

República de Cuba



Tesis de Doctorado

EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y CAPACIDAD PROTECTORA EN RATONES DE PREPARACIONES VACUNALES CONTRA BORDETELLA PERTUSSIS BASADAS EN LA TOXINA PERTUSSIS GENÉTICAMENTE INACTIVADA, LA HEMAGLUTININA FILAMENTOSA Y LA PERTACTINA NATURAL TIPO DOS O UNA PERTACTINA RECOMBINANTE HÍBRIDA DE LOS TIPOS UNO Y DOS

Diógenes Quintana Vázquez

Diógenes Quintana Vázquez

Evaluación de la inmunogenicidad y capacidad protectora en ratones de preparaciones vacunales contra Bordetella pertussis basadas en la toxina pertussis genéticamente inactivada, la hemaglutinina filamentosa y la pertactina natural tipo dos o una pertactina recombinante híbrida de los tipos uno y dos (Tesis de Doctorado). – La Habana : Editorial Universitaria, 2017. – e-ISBN 978-959-16-3480-1.

© **Autor:** Diógenes Quintana Vázquez.

Digitalización: Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba.

Calle 23 entre F y G, No. 564. El Vedado, La Habana, CP 10400, Cuba.

Email: eduniv@mes.edu.cu

Página web: <http://eduniv.mes.edu.cu>



**Universidad de la Habana, Facultad de Biología
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología**

Evaluación de la inmunogenicidad y capacidad protectora en ratones de preparaciones vacunales contra *Bordetella pertussis* basadas en la toxina pertussis genéticamente inactivada, la hemaglutinina filamentosa y la pertactina natural tipo dos o una pertactina recombinante híbrida de los tipos uno y dos

**Documento de tesis en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Biológicas**

**Autor: MSc. Diógenes Quintana Vázquez
Tutores: Dr. C. Gerardo Enrique Guillén Nieto
Dra. C. Laura Lazo Vázquez**

**La Habana
2016**



Universidad de la Habana, Facultad de Biología

Evaluación de la inmunogenicidad y capacidad protectora en ratones de preparaciones vacunales contra *Bordetella pertussis* basadas en la toxina pertussis genéticamente inactivada, la hemaglutinina filamentosa y la pertactina natural tipo dos o una pertactina recombinante híbrida de los tipos uno y dos

**Documento de tesis en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Biológicas**

MSc. Diógenes Quintana Vázquez



CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

La Habana

2016

A mis padres y hermana, Iraida, José y Alina

A mis tios, Angela, Rolando y Ana

A mis suegros, Lexis y Eduardo

A mi esposa e hijas, Eyleen, Eydi y Patricia

SÍNTESIS

La tosferina es una enfermedad respiratoria aguda causada por *Bordetella pertussis*. Las cepas emergentes producen pertactina tipo dos (Prn2) y mayores concentraciones de la toxina pertussis (PT), mientras que las vacunas comerciales contienen la pertactina tipo uno (Prn1) y la PT químicamente inactivada. Estas diferencias concurren con el aumento de la incidencia en países con altas coberturas de vacunación. En este trabajo se obtuvo por primera vez una pertactina recombinante híbrida de las variantes Prn2 y Prn1 (PRH2-1) a partir de *Escherichia coli*. Se demostró sin precedentes que las proteínas Prn2 y PRH2-1 inducen una respuesta humoral específica contra péptidos de la región variable R1, superior a la inducida por Prn1 y confieren supervivencia en el modelo murino de reto intracraneal modificado. Además, mediante un procedimiento ventajoso se obtuvieron a partir de *Bordetella pertussis* las proteínas PT genéticamente inactivada (PTg), la hemaglutinina filamentosa (FHA) y Prn2. Se demostró que las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 inducen una respuesta humoral y celular específica y confieren una protección similar a una dosis protectora de una preparación celular de referencia en ratones. El presente trabajo sienta las bases para el desarrollo de candidatos vacunales acelulares para un mejor control de la tosferina.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

por orden alfabético:

aa: aminoácido

Ac: anticuerpo

ACT: toxina adenilato ciclasa

AcM, AcMs: anticuerpo monoclonal, anticuerpos monoclonales

AcP: anticuerpo policlonal

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: análisis de varianza

ARN: ácido ribonucleico

BSA: albúmina sérica bovina (del inglés, *bovine serum albumin*)

CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba

DO: densidad óptica o densidades ópticas

DTPa, DTPc: vacuna triple de Difteria, Tétano y el componente de Pertussis acelular, vacuna triple con el componente de Pertussis celular

ELISA: ensayo inmunoenzimático en fase sólida (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FHA, hemaglutinina filamentosa (FHA, del inglés *filamentous hemagglutinin*)

FIM: fimbria

HRP: peroxidasa de rábano picante (del inglés, *horseradish peroxidase*)

IFN γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IgG, IgM, IgA: Ig de clase G, M, o A

IgG2a, IgG2b, IgG3: IgG de subclase 2a, 2b, ó 3

IL: interleucina

IMAC: cromatografía de afinidad a iones metálicos (del inglés, *immobilized metal affinity chromatography*)

LPS, LOS: lipopolisacáridos, lipooligosacáridos

m/v: Porcentaje de la solución a partir de una relación masa/volumen

MICA: ensayo modificado de reto intracerebral en ratones (del inglés, *modified intracerebral challenge assay*)

MS/MS: espectrometría de masas en sucesión

ONC: oligonucleótidos

PBS: solución salina tamponada por fosfatos (del inglés, *phosphate buffer solution*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*)

Prn, Prn1, Prn2: pertactina, pertactina de tipo uno, pertactina de tipo dos

PRH: Pertactina recombinante híbrida de los tipos uno y dos. En una molécula están presentes las regiones variables de Prn1 y Prn2

PT: Toxina Pertussis del inglés *Pertussis Toxin*

PT_Q, PT_g: Toxina Pertussis químicamente inactivada, Toxina Pertussis genéticamente inactivada

Q-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

R1: región variable uno o Región 1

R2: región variable dos o Región 2

SAUT: secuenciación automática del ADN

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (del inglés, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

UI: Unidades Internacionales

v/v: Porcentaje de la solución a partir de una relación volumen/volumen

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA LEGAL	ii
DEDICATORIA	v
SÍNTESIS	vi
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 La tosferina o pertussis	7
2.1.1 Reseña histórica de la tosferina	7
2.1.2 Origen de la enfermedad	7
2.1.3 Características clínicas de la tosferina	8
2.1.4 Factores de riesgos asociados a la muerte por tosferina	9
2.1.5 Diagnóstico y tratamiento	9
2.2 La bacteria patógena Bordetella pertussis	10
2.2.1 Filogenia y evolución	10
2.2.2 Características microbiológicas	11
2.2.3 Patogénesis	11
2.2.4 Regulación de la expresión génica por el sistema BvgA/S	12
2.2.4.1 Fases fenotípicas de la bacteria controladas por el sistema BvgA/S	13
2.2.4.2 Principales factores de virulencia	13
2.2.4.2.1 La toxina pertussis	14
2.2.4.2.1.1 Toxina pertussis químicamente inactivada (PTQ)	15
2.2.4.2.1.2 Toxina pertussis genéticamente inactivada (PTg)	15
2.2.4.2.2 Hemaglutinina filamentosa (FHA)	17
2.2.4.2.3 Pertactina (Prn)	18
2.2.4.2.4 Fimbria (FIM)	21
2.3 Modelos animales experimentales	22
2.3.1 Ratones	22
2.3.1.1 Ensayo de reto respiratorio con aerosoles	22
2.3.1.2 Ensayo de reto intranasal	22
2.3.1.3 Ensayo de Kendrick	22
2.3.1.4 Ensayo de reto intracerebral modificado	23
2.3.2 Monos	23
2.4 Inmunidad inducida por Bordetella pertussis	23
2.4.1 Mecanismos de evasión del sistema inmunológico	24
2.5 Las vacunas contra Bordetella pertussis	27
2.5.1 Las vacunas celulares contra Bordetella pertussis	27
2.5.2 Las vacunas acelulares contra Bordetella pertussis	29
2.5.2.1 Vacunas acelulares triples licenciadas contra la tosferina	30
2.5.2.2 Procedimientos utilizados en la obtención de los antígenos PT, FHA y Prn1 incluidos en las vacunas acelulares	30
2.5.3 Duración de la inmunidad adquirida por vacunación	32
2.5.4 Estrategias de vacunación actuales	32
2.5.5 Cambios en la epidemiología de la enfermedad posterior	33
2.5.6 Cambios en Bordetella pertussis posterior a la introducción de las vacunas	34
2.5.7 Desarrollo de nuevas vacunas y adyuvantes contra Bordetella pertussis	35
2.5.7.1 Obtención de proteínas de fusión recombinantes	36
2.5.8 Desarrollo de vacunas contra Bordetella pertussis en Cuba	36
3 MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 Microorganismos	38
3.1.1 Cepas de Escherichia coli	38
3.1.2 Cepas de Bordetella pertussis	38
3.2 Medios y condiciones para el cultivo de Escherichia coli	38
3.3 Medios y condiciones generales para el cultivo de Bordetella pertussis	39
3.4 Purificación de ADN cromosomal, plasmídico y en fragmentos	40
3.5 Metodología general y herramientas bioinformáticas utilizadas en el diseño de las variantes de pertactina híbrida de Prn1 y Prn2	40
3.6 Materiales y métodos generales de la Biología Molecular utilizados para obtener las construcciones genéticas	

CODIFICADORAS DE LAS VARIANTES PRH	43
3.7 Oligonucleótidos utilizados en la construcción de los vectores y la secuenciación de los genes recombinantes ... 40.....	44
3.8 Obtención mediante PCR de los fragmentos de ADN codificantes del dominio extracelular de Prn1 y Prn2 de Bordetella pertussis	44
3.9 Construcción de los plasmidios de expresión pET28a-prn1 y pET28a-prn2.....	45
3.10 Construcción de los plasmidios de expresión pET28a-prh1-2, pET28a-prh1-cc-2, pET28a-prh1-cl-2, pET28a-prh2-1, pET28a-prh2-cc-1 y pET28a-prh2-cl-1	46
3.11 Inducción de la expresión de las construcciones genéticas codificadoras de las variantes prn y prh en Escherichia coli 43.....	48
3.12 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)	48
3.13 Inmunodetección de las diferentes variantes de Prn y PRH.....	49
3.14 Caracterización de proteínas por espectrometría de masas.....	49
3.15 Purificación de las diferentes variantes de pertactina (prn ó prh) obtenidas en Escherichia coli	50
3.16 Procedimientos utilizados en la purificación de PTg, FHA y Prn2 a partir de Bordetella pertussis BPCNIC0311	51
3.16.1 Preparación del inóculo.....	51
3.16.2 Crecimiento de Bordetella pertussis BPCNIC0311 en biorreactor.....	51
3.16.3 Purificación de PTg, FHA y Prn2	52
3.16.4 Determinación de la concentración endotoxinas en las proteínas purificadas.....	55
3.16.5 Estimación de la concentración de PTg, FHA y Prn2 purificadas.....	55
3.16.6 Estimación de la pureza, cantidades totales y rendimientos de las proteínas purificadas	55
3.17 ELISA utilizado en la inmunoidentificación de las proteínas prn y prh purificadas a partir de Escherichia coli	55
3.18 ELISA para la identificación y la estimación de la concentración de ptg obtenida a partir de Bordetella pertussis	57
3.19 ELISA para la detección de ac específicos a los antígenos ptg, fha, prn1 y prn2.....	58
3.20 Experimentos en ratones	59
3.20.1 Ensayo para la determinación de la dosis mínima inductora de Ac específicos contra pertactina.....	59
3.20.2 Ensayo de inmunogenicidad de las proteínas Prn1, Prn2 y PRH obtenidas en Escherichia coli en ratones ⁵⁴	60
3.20.3 Ensayo de inmunogenicidad con las preparaciones PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1	60
3.20.4 Ensayo para la inducción ex vivo de la secreción de IFN γ , IL-4, IL-5 e IL-17 y determinación de sus concentraciones mediante ELISA	60
3.20.5 Evaluación del efecto protector de las proteínas Prn1, Prn2, PRH2-1 y PRH1-CL-2 en el ensayo de reto intracerebral modificado	55
3.20.6 Evaluación del efecto protector de las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 en el ensayo de reto intracerebral modificado	62
3.21 Análisis Estadístico	62
4 RESULTADOS	64
4.1 Obtención de una PRH a partir de Escherichia coli en cuyo diseño se incluyen las R1 de pertactina tipo uno y dos	64
4.1.1 Diseño de proteínas híbridas de las variantes de pertactina tipo uno y dos.....	64
4.1.2 Clonaje de los genes codificadores de Prn1, Prn2 y las moléculas PRH.....	69
4.1.3 Expresión de los genes codificadores de Prn1, Prn2 y las moléculas PRH.....	69
4.1.4 Caracterización de las proteínas Prn1, Prn2 y las seis PRH producidas en Escherichia coli por espectrometría de masas	71
4.1.5 Purificación de Prn1, Prn2 y las seis PRH a partir de Escherichia coli	72
4.1.6 Inmunoidentificación de las diferentes variantes de pertactina purificadas por AcMs murinos y sueros humanos anti-pertactina	72
4.2 Evaluación inmunológica de Prn2 y las variantes PRH que incorporan Prn2 en ratones BALB/c	73
4.2.1 Respuesta de anticuerpos IgG inducida por las proteínas Prn1, Prn2 y las diferentes variantes de PRH	75
4.2.2 Determinación de las clases y subclases de inmunoglobulinas inducidas por las proteínas PRH.....	75
4.2.3 Evaluación de la respuesta de anticuerpos contra péptidos lineales con secuencias de regiones involucradas en la protección.....	75
4.2.4 Reconocimiento de las proteínas P.69 (Prn1), Prn1, Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 desnaturizadas mediante calor por AcMs y sueros murinos	78
4.2.5 Evaluación de la capacidad protectora de Prn2, PRH2-1 y PRH1-CL-2 en el modelo MICA.....	78
4.3 Obtención de los componentes PTg, FHA y Prn2 a partir de Bordetella pertussis BPCNIC0311	79
4.3.1 Purificación de los antígenos PTg, FHA y Prn2	81
4.3.2 Caracterización de las proteínas PTg, FHA y Prn2 mediante espectrometría de masas y ELISA con sueros murinos	83
4.4 Evaluación inmunológica de las proteínas Prn2 y PRH2-1 coadministradas con las proteínas PTg y FHA en	

