongo F, et al. Outer membrane vesicles of the VA-MENGOC-BC vaccine against serogroup B of *Neisseria meningitidis*: Analysis of protein components by two-dimensional gel Electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2006; 6:3389-99.
71. Papahadjopoulos D, Poste G, Schaeffer BE, Vail WJ. Membrane fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1974; 352(1):10-28.
72. Zarif L. Elongated supramolecular assemblies in drug delivery *Journal of Controlled Release* 2002; 81:7-23.
73. Coorsen JR, Rand P. Structural effects of neutral lipids on cation- induced interactions of Phosphatidylserine-containing bilayers. *Biophysical Journal* 1995; 68:1009-18.
74. Papahadjopoulos D, Vail WJ, Newton C, Nir S, Jacobson K, Poste G, et al. Studies on membrane fusion. The role of calcium induced phase changes. *Biochim Biophys Acta* 1977; 465:579-98.
75. Ramani K, Balasubramanian S. Fluorescence properties of Laurdan in Cochleate phases. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1618(1):67-78.
76. Fogerite S, Kheiri MT, Zhang F, Wang Z, Scolpino AJ, Feketeova E, et al. Targeting immune response induction with cochleate and liposome based vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 32:273-87.
77. Marone PA, Elsmore SK, Sandulow J, Mannino RJ. Structural Determinants of Divalent Cation-Induced Phosphatidylserine Cochleate Crystallization. *Microsc Microanal* 2005; 11(Suppl 2):1244-5.
78. Pérez O, Bracho G, Lastre M, Mora N, del Campo J, Gil D, et al. Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern. *Immunol Cell Biol* 2004; 82(6):603-10.
79. Bracho G, Zayas C, Wang L, Coppel R, Perez O, Petrovsky N. AFCo1, a meningococcal B derived cochleate adjuvant, strongly enhances antibody and T-cell immunity against Plasmodium falciparum merozoite surface protein 4 and 5. *Malaria J* 2009; 28(35).
80. BDSI. BioDelivery Sciences International 2010 [updated 2010 septiembre; cited 2010 Septiembre 28]; Available from: <http://www.bdsi.com/pipeline.php>.
81. Delmas G, Park S, Chen ZW, Tan F, Kashiwazaki R, Zarif L, et al. Efficacy of orally delivered cochleates containing amphotericin B in a murine model of Aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46(8):2704-7.
82. Lee SH HD, Waldor MK, Camilli A. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell* 1999; 99(6):625-34.
83. Faruque S M., Asadulghani M , Rahman M , Waldor M K, A. SD. Toxin Sunlight-Induced Propagation of the Lysogenic Phage Encoding Cholera. *Infect and Immun* 2000; 68:4795 - 801.
84. Osek J, Jonson G, Svennerholm A M, Holmgren J. Role of antibodies against biotype-specific *V. cholerae* pili in protection against experimental classical and El Tor cholera. *Infect Immun* 1994; 62:2901-7.