ratones	84
4.4.1 Respuesta de anticuerpos inducida por las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 en ratones BALB/c y OF-1	84
4.4.2 Determinación de las clases y subclases de inmunoglobulinas inducidas en ratones OF-1 inmunizados con las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1	85
4.4.3 Evaluación de la respuesta de anticuerpos contra péptidos lineales con secuencias de epitopos involucrados en la protección	86
4.4.4 Secreción de IFN γ , IL-17, IL-4 e IL-5 de ratones OF-1 inmunizados con las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 o PTg/FHA/PRH2-1	87
4.4.5 Evaluación de las subclases de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a inducidas en ratones OF-1 inmunizados con las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 o PTg/FHA/PRH2-1	89
4.4.6 Evaluación de la capacidad protectora de las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 en el modelo MICA	91
5 DISCUSIÓN	93
6 CONCLUSIONES	117
7 RECOMENDACIONES	118
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
9 AUTOBIBLIOGRAFÍA RELACIONADA CON LA TESIS	141
9.1 Publicaciones relacionadas con el tema de la tesis:	141
9.2 Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba relacionado con el tema de la tesis:	141
9.3 Presentaciones en eventos científicos relacionados con el tema de la tesis:	141
10 OTRAS PUBLICACIONES DEL AUTOR	142
10.1 Artículos	142
10.2 Patentes	143
11 ANEXOS	143

1 INTRODUCCIÓN

La tosferina o pertussis es una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa, causada por la bacteria *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) (Cherry y Heininger, 2004). El padecimiento es endémico a nivel mundial y afecta a personas de todas las edades (WHO, 2015). Cada año el número de infectados asciende a 40 millones y mueren 300 000 niños menores de seis meses (Coutte y Loch, 2015). Los adolescentes y los adultos constituyen la principal fuente de contagio de los niños pequeños no inmunizados o de los que no completan el esquema de vacunación (WHO, 2015).

Durante la infección de *B. pertussis* del tracto respiratorio participan de manera coordinada adhesinas y toxinas. La bacteria se une al epitelio ciliado por medio de las adhesinas pertactina (Prn), la hemaglutinina filamentosa (FHA) y los filamentos fimbriales (FIM). La toxina pertussis (PT) es el factor de virulencia principal y su producción correlaciona con la inducción de leucocitosis, inhibición de la quimiotaxis celular, anafilaxis, sensibilidad por histaminas, entre otros efectos (Monack y cols., 1989; Mattoo y Cherry, 2005). Los anticuerpos (Ac) específicos contra las adhesinas y las toxinas protegen contra la tosferina (Mattoo y Cherry, 2005).

Las vacunas contra *B. pertussis* se utilizan en combinación con los toxoides de difteria y tétanos y pueden ser celulares (DTPc) o acelulares (DTPa). Las vacunas celulares se basan en células inactivadas por métodos químicos o físicos (Mattoo y Cherry, 2005). Son vacunas eficaces en un 96 % y su principal desventaja es la elevada reactogenicidad durante las reactivaciones sucesivas, por lo que se utilizan exclusivamente en edades pediátricas (< 7 años) (WHO, 2016). Las vacunas acelulares pueden contener hasta cinco componentes purificados de la bacteria. Las vacunas DTPa mono-componentes contienen la toxina pertussis químicamente inactivada (PT_Q) (Trollfors y cols., 1997). Las de dos componentes incluyen PT_Q y la proteína FHA (Kimura y Hikino, 1985). Las de tres componentes incorporan pertactina tipo uno (Prn1) y las de cinco añaden los antígenos fimbriales Fim2 y Fim3 (Edwards y cols., 1995). Son vacunas seguras y poseen una eficacia entre 75 % y 85 % (Decker y cols., 1995; Jefferson y cols., 2003; Olin y cols., 2003). Las vacunas de tres componentes inducen una respuesta inmune protectora de mayor duración respecto a las de cinco componentes (Olin y cols., 2003; Gustafsson y cols., 2006). En general las vacunas acelulares generan menos efectos adversos que las celulares, razón por la cual están licenciadas para la reactivación de adolescentes y adultos (WHO, 2016).

Ni la concentración ni el tipo de Ac contra uno o más antígenos correlacionan con la protección contra *B. pertussis* (WHO, 2015). No obstante, en humanos, los anticuerpos específicos inducidos contra PT y

Prn1, desempeñan una función relevante contra la enfermedad (Cherry y cols., 1998; Storsaeter y cols., 2003). En ratones, los Ac inducidos por las vacunas celulares o acelulares de tres componentes, protegen pasivamente en modelos de infección intracerebral y respiratoria (Munoz y cols., 1981; Sato y Sato, 1984; Mills y cols., 1998).

A pesar de existir vacunas efectivas la incidencia de la enfermedad continúa en aumento en países con altas coberturas de vacunación (Burns y cols., 2014). Este es un fenómeno complejo al cual contribuyen múltiples factores y se manifiesta con independencia del tipo de vacuna celular o acelular utilizada (WHO, 2015; Zlamy, 2016). La duración de la inmunidad en adolescentes reactivados con vacunas acelulares ha mostrado ser también independiente del tipo de vacuna DTPa o DTPc recibida en la infancia, aunque la tasa de disminución o declive de respuesta inmune es mayor en los que recibieron DTPa cuando eran pequeños (Acosta y cols., 2015).

Se postula que el aumento de la incidencia se debe a que las cepas en circulación evaden la inmunidad inducida por las vacunas durante el declive de la respuesta inmune (Mooi y cols., 2014). En este sentido, entre las cepas vacunales y los aislados clínicos existen diferencias antigénicas. Globalmente, el 60 % de los aislados clínicos de *B. pertussis* poseen el genotipo *ptxP3/prn2* y producen pertactina tipo dos (Prn2) (Bart y cols., 2014). Las cepas productoras de Prn1 o Prn2 constituyen en su conjunto el 80 % de los aislados clínicos (Bart y cols., 2014). Sin embargo, en la fabricación de las vacunas acelulares o celulares se utilizan cepas productoras de la variante Prn1 (Mooi y cols., 2014).

La evasión de la respuesta inmune relacionada con la proteína pertactina es un fenómeno de gran complejidad. Las diferencias entre Prn1 y Prn2 residen únicamente en el número de secuencias repetidas GGAVP y GGFGP localizadas en la región variable R1 (R1) (Mooi y cols., 2014). Las R1 de Prn1 y Prn2 contienen ambos tipos de secuencias lo que supone una elevada reactividad cruzada entre ambas {Prn1 [R1 (GGAVP)₃(GGFGP)₂], Prn2 [R1 (GGAVP)₂(GGFGP)₄]}. Es importante subrayar, que solamente en sueros humanos se ha demostrado la existencia de anticuerpos tipo específicos contra Prn1 y Prn2 (He y cols., 2003). No obstante, en ratones, en un modelo de reto intranasal, se demostró que las cepas Prn2 pueden evadir la inmunidad inducida por la vacuna celular (Prn1) utilizada en Holanda (King y cols., 2001). En otro estudio, con el uso de cepas de *B. pertussis* isogénicas, se demostró que el genotipo *ptxA1/prn2* coloniza más efectivamente ratones inmunizados con la vacuna acelular (Prn1) utilizada en Japón, respecto al genotipo *ptxA2/prn1* (Komatsu y cols., 2010). Estos hallazgos sugieren que las

diferencias antigénicas entre las vacunas y los aislados clínicos pueden afectar la efectividad de las vacunas.

En relación a Prn2, en la literatura consultada no se describen estudios que examinen el efecto de inmunizar con la variante Prn2 o una pertactina híbrida recombinante de Prn1 y Prn2 obtenida en *Escherichia coli* (*E. coli*). Tanto Prn1 como Prn2 producidas en *E. coli* mantienen sus propiedades antigénicas y estructurales (Hijnen y cols., 2005). En este sentido sería importante evaluar estos inmunógenos en el modelo murino de reto intracerebral modificado (MICA), único modelo validado que cuantifica la protección en términos de animales vivos y muertos (Xing y cols., 2014a). Una preparación vacunal acelular con la variación tipo dos podría también ser igualmente protectora que preparaciones vacunales que contienen Prn1. De comprobarse este supuesto, se podría justificar la inclusión de Prn2 en preparaciones vacunales acelulares con el objetivo de estimular en humanos la inducción de Ac tipo específicos contra Prn2.

Por otro lado, las cepas con el genotipo *ptxP3* producen mayores concentraciones de PT debido a la fortaleza del promotor *ptxP3* (Mooi y cols., 2014) y se asocian significativamente con la severidad de la enfermedad en niños (Clarke y cols., 2015). En este sentido, incluir la toxina pertussis genéticamente inactivada (PTg) en las vacunas es una alternativa con antecedentes efectivos en humanos, la cual se retoma actualmente para enfrentar la emergencia de cepas de *B. pertussis* con el genotipo *ptxP3/prn2* (Plotkin, 2014; Seubert y cols., 2014). En las vacunas la proteína PT nativa se inactiva generalmente con aldehídos. Este procedimiento destruye el 80 % de los epitopos neutralizantes (Ibsen, 1996) y suprime las propiedades adyuvantes de la PT (Seubert y cols., 2014). La proteína PTg es más inmunogénica que PT_Q y mantiene las propiedades adyuvantes de la toxina nativa. Sin embargo, no existen vacunas comerciales con el antígeno PTg (Seubert y cols., 2014). Tampoco se describen estudios dirigidos a demostrar la protección de Prn2 o pertactinas híbridas de Prn1 y Prn2 en combinación con los antígenos PTg y FHA.

En Cuba desde 1994 no hay informes que evidencien casos de tosferina (MINSAP, 2015). Sin embargo, existe preocupación por instituciones nacionales de salud debido al incremento de la enfermedad en países de la región que utilizan, como Cuba, vacunas celulares con altas coberturas de vacunación (Martínez C y cols., 2012; Monroy-Vaca y cols., 2014). Por ello, es necesario acometer estudios que permitan mejorar las vacunas actuales, en particular las acelulares, con el objetivo de favorecer el

control de la tosferina, basado en la inmunización de madres gestantes, adolescentes y adultos, como recomienda la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2016).

Sobre la base de los antecedentes descritos anteriormente se planteó la siguiente hipótesis: **una preparación vacunal basada en la toxina pertussis genéticamente inactivada, la hemaglutinina filamentosa y la pertactina natural tipo dos purificadas de *B. pertussis* o en sustitución de la pertactina natural, una recombinante híbrida de los tipo uno y dos obtenida en *E. coli*, confiere una protección similar al de una dosis protectora de una preparación vacunal celular de *B. pertussis*, en el modelo murino de reto intracerebral modificado.**

Objetivo General:

Evaluar la respuesta inmune inducida en diferentes líneas de ratón y el efecto protector en el modelo murino de reto intracerebral modificado, de preparaciones vacunales acelulares que incorporan la pertactina tipo dos o pertactinas híbridas de los tipo uno y dos, administradas por separado o en combinación con las moléculas PTg y FHA.

Objetivos Específicos:

1. Obtener una pertactina recombinante híbrida (PRH) a partir de *E. coli* en cuyo diseño se incluyan las regiones variables R1 de Prn1 y Prn2.
2. Evaluar la respuesta humoral inducida por la proteína Prn2 y PRH en ratones y la capacidad de conferir protección en el modelo MICA.
3. Obtener los antígenos PTg, FHA y Prn2 a partir de la cepa *B. pertussis* BPCNIC0311.
4. Evaluar la respuesta humoral y celular inducida por preparaciones vacunales compuestas por PTg, FHA y Prn2 o la proteína PRH en sustitución de la Prn2 natural, en ratones y la capacidad de las preparaciones vacunales de conferir protección en el modelo MICA.

Para cumplir los objetivos específicos se abordaron las siguientes tareas experimentales:

Objetivo 1

1. Diseño de una pertactina recombinante híbrida de los tipos uno y dos.
2. Clonaje, expresión en *E. coli* y purificación de las variantes Prn1, Prn2 y variantes de PRH.
3. Inmunodetección mediante ensayos inmunoenzimáticos de adsorción (ELISA) de las variantes PRH con anticuerpos monoclonales (AcMs) murinos y sueros humanos generados por la inmunización con una vacuna acelular comercial.

Objetivo 2

1. Inmunización de ratones BALB/c con las proteínas Prn1, Prn2 y variantes de PRH purificadas.
2. Determinación mediante ELISA de la respuesta de Ac específica contra Prn1, Prn2 y péptidos con secuencias de diferentes regiones de pertactina involucradas en la protección contra la enfermedad.
3. Evaluación en ratones OF-1 de la capacidad de las proteínas Prn1, Prn2 y variantes de PRH de inducir protección tras el reto con la cepa letal *B. pertussis* BP18323 en el modelo MICA.
4. Selección de una PRH según sus propiedades inmunogénicas y protectoras.

Objetivo 3

1. Purificación de las proteínas PTg, FHA y Prn2 a partir de la cepa genéticamente modificada *B. pertussis* BPCNIC0311.
2. Análisis de las proteínas PTg, FHA y Prn2 purificadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, *Western blotting* y espectrometría de masas.
3. Inmunodetección mediante ELISA de PTg, FHA y Prn2 con sueros murinos generados por la inmunización con una vacuna acelular comercial.

Objetivo 4

1. Inmunización de ratones BALB/c y OF-1 con preparaciones vacunales compuestas por los antígenos PTg, FHA y Prn2 (PTg/FHA/Prn2) o PTg, FHA y PRH (PTg/FHA/PRH).
2. Determinación mediante ELISA de los títulos de Ac específicos contra los componentes PTg, FHA, Prn1 y Prn2.
3. Determinación mediante ELISA de las concentraciones de IFN γ , interleucina 4, interleucina 5 e interleucina 17 secretadas *ex vivo* por los esplenocitos de ratones inmunizados con las preparaciones PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH como indicadores de la respuesta inmune celular inducida.
4. Evaluación en ratones OF-1 de la capacidad de las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH de conferir protección tras el reto con la cepa letal *B. pertussis* BP18323 en el modelo MICA.

La **novedad científica** del presente trabajo, consiste en que por primera vez se demuestra que la proteína Prn2 induce títulos de anticuerpos que reconocen péptidos de la R1 de Prn1 y Prn2, de mayor magnitud a los estimulados por la proteína Prn1. Además, se demuestra sin precedentes que una pertactina recombinante híbrida que incluye las variaciones de tipo dos y uno (PRH2-1), tiene la capacidad a) de inducir títulos de Ac contra los péptidos de las regiones variables R1 de Prn1 y Prn2, con

una magnitud similar a los inducidos por la variante Prn2, y b) de conferir protección en el modelo MICA. Igualmente, por primera vez se demuestra que preparaciones vacunales acelulares compuestas por PTg y FHA, al incorporar la variante tipo dos de pertactina, tanto en una pertactina natural o una pertactina híbrida de los tipo dos y uno confieren una protección similar a una preparación celular en el modelo MICA frente a la cepa letal *B. pertussis* BP18323. Constituye novedad científica también un procedimiento ventajoso para la obtención por separado de los antígenos PTg, FHA y Prn2 a partir de *B. pertussis* BPCNIC0311, en el cual se prescinde de la precipitación de PTg y FHA por sulfato de amonio y permite la purificación de Prn2 en un paso cromatográfico.

Adicionalmente, del conjunto de todos los resultados surgen nuevos aportes al conocimiento, con **importancia teórica** en el campo de la inmunología y la vacunología. Se aportan evidencias acerca de la utilidad y la función protectora de la variante tipo dos de pertactina como alternativa antigénica contra *B. pertussis*. Además, se brindan elementos estructurales de pertactina que permiten obtener en *E. coli*, moléculas híbridas de Prn1 y Prn2 con la capacidad de ser reconocidas por sueros humanos y AcM protectores así como de conferir protección en ratones.

La **importancia práctica** se basa en la posibilidad de contar con preparaciones vacunales compuestas por los antígenos PTg, FHA y Prn2 o una pertactina híbrida que incluya las variaciones tipo uno y dos, las cuales podrían favorecer el control de las cepas de *B. pertussis* en circulación con genotipos *ptxP3/prn2* o *ptxP3/prn1*, mediante la generación de anticuerpos anti-PT de mayor valor protector y de Ac tipo específicos anti-Prn2 y anti-Prn1.

El **aporte social** de las preparaciones vacunales aquí evaluadas viene dado por su posible aplicación en la inmunización de madres gestantes, adolescentes y adultos con el objetivo de evitar el contagio de infantes menores de 3 meses de nacidos.

Los resultados obtenidos se reflejan en dos publicaciones científicas en revistas internacionales, Biotecnología Aplicada y Journal of *Infectious Diseases and Therapeutics*; varios congresos nacionales e internacionales, un logro anual del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) en el año 2015, una patente (PCT/CU2008/000009) aceptada en Cuba, EE.UU, Rusia, China, Corea del Sur, entre otros y un Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba en el año 2015.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La tosferina o pertussis

2.1.1 Reseña histórica de la tosferina

La tosferina o pertussis, a diferencia de otras enfermedades como papera y sarampión, carece de documentos antiguos que la refieran (Cherry y Paddock, 2014). Su aparición histórica se establece en Francia, en un periodo entre 1414 y 1540 (Lapin, 1943). El primer brote epidémico de una enfermedad con síntomas semejantes a pertussis probablemente haya ocurrido en París hacia 1578, hecho que fue descrito por Guillaume de Baillou en 1640 (Cone, 1970). Décadas después, el médico inglés Thomas Sydenham (1624-1689) describió con mayor claridad la enfermedad y la denominó “*infantum pertussis*”, término que denota la tos violenta, convulsiva y persistente que se produce en los infantes (Mattoo y Cherry, 2005). La enfermedad ha tenido y tiene una incidencia mundial y se denomina según las regiones como tosferina (tos de las fieras) por hispano hablantes, coqueluche en Francia y en China la tos de los 100 días. En 1906 Bordet y Gengou relacionaron la sintomatología de la enfermedad pertussis al *Bacillus pertussis*. Fueron ellos quienes, por primera vez, cultivaron el microorganismo como una forma pura y para ello emplearon placas de agar sangre-papa-glicerol (Bordet y Gengou, 1906). En la década de 1930 en honor a Bordet se comienza a nombrar la bacteria como *Bordetella pertussis* (Kendrick, 1933). Por la severidad y la alta mortalidad asociada a la enfermedad, en los años 1920, se obtuvieron las primeras vacunas basadas en células muertas, las cuales se administraron a niños de Túnez y Dinamarca (Howson y cols., 1991). Posteriormente, estas preparaciones se combinaron con los toxoides de difteria y tétano para dar lugar a la vacuna celular triple (DTPc) como se conoce en nuestros días (Mattoo y Cherry, 2005).

2.1.2 Origen de la enfermedad

El origen de la enfermedad pertussis es aún objeto de investigación. Existen dos postulados que intentan explicar las evidencias encontradas. Una de ellas afirma que la asociación entre *B. pertussis* y los humanos es reciente. La misma acepta como evidencias 1) la ausencia de documentos antiguos que refieran síntomas semejantes a pertussis y 2) la limitada diversidad genética en las poblaciones de *B. pertussis*. Sin embargo, el descubrimiento reciente de un linaje antiguo de *B. bronchiseptica* que infecta a humanos sugiere una antigua relación de *B. pertussis* con humanos como hipótesis alternativa (Diavatopoulos y cols., 2005). En este sentido, la bacteria *B. pertussis* pudo evolucionar a partir de un linaje ancestral de *B. bronchiseptica*. La omisión histórica de la enfermedad pudiera explicarse debido a

la circulación en las poblaciones ancestrales de cepas asociadas a una sintomatología benigna y relacionada a la producción de concentraciones relativamente bajas de PT (cepas menos virulentas) (Mooi, 2010).

2.1.3 Características clínicas de la tosferina

La tosferina es una enfermedad aguda y altamente contagiosa causada por *B. pertussis* (Cherry y Heininger, 2009). La bacteria es un patógeno estricto de humanos y se desconoce si otro animal o hábitat ambiental puede constituir un reservorio alternativo (Cotter y Miller, 2001). La transmisión del microorganismo puede ocurrir a través de aerosoles respiratorios (Warfel y cols., 2014; Forsyth y cols., 2015). La enfermedad es mediada primariamente por toxinas que producen daños severos al hospedero (Mattoo y Cherry, 2005). Se caracteriza por un estado catarral del árbol respiratorio, con accesos de tos intensos. La enfermedad se divide en cuatro etapas o fases: la incubación es de siete a diez días (fase I), que puede extenderse hasta 42 días. Le sigue un periodo catarral (fase II), cuya duración es de una a dos semanas, definida por coriza, fiebre y tos moderada que se incrementa en el tiempo. Es precisamente en este periodo cuando los infectados contagian con facilidad a otros individuos. Posteriormente, se inician los paroxismos que persisten de tres a ocho semanas (fase III). En esta fase se sospecha el diagnóstico de la tosferina por la ocurrencia en los niños enfermos de numerosos paroxismos, tos rápida y severa, dificultad al respirar, cianosis y vómitos; en adultos y adolescentes puede transcurrir de forma asintomática o manifestarse como una tos persistente. La convalecencia (fase IV) se extiende generalmente de semanas a meses. Durante la cuarta fase el paciente se recupera gradualmente y los paroxismos y la tos desaparecen a las dos o tres semanas. Los paroxismos recurren con frecuencia ante infecciones respiratorias secundarias, muchos meses después del inicio de la tosferina (Melvin y cols., 2014).

Los adultos y adolescentes que generalmente están inmunizados por infección natural o por vacunas, muestran un espectro amplio de la tosferina, que abarca desde una enfermedad asintomática, benigna o moderada hasta la pertussis clásica. Cuando la sintomatología de la enfermedad no es clásica, se presenta como una tos recurrente por más de una o dos semanas y clínicamente puede ser indistinguible de cualquier otra infección respiratoria (Tozzi y cols., 2005). El 3 % de los adultos con síntomas de tos aguda con una duración inferior a 28 días resultan infectados por *B. pertussis* (Teepe y cols., 2015).

2.1.4 Factores de riesgos asociados a la muerte por tosferina

Los infantes no vacunados o los que no completan su esquema de vacunación tienen el riesgo más alto de padecer complicaciones severas incluso la muerte (Guris y cols., 1999; Mertsola, 2014). Los factores asociados a los decesos en infantes infectados son diversos: bajo peso al nacer, menor edad al momento de la aparición de la tos, conteo más elevado de glóbulos blancos y el recuento de linfocitos. Los casos fatales se asocian al menor uso de antibióticos (macrólidos) y mayor utilización de esteroides y de óxido nítrico. El desarrollo de hipertensión pulmonar, convulsiones, encefalitis y neumonía también son complicaciones frecuentes asociadas a los casos fatales (Winter y cols., 2015).

2.1.5 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico clínico es complejo y se afecta por diversos factores que pueden variar la definición clínica. Un diagnóstico adecuado de los síntomas clínicos se facilita si se investiga integralmente el síndrome pertúsico, generalmente asociado a un estado no febril, presencia de estertores respiratorios, incremento de la frecuencia de la tos durante las noches, persistencia de la tos por más de siete días, la ausencia de reactivación en los últimos 10 años y la identificación de contactos positivos a *B. pertussis*, todos ellos asociado a la edad del paciente (Guiso, 2015). El diagnóstico clínico debe apoyarse en el diagnóstico biológico o de laboratorio dentro de los primeros 14 días, junto con el cultivo de *B. pertussis* y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR) en tiempo real. Con posterioridad, se dificulta el aislamiento del patógeno y se procede a diagnosticar por Q-PCR. Después de 21 días, la Q-PCR se aplica solo a casos de infección secundaria, así mismo en este periodo tardío son útiles las técnicas de detección de Ac mediante ELISA (anti-PT) (Guiso, 2015). Internacionalmente se acepta que títulos de anticuerpos IgG igual o superiores a 125 unidades internacionales (UI) son indicativos de una infección reciente (Teepe y cols., 2015).