85. Osek J, Svennerholm A M, Holmgren J. Protection against *V.cholerae* El Tor infection by specific antibodies against mannose binding hemagglutinin pili. *Infect Immun* 1992; 60:4961-4.
86. Lang HA, Palva ET. The *ompS* gene of *V. cholerae* encodes a growth-phase-dependent maltoporin. *Mol Microbiol* 1993; 10:891-901.
87. Sperandio V, Girón JA, Silveira WD, Kaper JB. The ompU Outer Membrane Protein, a Potential Adherence Factor of *V. Cholerae*. *Infect Immun* 1995; 63:433-8.
88. Bollinger RR, Everett ML, Palestrant D, Love SD, Lin SS, Parker W. Human immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology*2003; 109.
89. Brandtzaeg P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *2003*2003; 293(1):3-15.
90. Qadri F, Ryan ET, Faruque AS, Ahmed F, Khan AI, Islam MM, et al. Antigen-specific immunoglobulin A antibodies secreted from circulating B cells are an effective marker for recent local immune responses in patients with cholera: comparison to antibody-secreting cell responses and other immunological markers. *Infect Immun*2003 Aug;71(8):4808-14.
91. Qadri F, Ahmed F, Karim MM, Wenneras C, Begum YA, Abdus SM, et al. Lipopolysaccharide and cholera toxin-especific subclass distribution of cell responses in cholera. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:812-8.
92. Gupta RK, Taylor D.N., Bryla D.A., Robbins R.B., S.C. S. Phase 1 evaluation of *Vibrio colerae* O1,serotype Inaba, polysaccharide-cholera toxin conjugatedin adult volunteers. *InfectImmun*1998;66:3095-9.
93. Debasish S, LaRocque R C. , Khan A , Jason B. Harris, Begum Ara, Akramuzzaman S M, et al. Incomplete Correlation of Serum Vibriocidal Antibody Titer with Protection from *Vibrio cholerae* Infection in Urban Bangladesh. *JID •BRIEF REPORT*2004:189.
94. Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Khan MR, Stanton BF, et al. Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh. *Lancet* 1986; 2:124-7.
95. Garcia L, Diaz M, Garcia H, Boris L, Fernández R, Año G, et al. The Vaccine Candidate *Vibrio cholerae* 638 Is Protective against Cholera in Healthy Volunteers. *Infect Immu* 2005; 73(5):3018-24.
96. Cohen MB, Giannella RA, Bean J, Taylor DN, Parker S, Hoepfer A, et al. Randomized, controlled human challenge study of safety, immunogenicity, and protective efficacy of a single dose of Peru´-15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infect Immun* 2002; 70:1965-70.
97. Garrity G.M. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed ed. Springer, editor2005.
98. Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., al e. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*2000;38 2465-7.
99. Santos RL, Zhang S, Tsois RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis vs. typhoid fever. *Mircrob Infect* 2001; 3:1335-44.
100. Garmory H S, Brown K, W TR. *Salmonella* vaccines for use in humans:present and future perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*2002;26:339-53.
101. Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*2001;2:361-7.
102. Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tukel C, Akcelik M, Baumler AJ. Capsule-Mediated Immune Evasion: a New Hypothesis Explaining Aspects of Typhoid Fever Pathogenesis. *Infect Immu* 2006; 74(1):19-27.
103. Hersh D., Monack D.M., Smith M.R, Ghori N., Falkow S., A. Z. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(2396-2401).
104. Winter S.E., Raffatellu M., Wilson R.P., Russmann H., A.J. B. The *Salmonella* enterica serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. *Cell Microbiol*2008;10:247-61.

105. Fierer J. Polymorphonuclear leukocytes and innate immunity to Salmonella infections in mice. *Microbes Infect* 2001;3:1233-7.
106. Monack DM, Detweiler CS, Falkow S. Salmonella pathogenicity island 2-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine protease caspase-1. *Cell Microbiol* 2001; 3:825-37.
107. Hapfelmeier SB, Stecher M, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M, et al. The Salmonella pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow Salmonella serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 2005; 174:1675-85.
108. Singh S.P., Williams Y.U., Benjamin W.H., Klebba P.E., D. B. Immunoprotection by monoclonal antibodies porins and lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog* 1996;21:249-63.
109. Tukel C., Raffatellu M., Chessa D., Wilson R.P., Akcelik M., A.J. B. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? . *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;46::320-9.
110. Linehan S.A., D.W. H. The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host - what can it teach us about innate immunity? *Immunol Lett* 2003;85:183-92.
111. Mastroeni P, Menager N. Development of acquired immunity to Salmonella. *Journal of Medical Microbiology* 2003; 52:453-9.
112. Guzman CA, Borsutzky S, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Pearman J, Collioud A, et al. Vaccines against typhoid fever. *Vaccine* 2006; 24:3804-11.
113. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-70.
114. Laemmli NK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 27:680-5.
115. Burnette WN. Western Blotting electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel to a modified nitrocelulose and radiographic detection with antibodies and radiodinated protein A. *Anal Biochem* 1980; 112:192-200.
116. Año G, García H, Balmaceda T, Cedre B, Pino Y, Ancheta O, et al. Antigenicidad e inmunogenicidad de una cepa de *Vibrio cholerae* inactivada. *Bioteología Aplicada* 2003; 20(1):9-13.
117. Falero G, Rodríguez BL, Rodríguez I, Campos J, Ledon T, Valle E, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to El Tor toxin coregulated pilus of *Vibrio cholerae*. *Hybridoma Hybridomics* 2003; 22(5):315-20.
118. Falero G, Rodriguez BL, Valmaseda T, Perez ME, Perez JL, Fando R, et al. Production and characterization of a monoclonal antibody against mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae*. *Hybridoma* 1998; 17(1):63-7.
119. Benitez JA, Silva AJ, Rodriguez BL, Fando R, Campos J, Robert A, et al. Genetic manipulation of *V. cholerae* for vaccine development: Construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. *Arch Med Res* 1996; 27:275-83.
120. Falero G, Rodríguez I, Susarte E, Otero O, Fando R, Nuñez N, et al. Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la proteína de membrana externa U (OmpU) de *Vibrio cholerae*. *Revista CNIC de Ciencias Biológicas* 2007; 13(3):15-9.
121. Fiske CN, Subbarow Y. Colorimetric determination of phosphorous. *J Biol Chem* 1925; 66(2):375-400.
122. Rahman MM, Kolli VSK, Kahler CM, Shih G, Stephens DS, Carlson RW. The membrane phospholipids of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* as characterized by fast atom bombardment mass spectrometry. . *Microbiology* 2000; 146:1901-11.
123. Alvarez N, Borreo R, García MA, Martínez I, Acosta M, Padrón MA, et al. Obtención y caracterización parcial de un extracto lipídico de la membrana externa de *Mycobacterium smegmatis*. *VacciMonitor* 2009; 18(1):15-9.

124. Blank ML, Fitzgerald RV, Snyder F. Novel Quantitative Method for Determination of Molecular-Species of Phospholipids and Diglycerides. *Journal of Chromatography* 1984; 298:473-82.
125. Xiaozhong Qu WW, Gray AI, Tetley L, Uchegbu IF. Self-Assembly of Cetyl Linear Polyethylenimine To Give Micelles, Vesicles, and Dense Nanoparticles *Macromolecules* 2004; 37(24):9114-22.
126. EEC Council Directive 86/609. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 1987.
127. Ramirez JC, Serrano B, Lara M, Farinas M, Mirabal M, Sifontes S, et al. Estudio de inmunogenicidad de la vacuna antitifoídica cubana de polisacarido Vi vax-TyVi en ratones. *VacciMonitor* 2006; 15(2):1-4.
128. Cedré B, Viel Y, Rodríguez T, Delgado I, García L. Validación del ensayo vibriocida colorimétrico para determinar anticuerpos séricos contra cepas candidatas vacunales de *V. cholerae*. *Vaccimonitor* 2003;12(1).
129. Zurbruggen R, Novak-Hofer I, Seelig A, Gluck R. IRIV-adjuvanted hepatitis A vaccine: in vivo absorption and biophysical characterization. *Progress in Lipid Research* 2000; 39:3-18.
130. Apter FM, Michetti P, Winner LS, Mack JA, Mekalanos JJ, Neutra MR. Analysis of the roles of antilipopolsaccharide and anti-cholera toxin immunoglobulin A (IgA) antibodies in protection against *V.cholerae* and Cholera toxin by use of monoclonal IgA antibodies in vivo. *Infect Immun* 1993; 61:5279-85.
131. Chatterjee SN, Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*: III Biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1762:1-16.
132. Gupta RK, Szu SC, Finkelstein RA, Robbins JB. Synthesis, characterization and some immunological properties of conjugates composed of the detoxified lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba bound to cholera toxin. *Infect Immun* 1992; 60:3201-8.
133. Karhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram negative bacteria. *Anal Biochem* 1978; 85:595-601.
134. Chatterjee SN, Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae* I. Physical and chemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1639:65-79.
135. Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Van der Maer WM. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol* 2002; 23:135-39.
136. Nakasone N, Iwanaga M. Characterization of membrane protein *ompU* of *V. Cholerae* O1. *Infect Immun* 1998; 66:4726-8.
137. Voss E, Attridge SR. *In vitro* production of toxin-coregulated pili by *Vibrio cholerae* El Tor. *Microb Pathog* 1993; 15:255-68.
138. Roberts R, Moreno G, Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, Graieb A, et al. Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine* 2008; 26:4639-46.
139. Saptarshi P, Chaudhuria K, Chatterjee AN, Das J. Presence of exposed phospholipids in the outer membrane of *Vibrio cholerae*. *Journal of General Microbiology* 1992; 138:755-61.
140. Chakrabarti SR, Chaudhuri K, Sen K, Das J. Porins of *Vibrio cholerae*: Purification and Characterization of *OmpU*. *Journal of Bacteriology* 1996; 178(2):524-30.
141. Gil D, Bracho G, Zayas C, del Campo J, Acevedo R, Toledo A, et al. Strategy for determination of an efficient cochleate particle size. *Vaccine* 2006; 12(24).
142. Baumann U, Göcke K, Gewecke B, Freihorst J, Von Specht BU. Assessment of pulmonary antibodies with induced sputum and bronchoalveolar lavage induced by nasal vaccination against *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical phase I/II study. *Respir Res* 2007; 8(1).
143. O'Hagan DT. *Vaccine Adjuvants. Preparation Methods and Research Protocols*: Humana Press, Inc, Totowa, NJ; 2000.
144. Espuelas S, Irache JM, Gamazo C. Synthetic particulate antigen delivery systems for vaccination. *Inmunología* 2005; 24(2):208-23.