Tanto el diagnóstico como el tratamiento temprano de la enfermedad son importantes para mitigar los síntomas severos, especialmente en los niños. El uso de antibióticos en la fase catarral puede modificar la severidad de los síntomas, acortar su duración y eliminar el microorganismo del tracto respiratorio superior (Bass y cols., 1969; Bergquist y cols., 1987). El tratamiento en la fase de paroxismos es inefectivo aunque puede ser usado para eliminar al patógeno y evitar su transmisión (CDC, 2008). Se recomiendan los antibióticos del tipo macrólidos tales como la azitromicina, claritomicina y en menor medida la eritromicina (Cohen y cols., 2014).

2.2 La bacteria patógena *Bordetella pertussis*

2.2.1 Filogenia y evolución

El patógeno *B. pertussis* pertenece al género *Bordetella* de la familia *Alcaligenaceae*. Un total de nueve especies conforman el género: *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, *B. holmesii*, *B. avium*, *B. trematum*, *B. hinzii*, *B. petrii* y *B. ansorpii* (Brenner y cols., 2005).

Mediante la combinación de diferentes técnicas tales como la tipificación multilocus de secuencias, análisis comparativo de micro arreglos del genoma completo y la tipificación de secuencias de inserción (SI) se caracterizó un conjunto de 132 aislados de *Bordetella* de diversos huéspedes mamíferos. Como resultado, se identificaron cuatro complejos distintos integrados por cepas relacionadas y representados por *B. pertussis* (complejo II), *B. parapertussis*_{HU} (complejo III) y *B. bronchiseptica* con dos complejos distintos (I, IV). El complejo I incluye cepas de *B. bronchiseptica* de origen animal (68 %), mientras que el complejo IV está integrado por cepas de *B. bronchiseptica* (80 %) que proceden de pacientes con síntomas similares a los de la tosferina (Diavatopoulos y cols., 2005).

La bacteria *B. pertussis* pudo evolucionar a partir de un ancestro parecido a las cepas de *B. bronchiseptica* del complejo IV. La biología comparativa muestra que la adaptación de *B. pertussis* a humanos ha sido a expensas de reordenar y optimizar el genoma mediante la pérdida de genes (fragmentos del cromosoma) y el silenciamiento de cientos de ellos (seudogenes). El número de secuencias codificantes predichas en *B. pertussis* (3816) es inferior al de *B. parapertussis*_{HU} (4404) y *B. bronchiseptica* (5007) (Preston, 2005). La presencia de un número menor de mutaciones en *B. parapertussis*_{HU} sugiere que su origen es más reciente que el de *B. pertussis*. Tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis*_{HU} han perdido información genética involucrada en el transporte de membrana y la biosíntesis de estructuras de superficie (Burns y cols., 2003).

Las especies *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* y *B. pertussis* causan padecimientos respiratorios en humanos (Locht, 2007). Existen dos linajes diferentes de *B. parapertussis*, *B. parapertussis*_{HU} y *B. parapertussis*_{OV} que infectan a humanos y a carneros respectivamente (Cullinane y cols., 1987). *B. parapertussis*_{HU} produce síntomas similares a pertussis aunque el grado de severidad de la enfermedad suele ser significativamente inferior en comparación con *B. pertussis* (Mattoo y Cherry, 2005). Las afecciones causadas por *B. bronchiseptica* son poco frecuentes y se observan mayormente en individuos inmunocomprometidos (Woolfrey y Moody, 1991), niños (Mastrantonio y cols., 1997) y también por zoonosis en personas dedicadas al cuidado de animales (Goodnow, 1980).

2.2.2 Características microbiológicas

La bacteria *B. pertussis* es un cocobacilo aerobio estricto, Gram negativo que crece de forma óptima a temperaturas entre 35 °C y 37 °C. La bacteria resulta positiva a los ensayos de oxidasa y catalasa. El microorganismo carece de motilidad, es negativo al ensayo de ureasa y no produce pigmentos solubles de color oscuro en placas de agar peptona (Leber, 2014). Sus dimensiones físicas hacen que sea descrito como una bacteria relativamente pequeña: 0,2-0,3 µm x 0,5-0,8 µm. Es un microorganismo difícil de cultivar y no puede multiplicarse en los medios estándares de agar nutriente. Después de 96 h de cultivo, en placas con un medio de agar, glicerol, infusión de papa y sangre de carnero se pueden observar colonias de forma perlada, de color mercurio y pequeñas como la punta de un alfiler. Pasado 72 h adicionales, es fácil visualizar alrededor de las colonias el desvanecimiento del color rojo producto de la actividad beta hemolítica asociada a la toxina adenilato ciclasa (ACT) (Guiso, 2015).

2.2.3 Patogénesis

El conocimiento de cómo *B. pertussis* interactúa con su hábitat natural (el ser humano) para producir la enfermedad surge de estudios indirectos, esencialmente estudios *in vitro* o con mutantes de *B. pertussis* en el modelo murino. Hasta la fecha, los modelos animales utilizados no reproducen todos los síntomas que caracterizan la enfermedad que ocurre en humanos (Mattoo y Cherry, 2005). La adherencia del patógeno ocurre en el epitelio nasofaríngeo por medio de múltiples adhesinas como FHA, Prn y FIM, para posteriormente diseminarse hacia el tracto respiratorio medio e inferior (Hewlett y cols., 2014). Durante la diseminación se provocan daños a las células y los tejidos locales, al tiempo que transcurren los eventos de la evasión inmunológica. En el modelo de Hámster se ha observado que la bacteria se adhiere a las células del epitelio del tracto respiratorio y produce un extenso daño en los orgánulos de las mismas, ciliostasis y desprendimiento celular (Collier y cols., 1977). En la evasión inmune se involucran múltiples factores de virulencia tales como la PT, la ACT, al igual que las adhesinas antes mencionadas, todos ellos con una demostrada actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* (Hewlett y cols., 2014; Melvin y cols., 2014; Carbonetti, 2015). La proteína PT es el factor de virulencia que más contribuye en la enfermedad. En diferentes especies de *Bordetella sp.* manipuladas genéticamente para expresar PT, se observa una correlación positiva con la inducción, en ratones, de leucocitosis, anafilaxis y sensibilidad por histaminas (Monack y cols., 1989). También en ratones, la respuesta exacerbada en las vías respiratorias, producida por el efecto tóxico e inmunomodulador de PT, interfiere con la limpieza de las secreciones pulmonares y acarrea además otros efectos sistémicos (Connelly y cols., 2012;

Carbonetti, 2015). En humanos, los infantes mueren principalmente a causa de hipertensión pulmonar y se ha observado, *post mortem*, que las arterias pulmonares pequeñas se encuentran ocluidas por agregados leucocitarios junto a la presencia de abundantes células de *B. pertussis* (Sawal y cols., 2009).

El desarrollo del modelo experimental en monos infantes de la especie *Papio anubis*, que reproduce alguna de las manifestaciones típicas de la tosferina tales como la tos paroxística, la linfocitosis, la producción de altos niveles de anticuerpos anti-PT y la protección después de una infección previa, permitirá estudiar más directamente cómo los diferentes factores de virulencia conocidos y los aún por descubrir, contribuyen a la sintomatología de pertussis (Warfel y Merkel, 2014).

2.2.4 Regulación de la expresión génica por el sistema BvgA/S

En *Bordetella* los factores de virulencia, con la excepción de la toxina traqueal, son regulados por el locus *bvg* (del inglés, *Bordetella virulence genes*) (Weiss y Falkow, 1984), el cual codifica para un sistema de dos componentes denominado BvgA/S (del inglés, *Bordetella virulence genes Activator/Sensor*) (Parkinson y Kofoed, 1992). Los genes regulados directamente por BvgA/S se nombran *vag* (del inglés, *virulence activated genes*), mientras que los genes *vrg* (del inglés, *virulence repressed genes*) son regulados indirectamente (Smith y cols., 2001). Los dos componentes del sistema BvgA/S son conocidos como BvgA (activador) y BvgS (sensor). El sensor BvgS es un homodímero transmembrana cuyo extremo amino se localiza en el periplasma y el extremo carboxilo en el citoplasma de la bacteria. El extremo amino de cada monómero de 135 kDa consiste en dos dominios denominados VFT1 (distal a la membrana interna) y VFT2 proximal (del inglés, *Venus Flytrap domains*), seguidamente le suceden un segmento transmembrana, y ya en citoplasma un dominio denominado PAS, seguido por un dominio histidina-quinasa (HK), un receptor (R) y una histidina HPT (del inglés, *histidine phosphotransfer*), todos en su conjunto componen una cadena de fosfotransferencia (del inglés, *phophorelay*). Por su parte, el activador BvgA se compone de un dominio receptor y un dominio de unión al ADN (Dupre y cols., 2015). Los dominios VFT de cada monómero se entrelazan y tienen la función de monitorear el microambiente en el periplasma. Bajo condiciones bien definidas de crecimiento *in vitro* y poco conocidas *in vivo*, la proteína BvgS se activa y utiliza ATP para fosforilar primero el dominio HK y finalmente la histidina HPT del extremo carboxilo. Seguidamente, el grupo fosforilo se transfiere a un grupo aspartato presente en el dominio receptor del activador BvgA. La proteína activadora en su estado fosforilado (BvgA-P) tiene alta afinidad de unión por los promotores de los genes *vag*. De igual forma, BvgA-P se une al promotor de una tercera proteína reguladora BvgR (Merkel y cols., 2003). La sobreexpresión de BvgR inhibe la

expresión de los genes *vrg*. El resultado final de este proceso es la fase virulenta conocida como Bvg+, la cual es esencial para el desarrollo del ciclo infeccioso de *B. pertussis* (Mattoo y Cherry, 2005).

2.2.4.1 Fases fenotípicas de la bacteria controladas por el sistema BvgA/S

En *Bordetella* se describen tres fases fenotípicas. La fase Bvg+ está asociada a la colonización *in vivo*, mientras que *in vitro* la fase se induce en ausencia de ácido nicotínico y MgSO₄ y a temperaturas superiores a 27 °C. En la fase Bvg+ se expresan a niveles máximos los genes de clase 1 tales como el operón *ptx-ptl*, que codifica para PT y su sistema de secreción; el gen *cyaA-E*, que codifica para la proteína ACT y el operón *bsc* que codifica para el sistema de secreción tipo III. De igual forma, se expresan a niveles máximos los genes conocidos como de clase 2 que incluye *fhaB*, que codifica para FHA, *fim* que codifica para la fimbria y el mismo *BvgAS* que se autorregula positivamente. Los genes clase 2, se expresan de igual forma en la fase denominada Bvg-intermedia (Bvgi). La fase Bvgi se alcanza *in vitro* a concentraciones de ácido nicotínico bien definidas y dependiente de la especie (Ej. 3-5 mM para *B. pertussis*) y a temperaturas también superiores a 27 °C. Durante esta fase se expresa el gen *bipA* (de clase 3) que codifica para la proteína de membrana externa BipA, cuya expresión está sobre regulada (*in vitro*) en el proceso de formación de biopelículas (de Gouw y cols., 2014b). La tercera fase observada en *Bordetella* es la Bvg-, la cual se manifiesta a concentraciones mayores de ácido nicotínico, MgSO₄ y a temperaturas menores que 27 °C. La expresión de los genes *vag* se reprimen en Bvg- y se expresan a máximos niveles los genes *vrg* o de clase 4 que incluye aquellos que codifican para las funciones asociadas a la motilidad en *B. bronchiseptica* (Mattoo y Cherry, 2005).

Los factores de virulencia se producen diferencialmente en el tiempo y operan coordinadamente sobre disímiles blancos celulares para permitir la adhesión, colonización, evasión de los mecanismos de defensa del hospedero y la transmisión posterior a otro individuo susceptible. Durante la fase Bvg+ se producen tempranamente (10 min) las adhesinas FHA y FIM, implicadas en la adhesión primaria y la colonización. Seguidamente (1 h), se sintetizan otros factores como BrkA (del inglés, *Bordetella resistance to killing factor A*), el autotransportador Vag8, el sistema secreción tipo III y Prn. Tardíamente (2-4 h) y concurrente con la etapa de colonización se producen los factores PT, ACT y la toxina dermonecrótica (DNT) (Smith y cols., 2001).

2.2.4.2 Principales factores de virulencia

El patógeno *B. pertussis* produce diversas toxinas tales como PT, ACT, DNT, citotoxina traqueal (TCT), la toxina de secreción tipo III (T3SS) y la endotoxina o lipooligosacárido (LOS). El patógeno sintetiza además

numerosos factores de adhesión con los cuales se une a los receptores celulares. Entre estos se encuentran la FHA, Prn, FIM así como otros autotransportadores BrkA, TcfA, BapC, BatB, Vag8, SphB1 y Phg; todos los cuales contribuyen a la patogénesis y la mayoría constituyen dianas para anticuerpos y células T (Melvin y cols., 2014; Scheller y cols., 2015). A continuación se describen resumidamente las características fundamentales de cinco factores que por su importancia inmunoprotectora se incluyen en las vacunas acelulares: PT, Prn1, FHA, FIM2 y FIM3.