145. Matsunaga Y, Wakatsuki Y, Tabata Y, Kawasaki H, Usui T, Yoshida M, et al. Oral immunization with size-purified microsphere beads as a vehicle selectively induces systemic tolerance and sensitization. *Vaccine* 2000; 19(4-5):579-88.
146. Lewis D. Mucosal Adjuvants. UK: St George's Vaccine Institute; 2008; Available from: www.who.int/vaccine_research/about/gvrf/Lewis.pdf
147. Zughayer SM, Zimmer SM, Datta A, Carlson RW, Stephens DS. Differential Induction of the Toll-Like Receptor 4-MyD88 Dependent and Independent Signaling Pathways by Endotoxins. *Infect Immun* 2005; 73(5):2940-50.
148. Mosley WH, McCormack WM, Ahmed A, Chowdhury AKM, Barui RK. Report of the 1966-67 cholera vaccine field trial in rural East Pakistan: 2. Results of the serological surveys in the study population-The relationship of case rate to antibody titre and an estimate of the inapparent infection rate with *Vibrio cholerae*. *Bull World Health Organ* 1969; 40(187-197).
149. Qadri F, Ryan ET, Faruque ASG, Ahmed F, Khan AI, Islam MM, et al. Antigen-Specific Immunoglobulin A Antibodies Secreted from Circulating B Cells Are an Effective Marker for Recent Local Immune Responses in Patients with Cholera: Comparison to Antibody-Secreting Cell Responses and Other Immunological Markers. *Infect Immun* 2003; 71(8):4808-14.
150. Ali M, Emch M, Von Seidlein L, Yunus M, Sack DA, Rao M. Herd immunity conferred by killed oral cholera vaccines in Bangladesh: a reanalysis. *Lancet* 2005; 366:44-9.
151. Cuello M, Riveron L, Cabrera O, Oramas J, Miranda A, Fariñas M, et al. Inmunogenicidad y Protección inducida en ratones por polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. *Acta Farm Bonaerense* 2001; 20(3):221-4.
152. Martínez I, Muñoz Y, Riverón L, Duarte M, Jones C, Lemercinier X, et al. Caracterización físico-química del polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. *VacciMonitor* 1999; 8(5):6-12.
153. Keddy KH, Klugman KP, Hansford CF, Blondeau C, Bouveret le Cam NN. Persistence of antibodies to the *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine in South African school children ten years after immunization *Vaccine* 1999; 17(2):110-30.
154. Fries LF, Montemarano AD, Mallett CP, Taylor DN, Hale TL, Lowell GH. Safety and immunogenicity of a proteosome-*Shigella Flexneri* 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults. *Infect Immun* 2001; 69(7):4545-53.

IX. AUTOBIBLIOGRAFÍA

Artículos que avalan los resultados y el tema de tesis:

1. Pérez JL, **Acevedo R**, Fernández Y, et al. A proteoliposome based formulation administered by the nasal route produces vibriocidal antibodies against El Tor Ogawa *Vibrio cholerae* O1 in balb/c mice. *Vaccine* 27:205–212, 2009.
2. Mann JFS, **Acevedo R**, del Campo J, Pérez O, and Ferro VA. Mucosal vaccine strategies for overcoming oral tolerance. *Expert Rev Vaccines* 8(1):103-12, 2009.
3. **Acevedo R**, Callicó A, del Campo J, González E, Cedré B, González L, Romeu B, Zayas C, Lastre M, Fernández S, Oliva R, García L, Pérez JL, Pérez O. Intranasal administration of proteoliposome-derived cochleates from *Vibrio cholerae* O1 induce mucosal and systemic immune responses in mice. *Methods* 49 (2009) 309–315
4. Pérez O, Bracho G, Lastre M, González D, del Campo J, Zayas C, **Acevedo R**, Barberá R, Sierra G, Labrada A, Campa C. Proteoliposome nanoparticle for vaccine adjuvants. Chapter 10, in *Bionanotechnology: Global Prospective*. Ed. Reisner DE. Editorial CRC Press, Taylor and Francis Group. Pag. 123-130, 2008.
5. Pérez JL, Fernández Y, Aranguren Y, **Acevedo R**, Pérez O, García L. Cuantificación de Lipopolisacárido en un Proteoliposoma obtenido a partir de la superficie externa de *Vibrio cholerae* O1 *VacciMonitor* 1:17-22, 2007.
6. Acevedo R, Pérez O, Zayas C, Pérez JL, Mullen A, Mckee D, Ferro V. Structural characterization of proteoliposome-derived cochleate delivery vehicles from *Vibrio cholerae* O1. BBA 2010, Enviada

Otros artículos relacionados con el tema:

1. Pérez O, Bracho G, Lastre M, Mora N, del Campo J, Gil D, Zayas C, **Acevedo R**, Gonzalez D, Lopez JA, Taboada C, Solis RL. Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82(6):603-10
2. del Campo J, Lastre M, Bracho G, Rodríguez T, Gi DI, Zayas C, Taboada C, **Acevedo R**, and Pérez O. Immunological evaluation of bacterial derived Cochleate and Proteoliposome as mucosal adjuvants *Vaccine*. 2006; 12;24 Suppl 2:S2-50-1

3. Bracho G, Lastre M, del Campo J, Zayas C, Gonzalez D, Gil D, **Acevedo R**, Taboada C, Solis RL, Pérez O. Proteoliposome derived cochleate as novel adjuvant. *Vaccine*. 2006 Apr 12;24 Suppl 2:S2-30-1
4. Pérez O, Bracho G, Lastre M, Zayas C, Gonzalez D, Gil D, del Campo J, **Acevedo R**, Taboada C, Rodríguez T, Fajardo ME, Sierra G, Campa C, Mora N, Barbera R, Solis RL. Proteliposome-derived Cochleate as an immunomodulator for nasal vaccine. *Vaccine* 2006 Apr 12;24 Suppl 2:S2-52-3
5. Zayas C, Bracho G, Lastre M, González D, Gil D, **Acevedo R**, del Campo J, Taboada C, Solis RL, Barbera R, Pérez O. Scale up of proteoliposome derived Cochleate production. *Vaccine* 2006 Apr 12;24 Suppl 2:S2-94-5
6. Gil D, Bracho G, Zayas C, del Campo J, **Acevedo R**, Toledo A, Lastre M and Pérez O. Strategy for determination of an efficient cochleate particle size. *Vaccine* 2006 Apr 12; 24 Suppl 2:S2-92-3
7. **Acevedo R**, Gil D, del Campo J, Bracho G, Valdés Y, Pérez O. The adjuvant potential of synthetic alkylglycerols. *Vaccine* 2006 Apr 12;24 Suppl 2:S2-32-5.
8. Pérez O, Lastre M, Bracho G, del Campo J, Zayas C, **Acevedo R**, Gil D, Mora N, González D, Balboa J, Cabrera O, Cuello C, Pérez DR, Barberá R, Fajardo EF, Sierra G, Solís RL, Campa C. Natural Neisseria derive proteoliposome and cochleate as potent vaccine adjuvants. *PharmacologyOnline* 3:762-64, 2006
9. Pérez O, Lastre M, Cabrera O, del Campo J, Bracho G, Cuello M, Balboa J, **Acevedo R**, Zayas C, Gil D, Mora N, González D, Pérez R, Gonzalez E, Barbera R, Fajardo EM, Sierra G, Solis RL, Campa C. New Vaccines Require Potent Adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scandinavian Journal of Immunology* 2007; 66, 271–277
10. **Acevedo R**, Romeu B, del Campo J, González E, Balboa J, Zayas C, Cuello M, Cabrera O, Lastre M, Ferro VA, Pérez O. Adjuvants: an essential component of Neisseria Vaccines. *Vaccinmonitor* 18 (2): 93-95, 2009.
11. Balboa J, Romeu B, Cuello M, Zayas C, del Campo J, González E, **Acevedo R**, Lastre M, Cabrera O, Pérez O. Intranasal immunization with AFCo1 induce systemic, mucosal and memory immune response in neonatal mice. *Vaccinmonitor* 18 (2):81-83, 2009.
12. Pérez O, del Campo J, Cuello M, González E, Nuñez N, Cabrera O, Llanes R, **Acevedo R**, Zayas C, Balboa J, Romeu B, Baró M, Campa C, Sierra G, Galindo

- MA, Labrada A, Guilherme L, Harandi AM, and Lastre M. Mucosal approaches in Neisseria Vaccinology. *Vaccimonitor* 18 (2):55-57, 2009.
13. del Campo JM, Lastre M., Zayas C, **Acevedo R.**, González E., Romeu B., Cuello M., Cabrera O., Balboa J., Harandi A, Pérez O. Mucosal immune response induced by proteoliposome and cochleate derived from serogroup b N. meningitidis. *Vaccimonitor* 18 (2):71-74, 2009.
14. González E, Romeu B, del Campo J, **Acevedo R**, Lastre M, Zayas C, Cuello M, Cabrera O, Balboa J, Valdez Y, Fariñas M, and Pérez O. Mucosal and systemic immune response against Neisseria meningitidis B induced by single time vaccination strategy. *Vaccimonitor* 18 (2):75-77, 2009.
15. Nasal immunization with AFCo1 induce recognition of *N. Gonorrhoea*. Cuello M. Nuñez N. Cabrera O, **Acevedo R**, del Campo J, Lastre M, Zayas C, González E, Balboa J, Romeu B, Thörn K, Lindqvist M, Persson J, Sarandi AM, and Pérez O. *Vaccimonitor* 18 (2):78-80, 2009.
16. del Campo J, Zayas C, Romeu B, Acevedo R, González E, Bracho G, Cuello M, Cabrera O, Balboa J, Lastre M. Mucosal immunization using proteoliposome and cochleate structures from Neisseria meningitidis serogroup B induce mucosal and systemic responses. *Methods* 49 (2009) 301–308.
17. Infante JF, Sifontes S, Pérez V, Bracho G, Hernández T, Zayas C, López Y, Díaz D, **Acevedo R**, Rodríguez N, Lastre M, Fariñas M, Del Campo Y, Ponce A, Pérez O. Ensayo de inmunogenicidad y toxicidad local del cocleato de Neisseria meningitidis en ratas Sprague Dawley. *Vaccimonitor* 18 (1):1-7, 2010

Presentación en eventos:

Orales:

1. “New Proteoliposome from *Vibrio cholerae* O1” 3th International Workshop on Vaccine Adjuvants, 2006, Club Amigo Hotel, Varadero, Cuba
2. “Novel adjuvated formulation based on Proteoliposome and Cochleate from *Vibrio Cholerae* O1”. 4th International Workshop on Vaccine Adjuvants, 2008, Club Amigo Hotel, Varadero, Cuba.
3. Adjuvant and vaccine potential of nano and microparticles derived from *Vibrio cholerae* O1 extracts. XV Congreso Científico Internacional del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 2010, Ciudad de la Habana. Cuba

Patente Aplicada:

1-Vacunas Unitemporales. Oliver G. Pérez Martín, Elizabeth González Aznar, Belkis Romeu Álvarez, Judith del Campo Alonso, **Reinaldo Acevedo Grogues**, Miriam SJB Lastre González, Caridad Zayas Vignier, Maribel Cuello Pérez, Osmir Cabrera Blanco, Niurys Nuñez Gutiérrez, Julio A Balboa González, WIPO, WO/2010/057447 (PCT)

Premios Nacionales:

1. Premio anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2009.

“Diseño, obtención y evaluación de un nuevo adyuvante mucosal en forma de Cocreato”. Autores principales: Oliver G Pérez Martín; Judith M del Campo Alonso; Miriam de SJB Lastre González; Caridad Zayas Vignier y **Reinaldo Acevedo Grogues**