2.2.4.2.1 La toxina pertussis

La enzima PT es producida por *B. pertussis* y no por *B. parapertussis* ni por *B. bronchiseptica* (Guiso, 2015). Perteneciente a la familia de toxinas de tipo A:B₅ con actividad ADP ribosil transferasa (Ui y cols., 1986). El operón codificante de PT comprende los genes *ptx* y *ptl*. El locus *ptx* codifica para las cinco subunidades de la toxina, la cual se ensambla en el periplasma y se exporta a través del sistema de secreción (Tipo IV) codificado por el locus *ptl* (Locht, 2007). El gen *ptx* presenta un polimorfismo representado por ocho variantes alélicas *ptxA1*, *ptxA2* hasta *ptxA8*. La variante *ptxA1* predomina en los aislados de la mayoría de los países del mundo (Zhang y cols., 2010; Miyaji y cols., 2013; Lam y cols., 2014; van Gent y cols., 2015). Los alelos *ptxA1*, *ptxA3* *ptxA6* y *ptxA7* codifican para proteínas idénticas. Los alelos *ptxA1* y *ptxA2* codifican toxinas con un cambio conservativo no expuesto al solvente (Mooi y cols., 2014). Las variaciones descritas no afectan la actividad neutralizante *in vitro* por parte de sueros inmunes (Hausman y Burns, 2000).

La estructura cristalográfica de PT fue resuelta a 2.9 Å de resolución por Stein y cols. (Stein y cols., 1994). Es una proteína hexamérica de 117 kDa conformada por seis subunidades diferentes (Tamura y cols., 1982). La subunidad S1 o porción A, contiene el sitio catalítico (ADP ribosil transferasa) de la actividad enzimática y es la responsable de las alteraciones biológicas. El oligómero B está formado por las cuatro subunidades restantes en un arreglo donde los dímeros S₂S₄ y S₃S₄ se unen mediante la subunidad S₅ (Tamura y cols., 1982) y constituye el dominio de unión a los receptores celulares. Particularmente, *in vitro*, puede unir cualquier glicoproteína que contenga ácido siálico (Millen y cols., 2010). Los receptores a los que PT se une *in vivo* no se conocen.

El mecanismo de acción de la toxina puede describirse resumidamente de la siguiente forma: la toxina liberada por la bacteria se une a los receptores celulares por medio del oligómero B, entra en la célula blanco por endocitosis y seguidamente se transporta retrógradamente a través del aparato de Golgi hacia el retículo endoplasmático (Carbonetti, 2015). El oligómero B₅ une una molécula de ATP y se

disocia de la subunidad A, de esta forma se facilita el transporte al citosol de la subunidad catalítica en exosomas hasta llegar a la membrana plasmática de la célula hospedera. La subunidad A puede entonces hidrolizar NAD⁺ y transferir el grupo ADP-ribosa liberado a un residuo cisteína presente en la subunidad alfa de las proteínas G heterotriméricas ancladas en membrana. La transferencia de este grupo modifica covalentemente las proteínas aceptoras, entre ellas, algunas proteínas G inhibitorias de la producción de AMP cíclico. Consecuentemente, ocurre la desregulación de importantes vías metabólicas y en dependencia del tipo de célula, pueden traducirse en diversos efectos fisiopatológicos tales como sensibilización a histaminas, activación de la secreción de insulina, linfocitosis, supresión de linfocinas inflamatorias, inhibición de los eventos de reclutamiento de células inmunes a los sitios de infección entre otros (Carbonetti, 2015).

La molécula PT posee propiedades adyuvantes relevantes. Estudios realizados en diversos modelos animales y en humanos confirman que PT es capaz de potenciar la respuesta de Ac contra otros antígenos presentes en la formulación (Mattoo y Cherry, 2005; Salcedo-Rivillas y cols., 2014).

2.2.4.2.1.1 Toxina pertussis químicamente inactivada (PT_Q)

El uso del glutaraldehído para la inactivación de PT es el procedimiento preferido en los procesos productivos (Gupta, 1990). La inmunización con PT_Q induce títulos de Ac neutralizantes de la PT así como protectores en ratones (Gupta y cols., 1990) y humanos (Guiso, 2015). La inactivación con peróxido de hidrógeno también resulta un método efectivo para la inactivación de PT (Trollfors y cols., 1995). En humanos, la duración de los Ac inducidos contra PT_Q es temporal (Guiso, 2015). Las concentraciones de los agentes químicos utilizados en los procedimientos de inactivación, que garantizan la no reversión a la forma tóxica, destruyen la mayoría de los epitopos neutralizantes presentes en PT y sus propiedades adyuvantes (Seubert y cols., 2014; Agnolon y cols., 2015).

2.2.4.2.1.2 Toxina pertussis genéticamente inactivada (PT_G)

De la modificación genética de PT resultan mutantes no tóxicos así como inmunogénicos y protectores en el modelo murino de reto intracerebral (Pizza y cols., 1989). Como se muestra en la figura 1, en comparación con PT_Q, la molécula PT_G mantiene sus propiedades antigénicas y adyuvantes intactas (Seubert y cols., 2014; Agnolon y cols., 2015). La inmunización de ratones con dosis entre 3 y 10 µg/ratón generan títulos máximos de Ac neutralizantes y confieren protección frente a la cepa letal *B. pertussis* BP18323, en modelo de reto intracerebral (Nencioni y cols., 1990).

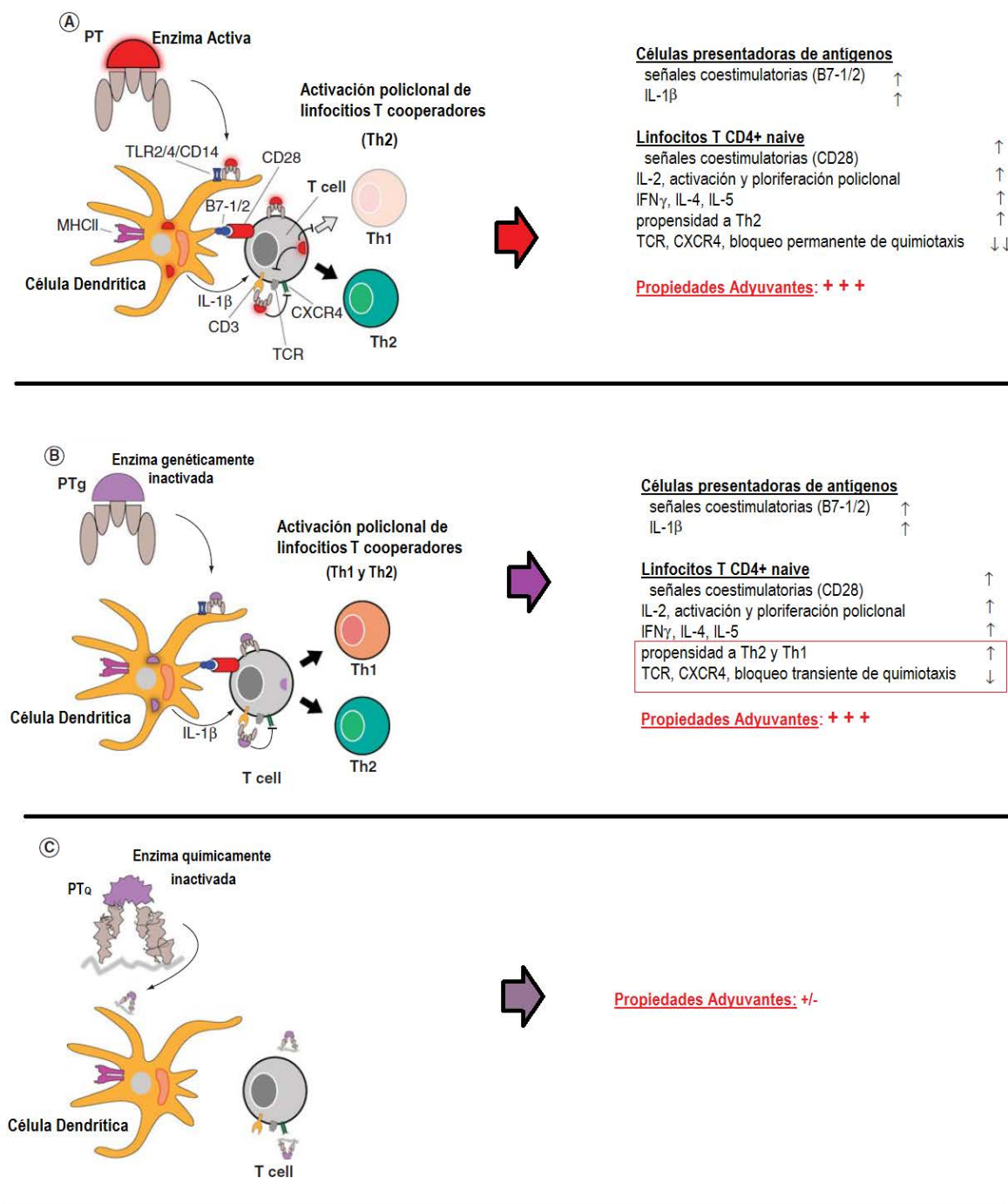


Figura 1. Simplificación de los mecanismos propuestos de la capacidad adyuvante y los eventos inducidos por: (A), enzima PT activa presente en la infección natural o como traza contaminante en las vacunas celulares o acelulares; (B) proteína PTg derivada de la inactivación genética de PT o (C) proteína PT_Q resultado de inactivación química de PT. Tanto PT como PTg unen las células diana y estimulan eficazmente la regulación positiva de moléculas coestimuladoras, la secreción de citoquinas y la activación de células T policlonales. La molécula PTg estimula además células Th1 y su efecto negativo sobre la migración linfocítica es transiente (enmarcado en rojo). En contraste el tratamiento con formaldehído interfiere en la unión y activación celular. Tomado de Seubert, A. y cols (2014) Expert Rev Vaccines 13(10): 1191-1204.

Al contrario de PT_Q, la proteína PTg es reconocida eficientemente por AcMs con actividad neutralizante (Ibsen, 1996). En modelos experimentales, los ratones inmunizados con preparaciones que contienen PTg resuelven más rápidamente la infección que los inmunizados con PT_Q (Mills y cols., 1998). Los títulos de Ac neutralizantes inducidos por PTg son 10 veces superiores a los estimulados por PT_Q (Agnolon y cols., 2015). En humanos, las vacunas que contienen PTg, FHA y Prn1 son seguras y más inmunogénicas en términos de títulos por µg de antígeno empleado, que las vacunas que contienen PT_Q, FHA y Prn1 (Edwards y cols., 1995). En un estudio clínico fase tres, entre los 17-24 meses, la eficacia de la vacuna compuesta por PTg, FHA y Prn1 fue superior (89 %) a la que contenía PT_Q, FHA y Prn1 (78 %) (Salmaso y cols., 1998). La combinación antigénica PTg, FHA, Prn2 no se ha estudiado.

2.2.4.2.2 Hemaglutinina filamentosa (FHA)

El factor FHA es codificado por el gen *fhaB* (Roy y Falkow, 1991). Es una proteína monomérica alargada con una longitud de 50 nm y un grosor promedio de 4 nm (Makhov y cols., 1994). El gen *fhaB* codifica para un precursor FHAB de 367 kDa, el cual es procesado para dar lugar al polipéptido FHA (220 kDa) que incluye los dos tercios próximos al extremo amino de FHAB (Domenighini y cols., 1990). En el tránsito del precursor (370 kDa) a través de la membrana plasmática interna interviene un mecanismo dependiente de Sec (Mazar y Cotter, 2007). Una vez en periplasma, se produce la secreción por la vía TPS (del inglés, *two-partner secretion system*), en la que interviene el dominio TPS-A ubicado en los primeros 245 aa de FHA y la proteína FHAC (TPS-B) (Delattre y cols., 2011). La proteína FHAC de 62 kDa reconoce a FHA a través de su extremo amino y por medio del dominio formador de poro en su extremo carboxilo la exporta a la superficie. Una vez en ella, el precursor FHAB es procesado por la proteasa SphB1 (Coutte y cols., 2001). Esta enzima corta aproximadamente un fragmento de 130 kDa del extremo carboxilo y como resultado se obtiene la FHA madura de 220 kDa (Delattre y cols., 2011).