2. Destacado en el XVI Forum Nacional de Ciencia y Técnica, 2008.

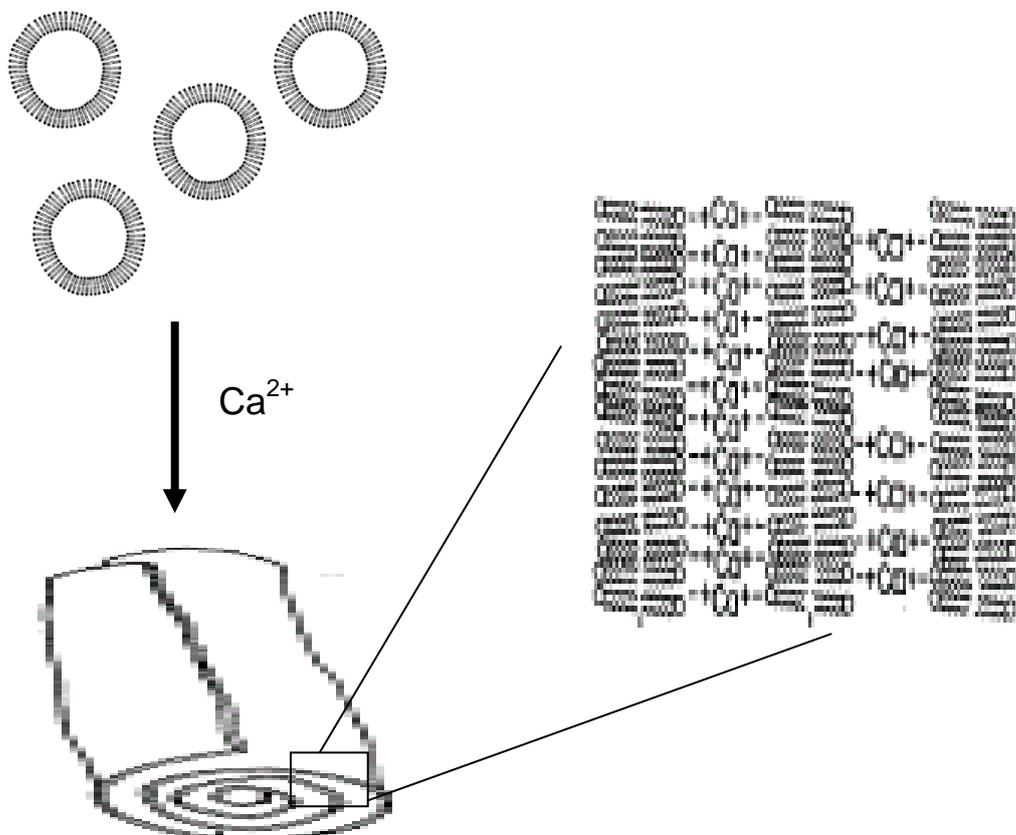
“Obtención y caracterización del AFCo2 nasal”. Autores: **Reinaldo Acevedo**, Adriana Callicó, José L Pérez y colaboradores.

3. Relevante en el XVI Forum Nacional de Ciencia y Técnica, 2010,

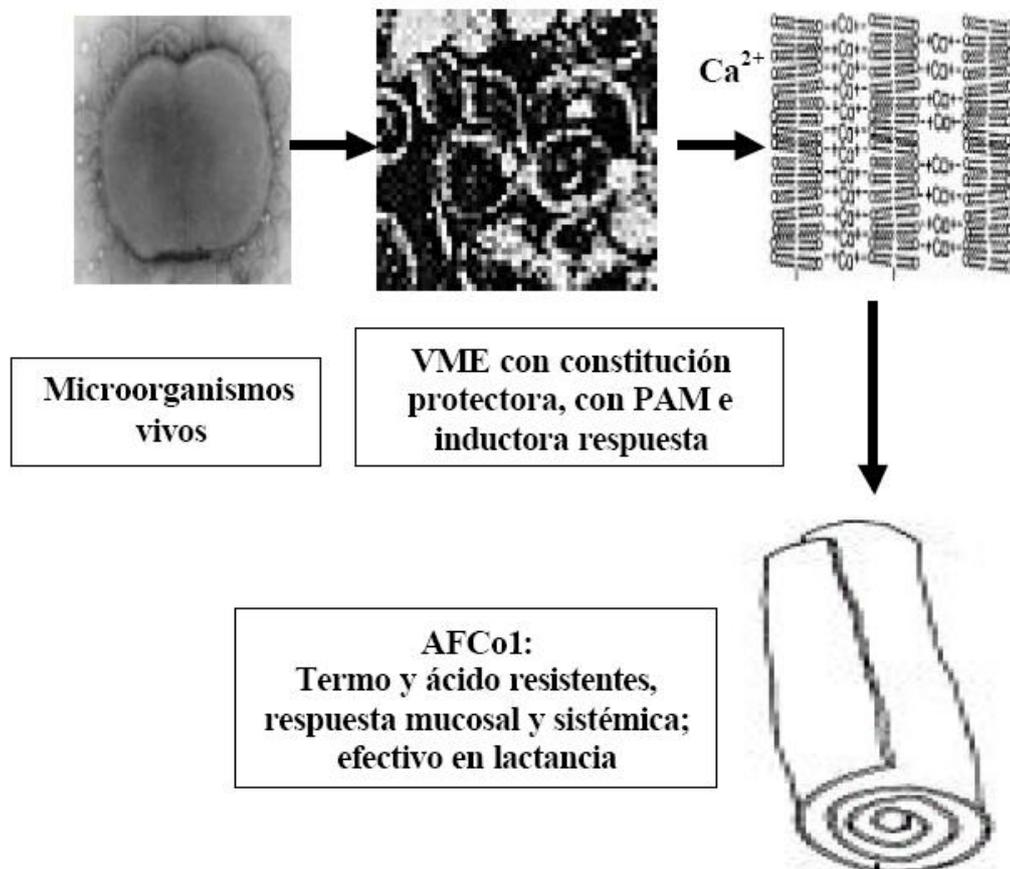
“Avances en la caracterización estructural del AFCo2 y evaluación de su efecto adyuvante sobre el Polisacárido Vi de *Salmonella Typhi*”. Autores: **Reinaldo Acevedo**, Caridad Zayas, Adriana Callicó, Judith del Campo y colaboradores.

4. Sello forjadores del Futuro, 2010,

ANEXOS



Anexo 1. Representación esquemática de la formación de Cocleatos derivados de fosfolípidos comerciales y su estructura. (Tomada de la patente Cochleate delivery vehicles.USPTO patent 5,994,318. Gould-Fogerite S. y Mannino R. 1999)



Anexo 2. Representación esquemática de la formación de Cocleatos derivados del proteoliposoma de *N. meningitidis* B. **(Tomada de la patente Método de obtención de estructuras cocleares, composiciones vacunales y adyuvantes basados en estructuras cocleares. OCPI23313. Pérez O, Bracho G, Lastre M, y colaboradores. 2008**

Lipids	Sistema de Solvente (Rf) [ver en cuadro debajo composición de los sistemas]			
	i	ii	iii	iv
Fosfatidiletanolamina	0,79	0,55		0,43
Fosfatidil monometiletanolamina	0,71	0,41		0,33
Cardiolipina	0,67	0,56	0,38	
Fosfatidilglicerol	0,60	0,50	0,31	0,36
Fosfatidil dimetiletanolamina	0,58	0,56		0,27
Acido Fosfatidico	0,55	0,05	0,58	
Fosfatidilinositol	0,39	0,10		
Fosfatidilcolina	0,34	0,30		0,17
Fosfatidilserina	0,33	0,12		
Lyso-Fosfatidilglicerol	0,54	0,20		
Lyso-Fosfatidiletanolamina	0,45	0,20		
Lyso- Acido Fosfatidico	0,40	0,01		
Lyso- Fosfatidilinositol	0,29	0,03		
Lyso- Fosfatidilcolina	0,22	0,08		
Lyso- Fosfatidilserina	0,18	0,02		

	Sistemas de Solventes	Ratio(V:V)
i	Cloroformo:Metanol:Agua	65:25:4
ii	Cloroformo:Metanol:Cloruro de Amonio	65:25:4
iii	Cloroformo:Hexano:Metanol:Acido Acetico	50:30:10:5
iv	Tolueno:Pyridina:Agua	60:60:10

Anexo 3. Sistemas de solventes más utilizados para la separación de fosfolípidos por cromatografía en capa delgada . En la tabla se representan los valores de Rf para cada especie. **Adaptado del artículo** "Determination of Molecular-Species of Phospholipids and Diglycerides" de Blank ML, Robinson M y colaboradores. Journal of Chromatography 1984;298:473-482.