,

En la membrana externa FHA queda orientada con el extremo carboxilo distal y cantidades substanciales se liberan al medio en cultivos *in vitro* (Locht, 2007). La estructura de la proteína FHA contiene numerosas hebras beta y giros (del inglés, *turns*), además de múltiples regiones formadas por 19 residuos repetidos en tándem, los cuales forman sucesivos “coils” en la hélice beta (Kajava y cols., 2001). La FHA madura tiene cuatro dominios de unión bien definidos: dominio RGD, dominio de unión a carbohidratos, dominio de unión a carbohidratos del tipo heparán sulfato y un dominio potencial de unión a integrinas. La molécula FHA une *in vitro* un amplio espectro de receptores como: glico-conjugados en las células epiteliales ciliadas; en macrófagos une glicol-conjugados, VLA-5 (del inglés *Very Late Antigen V*) y LRI/IAP (del inglés, *Leukocyte Response Integrin/Integrin Associated Protein*). Une además, glicolípidos sulfatados de células epiteliales ciliadas y no ciliadas (Guiso, 2015). La proteína FHA es protectora en ratones (Kimura y cols., 1990). Los anticuerpos anti-FHA bloquean la adhesión de *B. pertussis* a las células ciliadas de la tráquea (Helmy y cols., 1992). La proteína FHA está incluida en las vacunas acelulares que contienen dos o más componentes (Poolman y Hallander, 2007).

2.2.4.2.3 Pertactina (Prn)

La proteína Prn es un factor de virulencia que pertenece a la familia de los autotransportadores tipo I y es codificada por el gen *prnA*. Para su transporte a la superficie emplea una vía de secreción denominada tipo V, la cual se caracteriza por el autotransporte a través de la membrana externa (Henderson y cols., 1998). Los autotransportadores tienen un péptido señal de 34 aa en el extremo amino, seguido del dominio extracelular en el que residen las propiedades biológicas de pertactina y un dominio transportador de 250-300 residuos hacia el extremo carboxilo. El modelo más aceptado de la biogénesis de Prn propone que el precursor de 93 kDa da lugar a Prn y al transportador porina, con tallas moleculares de 69 kDa y 30 kDa, respectivamente; aunque en geles de poliacrilamida en presencia de SDS Prn migra a 70 kDa debido a la presencia de regiones ricas en prolina (Charles y cols., 1994). El péptido señal del precursor es reconocido por la maquinaria de secreción Sec, localizada en la membrana interna. Seguidamente, se produce un primer corte proteolítico que separa la señal de secreción del polipéptido, el cual se libera en el periplasma. Sucesivamente, el transportador se pliega y forma un barril β de 12 hebras antiparalelas que se inserta en la membrana externa. A través del canal formado ocurre la secreción del polipéptido. Durante la translocación la molécula permanece en un estado diferente al de su conformación final, plegándose progresivamente en la superficie, donde tiene lugar un segundo corte a nivel del extremo carboxilo que separa a Prn del transportador.

Una vez secretado, el dominio extracelular permanece asociado a la superficie de la bacteria mediante interacciones no covalentes (Henderson y cols., 2004). Esta asociación se debilita al aumentar la temperatura, por ello, *in vitro*, la pertactina puede ser liberada al medio de cultivo después de incubar una hora a 60 °C (Gould-Kostka y cols., 1990).

La estructura cristalográfica de Prn fue establecida para los primeros 539 aa a una resolución de 2.5 Å (Emsley y cols., 1996). La misma consiste en 16 hebras paralelas que giran a la derecha para formar una hélice tipo beta, cuya sección transversal semeja la forma de V. A partir del núcleo helicoidal se proyectan numerosos lazos (Figura 2). El lazo de la región variable R1 contiene el triplete RGD, motivo asociado con la función de adhesión (Leininger y cols., 1991).

La proteína Prn tiene propiedades de adhesina. En 1991 Leininger y cols observaron que Prn contribuía a la unión de células CHO (Leininger y cols., 1991). La entrada de *B. pertussis* a las células Hela y epiteliales, es inhibida por péptidos de Prn con el motivo RGD (Leininger y cols., 1992). Lo anterior indica que durante el proceso de unión y entrada de *B. pertussis* a las células diana, la secuencia RGD puede estar involucrada en la interacción con los receptores celulares. La proteína Prn contiene además, regiones ricas en prolinas, las cuales están presentes en proteínas involucradas en interacciones celulares en diferentes organismos (Emsley y cols., 1996).

El gen *prnA* es polimórfico y cuenta con 13 variantes designadas como *prnA1* hasta *prnA13* que codifican para Prn1 hasta Prn13 (Figura 3)(Mooi y cols., 2014). En *B. pertussis* las variaciones en Prn se restringen fundamentalmente a la región variable uno (R1) y la región variable dos (R2).

Estas regiones están formadas por secuencias repetidas en tándem de GGXXP y PQP respectivamente. La R1 se localiza en un lazo protuberante próximo al extremo amino y adyacente al motivo RGD ya mencionado, mientras que la R2 se ubica hacia el extremo carboxilo (King y cols., 2001; Hijnen y cols., 2004). Las R1 de Prn1 y Prn2 contienen ambos tipos de secuencias lo que supone una elevada reactividad cruzada entre ambas {Prn1 [R1 (GGAVP)₃(GGFGP)₂], Prn2 [R1 (GGAVP)₂(GGFGP)₄]}. Es oportuno subrayar, que solamente en sueros humanos se ha demostrado la existencia de Ac tipo específicos contra Prn1 y Prn2 (He y cols., 2003).

Los péptidos derivados de la R1 son inmunogénicos y protectores en el modelo murino de reto intranasal (Charles y cols., 1991; King y cols., 2001). La adición de Prn1 a las vacunas bicomponentes que contienen PT_Q y FHA, incrementa significativamente la protección en el modelo murino de reto intranasal (Guiso y cols., 1999). La adición de Prn2 a las vacunas no se ha estudiado.

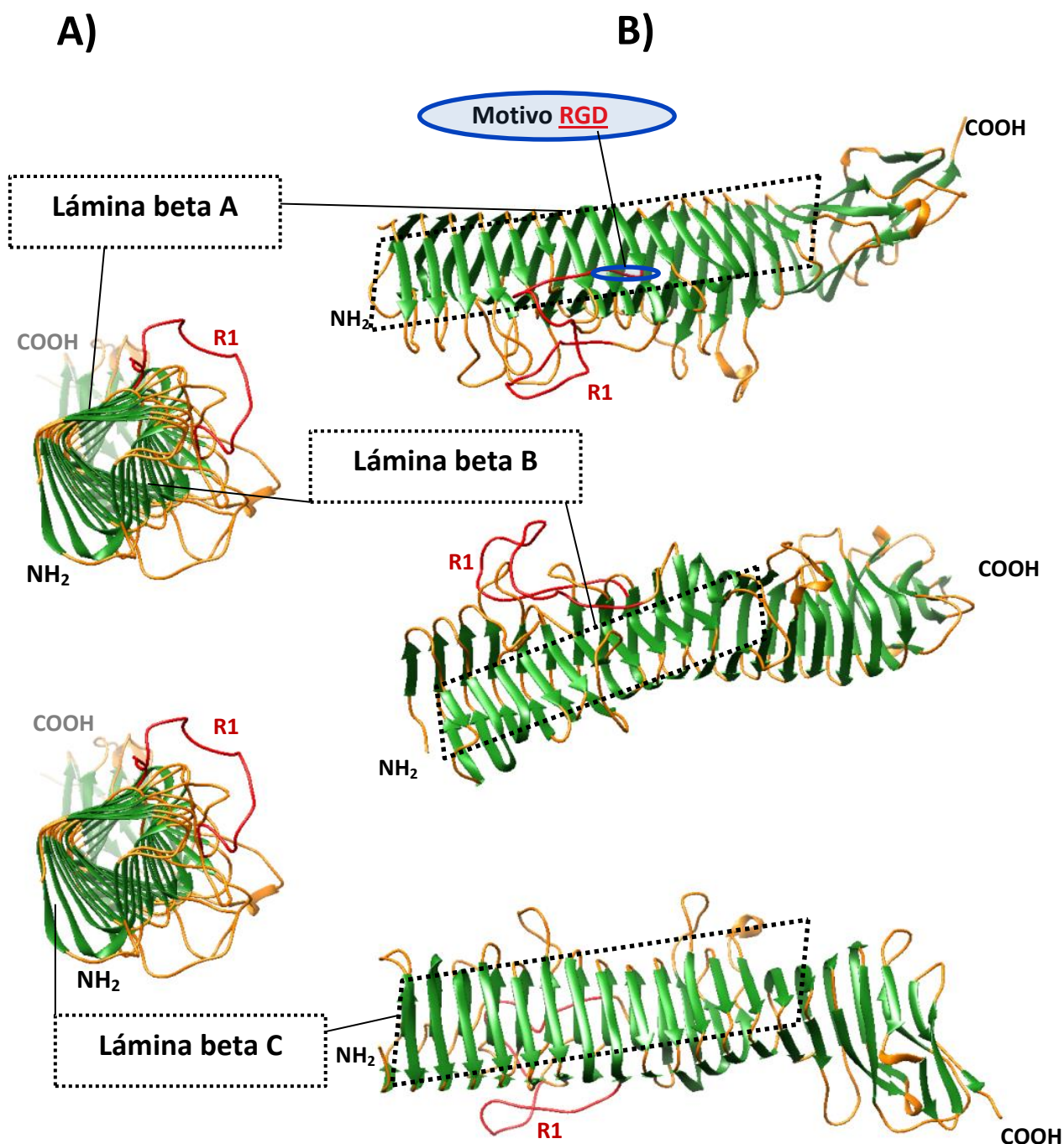


Figura 2. Representación en diagrama de cinta de la estructura tridimensional 1DAB.pdb de la proteína pertactina (Emsley y cols, 1996). **A)** Vista en sección transversal. Las hebras beta paralelas, en color verde, se disponen progresivamente en cada una de las caras A, B y C. Cada paso de la hélice beta consta de tres hebras beta dispuestas en forma de V. En amarillo se muestra las longitudes variables de los lazos de conexión. El lazo más largo, en rojo, constituye la región variable R1 **B)** Vista en sección longitudinal. Cada hebra beta se conecta a la siguiente por lazos longitud variable. Las hebras dan lugar a tres láminas beta A, B y C a lo largo de las tres caras de la hélice beta. Las hebras beta en cada lámina se orientan paralelas entre sí. El lazo R1 se extiende en la dirección del extremo amino, en su base se encuentra el motivo RGD. NH₂ y COOH, extremo amino y carboxilo, respectivamente.

infección se produce FIM2 y FIM3; en este contexto FIM2 es más inmunogénica que FIM3 (Gorringe y Vaughan, 2014).

2.3 Modelos animales experimentales

La tosferina típica de humanos es difícil de reproducir en animales de laboratorio. Los ratones, conejos, monos tití y monos cynomolgus no desarrollan la tos característica de la enfermedad (Guiso, 2015).

2.3.1 Ratones

El modelo murino ha sido útil para estudiar los principales factores de virulencia, sus efectos en la respuesta inmunitaria así como la función de diferentes receptores de células inmunes en el control de la infección. El modelo se utiliza para la estimación de la eficacia de las vacunas (van der Ark y cols., 2012). La duración de la infección respiratoria es consistente con la de los humanos y se observa una marcada linfocitosis, hipoglucemia e hiperinsulinemia (Pittman y cols., 1980). La respuesta humoral y celular es similar a la que se observa en los seres humanos. Los ratones se infectan tanto por inoculación intranasal como por la inhalación de aerosoles de *B. pertussis* (Guiso, 2015).

2.3.1.1 Ensayo de reto respiratorio con aerosoles

El ensayo exige tanto de áreas como de un equipamiento especializado para la inhalación por parte del animal del aerosol con el patógeno (Guiso y cols., 1999). Su precisión es similar al ensayo de reto intracerebral modificado (Xing y cols., 2014a).

2.3.1.2 Ensayo de reto intranasal

El modelo se utiliza en Europa en el control de la calidad de los lotes de vacunas acelulares ([Http://www.who.int/biologicals/en/](http://www.who.int/biologicals/en/)) (Guiso y cols., 1999). La prueba no se ha comparado entre laboratorios con el ensayo tradicional de potencia de Kendrick.

2.3.1.3 Ensayo de Kendrick

La potencia de las vacunas celulares se evalúa en el modelo intracerebral. El modelo se desarrolló por Kendrick y cols (Kendrick y cols., 1947) y constituye el estándar utilizado en todo el mundo para la evaluación de las vacunas celulares. Es el único ensayo en el que la potencia de las vacunas correlaciona con la protección de los niños en ensayos de campo (Standfast, 1958; Xing y cols., 2014c). En este ensayo se utiliza en el reto la cepa *B. pertussis* BP18323 la cual produce la variante de pertactina Prn6. La variante Prn6 posee una R1 muy similar a Prn1 (Figura 3, pág. 19)(Gaillard y cols., 2011).

2.3.1.4 Ensayo de reto intracerebral modificado

Una modificación del ensayo de Kendrick se utiliza en Japón, Corea del Sur y China entre otros países asiáticos, para evaluar la potencia de las vacunas acelulares. La modificación consiste en retar a los animales en la semana tres en lugar de la semana dos posterior a la inmunización. El ensayo se conoce abreviadamente como MICA (del inglés, *modified intra-cerebral challenge assay*). La precisión del modelo MICA (Xing y cols., 2014a) es similar a la observada para el ensayo de Kendrick (Xing y cols., 2001). La prueba está validada entre diferentes laboratorios para la evaluación de las vacunas acelulares que incluyen PT_Q (Gaines-Das y cols., 2009) y para preparaciones vacunales con PTg (Xing y cols., 2014a).

2.3.2 Monos

El modelo de mono babuino (*Papio anubis*) reproduce las manifestaciones clínicas de la tosferina humana, como la tos paroxística, producción de mucus y leucocitosis (Warfel y cols., 2012b). En este modelo, *B. pertussis* se transmite a través de pequeñas gotas en formas de aerosol, con una tasa de transmisión dependiente de la distancia entre los animales infectados. La transmisión requiere el contacto cercano o de una exposición prolongada (Warfel y cols., 2012a). El modelo se ha utilizado para estudiar la inmunidad inducida por las vacunas celulares, acelulares y la infección por *B. pertussis* (Warfel y cols., 2014; 2015).

2.4 Inmunidad inducida por *Bordetella pertussis*

La inmunidad inducida por *B. pertussis* se ha estudiado en los modelos de modelo de ratón y monos babuinos (Warfel y cols., 2014; Brummelman y cols., 2015). Se ha encontrado que la bacteria, al interactuar inicialmente con las células del epitelio nasofaríngeo, promueve la activación y reclutamiento inicial de células inmunes en el tracto respiratorio y posteriormente, la generación de la inmunidad adaptativa. Las células epiteliales, las células dendríticas mucosales del tracto respiratorio y los macrófagos alveolares constituyen la primera línea de defensa (Carbonetti y cols., 2007). Estas células, a través de los receptores PRR (del inglés, *pattern recognition receptors*), reconocen las moléculas de superficie de la bacteria conocidas como PAMPs (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*)(Nishida y cols., 2010). Como resultado de la interacción se produce la maduración y activación celular con la producción de citocinas y quimiocinas que median y regulan la respuesta inmune contra *B. pertussis*. Inicialmente, se produce el reclutamiento de las células dendríticas y los macrófagos, seguidamente se infiltran los neutrófilos y las células NK (Dunne y cols., 2010). En este complejo proceso se involucran además, entre otros mediadores celulares, los linfocitos. Las células T $\gamma\delta$

regulan la migración de los efectores innatos por medio de la producción de la interleucina IL-17i (innata). En el proceso de reclutamiento de los efectores, la IL-17 actúa a la vez con la quimiocina CXCL2 (MIP-2) secretada por las células epiteliales y los macrófagos activados (Zachariadis y cols., 2006). Las células NK secretan IFN- γ y asisten en la actividad antimicrobiana de los macrófagos y estimulan el desarrollo de la respuesta Th1 (Byrne y cols., 2004). Los neutrófilos y macrófagos activados participan en la fagocitosis mediada por Ac inducidos primariamente y en la muerte intracelular de *B. pertussis* (Eby y cols., 2014). Las moléculas PT y LOS estimulan la producción de IFN- γ e IL-12 que intervienen en el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 (Higgins y cols., 2003). La proteína ACT promueve la producción de IL-1 β que junto con IL-23 contribuyen a la expansión de la población de células Th17 (Dunne y cols., 2010). Las células dendríticas activadas migran entonces a los ganglios linfáticos y presentan allí los antígenos procesados a las células T vírgenes, que una vez activadas, proliferan, se diferencian en células Th1 y Th17 y migran a los pulmones para activar más neutrófilos y macrófagos por medio de la producción de IFN- γ e IL-17, respectivamente. Los linfocitos TH1 y Th17 desempeñan una función crucial en la protección contra *B. pertussis* en ratones (Ross y cols., 2013). Las células B activadas se diferencian en células plasmáticas que producen anticuerpos específicos del tipo IgA e IgG2a (ratón). Concentraciones significativas de estos Ac se detectan solo después que el patógeno ha sido eliminado de los nichos de infección (Kirimanjeswara y cols., 2003); por lo que la inmunidad humoral de inducción primaria pudiera, inicialmente, desempeñar una función auxiliar. Por último, una pequeña fracción de las células T y B se convierten en células de memoria, las cuales proporcionan una protección más eficaz contra una eventual reinfección.

Después de una infección natural, el 85 % de las personas convalecientes desarrollan títulos de Ac contra PT, único antígeno específico de *B. pertussis*. Ni el tipo de Ac, ni su concentración, ni la inmunidad mediada por células, correlacionan con la protección clínica (WHO, 2015).

Concurrente al desarrollo de la respuesta inmunitaria, el patógeno activa mecanismos inmunes para evadir la respuesta inmune del hospedero. La duración de la inmunidad inducida por *B. pertussis* como resultado de una infección natural puede variar de 4 a 20 años (Wendelboe y cols., 2005); por ello se observan varias reinfecciones sintomáticas durante la existencia de una persona (WHO, 2015).

2.4.1 Mecanismos de evasión del sistema inmunológico

El patógeno, mediante la variación genética de sus factores de virulencia y la acción directa de estos sobre el sistema inmunitario innato y adaptativo, puede infectar el hospedero, sobrevivir, multiplicarse y

perpetuarse en poblaciones humanas. Los factores PT y ACT contribuyen a la supervivencia del patógeno. Ambas toxinas elevan las concentraciones intracelulares de AMP cíclico y afectan la transducción de señales y las funciones de diversos tipos de células, entre ellas, las del sistema inmunológico (Mills, 2001). PT interfiere con la migración de los neutrófilos, los cuales pueden destruir directamente la bacteria (Carbonetti y cols., 2003). Ambas moléculas actúan sinérgicamente, PT detiene el influjo de neutrófilos mientras que la ACT los intoxica (Carbonetti y cols., 2005). Esta última es el factor responsable de la muerte de macrófagos por apoptosis (Khelef y Guiso, 1995).

La proteína PT, además de interferir con el sistema inmunológico innato, obstaculiza las señales que promueven la división celular y la supervivencia de células B *in vitro*, lo que resulta en una disminución acelerada del número de células vivas (Lyons, 1997) y la supresión de la respuesta de Ac *in vivo* (Carbonetti y cols., 2004). La incubación previa de linfocitos T con PT, inhabilita a estos en su capacidad de regresar al linfonodo a través de la vena endotelial alta (Phillips y Ager, 2002). La molécula PT induce inmunosupresión al activar las moléculas implicadas en la transducción de señales asociadas al receptor de células T (Higgs y cols., 2012).

Otra toxina importante es TCT, un tetrapéptido disacarídico derivado del péptido glicano de la pared celular. Por si sola, la TCT reproduce la citopatología de la enfermedad pertussis (Goldman y cols., 1982). Esta toxina, al actuar sinérgicamente con la endotoxina LPS/LOS incrementa la producción de la enzima inducible óxido nítrico sintasa tipo II. En consecuencia, se elevan las concentraciones de radicales libres altamente tóxicos en las células epiteliales ciliadas, las cuales mueren y por tanto se destruye el epitelio respiratorio. El compuesto TCT induce además, la producción de IL-1 α , la cual interviene como mediador central en este proceso (Locht, 2007).

La proteína FHA tiene complejas funciones inmunorreguladoras. Esta molécula previene la migración de neutrófilos y el reclutamiento de leucocitos (Rozdzinski y cols., 1995a; Rozdzinski y cols., 1995b). Durante la infección de monocitos, FHA media la inhibición de la proliferación de células T CD4⁺, en un mecanismo dependiente de antígeno (Boschwitz y cols., 1997). En el modelo de ratón, FHA induce la expresión de IL-6 e IL-10 en monocitos y suprime las concentraciones de IL-12 y IFN- γ en el suero, efecto que pudiera facilitar la supervivencia intracelular de *B. pertussis* en monocitos al interferir con la respuesta T celular (McGuirk y Mills, 2000). Las proteínas FHA y Prn1 poseen la capacidad de activar células T reguladoras productoras de IL-10, las cuales pueden suprimir la actividad Th1 auxiliadora de clones específicos involucrados en la respuesta protectora (McGuirk y cols., 2002).

El gen *fhaB* es altamente conservado en *Bordetella* y ha mostrado ser intercambiable entre las especies de *B. pertussis* y *B. brochiseptica*. El precursor FHAB ejerce una función de virulencia *in vivo* que impide que la bacteria sea eliminada por la respuesta innata temprana. Por otro lado, la FHA madura junto con la proteína FIM suprimen la respuesta inflamatoria inducida al comienzo de la infección (Melvin y cols., 2015; Scheller y Cotter, 2015; Scheller y cols., 2015).

El patógeno *B. pertussis* resiste la actividad bactericida que media la vía clásica del complemento (Rambow y cols., 1998). En la resistencia interviene el autotransportador BrkA, el cual impide la deposición de los factores C4, C3 y C9 en la membrana celular (Barnes y Weiss, 2001). Otro autotransportador, el Vag8, es capaz de unir la molécula humana C1inh (del inglés, *C1 esterase inhibitor factor*) en una forma dependiente de la dosis y media en la resistencia a la actividad bactericida del suero (Marr y cols., 2011).

La variación genética le permite al patógeno retardar la generación de una respuesta inmune efectiva contra los factores de virulencia y regular sus niveles de expresión. El promotor *ptxP*, que regula la expresión de PT, exhibe un alto grado de polimorfismo (Mooi y cols., 2009). Existen catorce alelos para *ptxP*, lo que hace a este elemento genético el más polimórfico de *B. pertussis*. La reemergencia de pertussis también se asocia con la aparición de cepas con el alelo *ptxP3*. Este promotor es 1.6 veces más fuerte que el *ptxP1* y se postula que al aumentar las concentraciones de PT se podría potenciar la actividad inmunosupresora de PT (Mooi, 2010). De las cinco subunidades de PT, la subunidad A o catalítica es la más inmunogénica y también la más polimórfica. Los cambios puntuales en epitopos B de esta subunidad impiden la unión de anticuerpos protectores y no de otros Ac (Bartoloni y cols., 1988). Un fenómeno similar sucede con los epitopos T (De Magistris y cols., 1991).

Las variaciones antigénicas en el oligómero B (*ptxB1* y *ptxB2*) resultan en diferencias funcionales *in vivo*. En ratones, la variante PtxB2 es más efectiva en inducir linfocitosis (Millen y cols., 2015).

La variación de fase para los genes *fim*, al igual que el control a nivel transcripcional de las concentraciones de FIM expresada, le permiten al microorganismo evadir la respuesta inmune. Ello se evidencia en el empleo de vacunas que incluyen FIM, las cuales modifican la prevalencia de los serotipos circulantes con el predominio de cepas FIM3 (Poolman y Hallander, 2007).

En *Bordetella*, los lazos en la proteína Prn desempeñan una función importante en la evasión de la respuesta inmune. La modificación de estos lazos mediante mutagénesis sitio específica aumenta o disminuye la capacidad de unión de diferentes AcM, lo que sugiere que los lazos son relevantes para la

evasión de la respuesta inmune y además para el balance estructural de Prn (Hijnen y cols., 2007b). En ratones, en un modelo de reto intranasal se comprobó que las cepas Prn2 pueden evadir la inmunidad inducida por la vacuna celular (Prn1) utilizada en Holanda (King y cols., 2001). En otro estudio, con el uso de cepas de *B. pertussis* isogénicas, se demostró que el genotipo *ptxA1/prn2* coloniza más efectivamente ratones inmunizados con la vacuna acelular (Prn1) utilizada en Japón, respecto al genotipo *ptxA2/prn1* (Komatsu y cols., 2010). Sin embargo, solamente en sueros humanos se ha demostrado la existencia de Ac tipo específicos contra Prn1 y Prn2 (He y cols., 2003), elemento que dificulta en los modelos experimentales definir la combinación antigénica más ventajosa para su evaluación en humanos.

2.5 Las vacunas contra *Bordetella pertussis*

El uso de las vacunas DTPc ha prevenido millones de muertes en todo el mundo (WHO, 2015). Sin embargo, décadas atrás, a pesar de ser vacunas seguras y eficaces fueron rechazadas por la opinión pública, debido a, entre otros factores, la ocurrencia de efectos adversos severos (Mattoo y Cherry, 2005). En consecuencia, se impulsó el desarrollo de vacunas DTPa, menos reactogénicas (Grimprel y Begue, 1995). Algunos países, fundamentalmente los denominados países de altos ingresos, han reemplazado las vacunas DTPc por las vacunas DTPa. Ambos tipos de vacunas se producen en combinación con otros antígenos como los toxoides de difteria y tétanos, entre otros, para dar lugar a vacunas combinadas de tres o más valencias, en función de los componentes patógeno específicos presentes en la formulación (Skibinski y cols., 2011). Hasta la fecha no se comercializan vacunas exclusivas contra la tosferina.

La comparación de la eficacia y la efectividad de las diferentes vacunas es compleja debido a la multiplicidad de productores que usan disímiles cepas, así como la existencia de más de 80 tipos diferentes de esquemas de vacunación en el mundo, con una cobertura global igual o superior al 86 % (WHO, 2015).

De forma general, las insuficiencias de las vacunas de pertussis radican en que confieren una inmunidad de limitada duración, son incapaces de evitar la transmisión y los efectos adversos aumentan con el número de dosis aplicadas (Locht, 2007).

2.5.1 Las vacunas celulares contra *Bordetella pertussis*

Las vacunas celulares de pertussis DTPc son formulaciones de células muertas adsorbidas a sales de alúmina. La inactivación de la bacteria se realiza tanto por métodos físicos como químicos (Gupta y cols.,

1988). Como grupo, son vacunas bastante heterogéneas y en su composición difieren en el nivel de impurezas como LOS, los cuales influyen en la reactogenicidad y grado de eficacia (Locht, 2007).

Las variaciones pueden deberse a los diferentes métodos de producción como por ejemplo el proceso de fermentación empleado (Relyveld y cols., 1991) y los métodos de inactivación (Gupta y cols., 1988).

Las vacunas DTPc se desarrollaron en los años 1930 y a mediados de 1940 se introdujo ampliamente en la práctica clínica en Estados Unidos como vacunas combinadas DTP (Mattoo y Cherry, 2005). Las vacunas celulares DTP actuales difieren muy poco de las desarrolladas originalmente.

En 1964 se estableció un estándar internacional para la evaluación de la potencia de las vacunas celulares (Kendrick, acápite 2.3.1.3). En el modelo, el marcador de más alta correlación con la supervivencia de los ratones lo constituye la concentración de óxido nítrico producido por macrófagos (Xing y cols., 1998). Las vacunas DTP varían considerablemente en cuanto a la inducción de Ac específicos contra los antígenos de valor protector (Edwards y cols., 1991; Steinhoff y cols., 1995), y en general, tienden a un patrón Th1/Th17 y la inducción de Ac opsonizantes (Xing y cols., 1998; Corbel y cols., 2004; Brummelman y cols., 2015; Warfel y cols., 2015).

La mayoría de las vacunas celulares comercialmente disponibles no se estudiaron en ensayos de eficacia (Locht, 2007). No obstante, los estudios clínicos realizados muestran valores de protección entre 70 % y 80 % (Broome y Fraser, 1981; Onorato y cols., 1992) y en dependencia de la definición de caso empleada, los valores pueden oscilar entre 64 % y 96 % (Mattoo y Cherry, 2005). Estas variaciones porcentuales se explican por la heterogeneidad de las vacunas. En general, al estudiar los datos disponibles mediante métodos de meta-análisis, la eficacia global calculada es de 78 % y considerablemente superior al placebo (Jefferson y cols., 2003).

Se desconoce la eficacia de las vacunas celulares en poblaciones de adolescentes y adultos. Su uso en estas edades no se recomienda por las instituciones de salud (WHO, 2015). Las vacunas celulares producen enrojecimiento, hinchazón y dolor en el sitio de la inoculación. Fiebre y otros síntomas sistémicos leves son también frecuentes. Las reacciones severas como convulsiones y episodios de hiporrespuesta-hipotónica ocurren en 1 caso cada 1750 dosis administradas. La encefalopatía ocurre en 0-10,5 casos por cada millón de dosis administradas (Mattoo y Cherry, 2005).

En niños vacunados, los títulos más bajos de IgG anti-PT se asocian al alelo menor del promotor del gen codificante para TLR4 (Banus y cols., 2007). El binomio receptor TLR4/molécula LOS está implicado en la eficacia de la vacuna (Banus y cols., 2008). En el modelo de monos babuinos las vacunas DTP no

previenen la colonización nasofaríngea lo que sugiere que permiten la transmisión de la bacteria, aunque en menor medida en comparación con las vacunas acelulares (Warfel y cols., 2014).

Las vacunas acelulares están asociadas a un número considerablemente inferior de eventos adversos pero son más costosas. Las vacunas DTP se producen por productores locales, a muy bajo costo y son comercializadas fácilmente en el mercado local o internacional. Por esta razón son utilizadas actualmente en muchos programas de inmunización global (WHO, 2015).

2.5.2 Las vacunas acelulares contra *Bordetella pertussis*

Las vacunas acelulares (DTPa) contienen componentes purificados e inactivados de la bacteria. Las vacunas comerciales incluyen entre uno y cinco antígenos diferentes: 1) PT_Q, 2) FHA, 3) Prn1, 4) FIM2 y 5) FIM3 (Poolman y Hallander, 2007). Su composición difiere en el número y la concentración de los antígenos incluidos en la formulación. Todas las vacunas contienen la PT_Q (van den Biggelaar y Poolman, 2016). Las vacunas que contienen dos o más componentes incluyen PT_Q y la proteína FHA y en las de tres o más está presente la proteína Prn1. Las vacunas con cinco componentes incluyen los antígenos FIM2 y FIM3 (Poolman y Hallander, 2007).

Basado en la inmunogenicidad de PT y su valor protector, algunos autores consideran que las vacunas mono componentes (basadas únicamente en PT_Q como antígeno de pertussis) son suficientes para el control de pertussis, estas pueden alcanzar una eficacia de 70 % (Robbins y cols., 2005). Este porcentaje se incrementa con la adición a las formulaciones de FHA y Prn. Los estudios con vacunas de tres y cinco componentes muestran un rango de eficacia entre 80 % y 85 % (eficacia en niños vacunados respecto a no vacunados) con intervalos de confianza superpuestos (Edwards y cols., 1995; WHO, 2015). Otros estudios muestran que las vacunas de tres componentes inducen una respuesta inmune protectora de mayor duración respecto a las de cinco componentes (Olin y cols., 2003 3824; Gustafsson y cols., 2006 730).

En el modelo murino, las vacunas acelulares promueven una respuesta inmune con un patrón mixto Th1/Th2, con la inducción de Ac mayormente del tipo IgG1 (Brummelman y cols., 2015).

La inducción de la respuesta de Ac por las vacunas DTPa también puede afectarse por el polimorfismo del receptor TLR4. Los menores títulos de Ac contra PT, FHA y Prn se encuentran en individuos con una mutación en el receptor TLR4, en la que el aminoácido aspártico se ha sustituido por glicina en la posición 299 del dominio extracelular (Grondahl-Yli-Hannuksela y cols., 2012).

2.5.2.1 Vacunas acelulares triples licenciadas contra la tosferina

En la tabla 1 se muestran las principales vacunas acelulares triples licenciadas. Las vacunas ACCEL-IMUNE (*Lederle Laboratories*) y Tripedia (*Aventis Pasteur, Inc.*) se destinaron para las dosis de refuerzo cuarta y quinta (CDC, 1992b; a). Posteriormente, en 1996, Infanrix (*SmithKline Beecham Biologicals*) y Certiva (*North American Vaccine, Inc.*) se licenciaron para administrar las series primarias de inmunización a los 2, 4, 6 y 18 meses (CDC, 1997). En octubre del año 2000 se licenciaron ACCEL-IMUNE y Tripedia para administrar la serie primaria con cinco dosis (CDC, 2000).

En el año 2005 se licenciaron dos nuevas vacunas (Adacel™ y Boostrix®) con cantidades reducidas de los componentes de pertussis, toxoides de tétanos y difteria, abreviadas como Tdap. Boostrix® se licenció en Mayo, 2005 para ser usada como dosis (única) de refuerzo en personas entre 11 y 18 años. Por su parte Adacel® se licenció en Junio, 2005 como dosis (única) de refuerzo para personas entre 11 y 64 años (2006). Adacel está licenciada también como Triaxis® y Covaxis®. Estas son las vacunas comercialmente disponibles hasta la actualidad. Son vacunas en las cuales el componente PT es inactivado con aldehídos.

La vacuna Triacelluvax de Chiron Biocine se retiró del mercado en 1997 por conflictos de propiedad intelectual y competencia entre compañías. Es la única vacuna conocida con el componente PT inactivado genéticamente que completó estudios clínicos fase tres (Matheson y Goa, 2000). Esta vacuna mostró tener una mayor efectividad en el control de *B. pertussis* que su control basado en PT_Q, al evaluar la fase tardía (entre 17-24 meses posterior a la tercera dosis) (Seubert y cols., 2014).

2.5.2.2 Procedimientos utilizados en la obtención de los antígenos PT, FHA y Prn1 incluidos en las vacunas acelulares

En la literatura consultada no se describe un procedimiento para la obtención integrada de PT, FHA y Prn1. La proteína PT se obtuvo al procesar el sobrenadante de cultivo por dos pasos cromatográficos sucesivos mediante la cromatografía de Affi-Gel Blue y de afinidad a la fetuina (Sekura y cols., 1983). En la purificación de PT también se utilizó la cromatografía basada en geles de hidroxapatita seguida de la de afinidad a la fetuina, (Ju y cols., 1997). De forma individual, las proteínas PT y FHA se purificaron mediante la cromatografía de intercambio catiónico y a continuación la de exclusión molecular (Wu y cols., 2008) y además, mediante la cromatografía de hidrofobicidad seguida de la de afinidad a la fetuina (Skelton y Wong, 1990).

Tabla 1. Principales características de las vacunas acelulares triples (DTPa o dTpa)

Nombre Comercial	Eficacia % (IC), País del Ensayo Clínico, Año	Antígenos (µg/dosis)						Adyuvante	Aplicación	Referencia
		PT	FHA	PRN	FIM	D	T			
ACEL-IMMUNE	83 (76-88) Alemania, 1998	3.5 A	35	2	0.8 (FIM2)	9	5	Hidróxido de aluminio	Dosis 4ta y 5ta	Stein, K. y cols (1998) Pediatrics 101(1 Pt 1): 1-11.
TRIPEDIA SP	81 (61-90), Suecia, 1986	23.4 A	23			7	5	Hidróxido de aluminio	Dosis 4ta y 5ta	Olin, P. y cols (1998) Dev Biol Stand 95: 211-220.
INFANRIX GSK	84 (76-89), Italia, 1996	25 A	25	8		25	10	Hidróxido de aluminio	Serie primaria	Greco, D. y cols (1996) N Engl J Med 334(6): 341-348.
DAPTACEL SP	85(80-89) / Suecia 1992	10 A	5	3	5	15	5	Fosfato de aluminio	Serie primaria	Gustafsson, L. y cols (1996) N Engl J Med 334(6): 349-355.
Certiva TM, Baxter	75 (53-87), Suecia, 1986	40 P				15	6	Hidróxido de aluminio	Serie primaria	Blackwelder, W.C. y cols (1991) Am J Dis Child 145(11): 1285-1289.
ADACEL SP	***	2.5 A	5	3	5	2	5	Fosfato de aluminio	Dosis refuerzo	Riedinger, H.B. (2005). S D J Med 58(8): 309-310.
BOOSTRIX GSK	***	8 A	8	2.5		3	5	Hidróxido de aluminio	Dosis refuerzo	Riedinger, H.B. (2005). S D J Med 58(8): 309-310.
Triacelluvax Chiron Biocine (Actualmente GSK)	84(76-90) / Italia / 1996	5 G	2.5	2.5		25	10	Hidróxido de aluminio	Serie primaria	Greco, D. y cols (1996) N Engl J Med 334(6): 341-348.
SP: Sanofi Pasteur GSK: Glaxo SmithKline Beecham En rojo vacunas licenciadas para dosis de refuerzo (dtpa)	IC: Intervalo de Confianza ***: La eficacia se infiere por comparación de los títulos de anticuerpos con las vacunas Daptacel e Infanrix, respectivamente (http://www.fda.gov)	PT: Toxina pertussis inactivada por A, aldehídos; P, peróxido de hidrógeno; G, genéticamente FHA: Fitohemaglutinina Filamentosa Prn: Pertactina tipo 1 o 7 FIM: Fimbria, Fim2 + Fim3 Lf: Límite de floculación D: Toxide de la Difteria T: Toxide del Tétano						Dosis 4ta y 5ta: a los 18 meses de nacido y antes de entrar a la escuela 5-6 años, respectivamente. Serie primaria: 2, 4, 6, y 18 meses de nacido Dosis de refuerzo: para adolescentes (10-18 años) y adultos (19-64 años)		

De igual forma, la purificación individual de PT y FHA se consiguió al fraccionar ambos antígenos del sobrenadante mediante la precipitación por sulfato de amonio y posteriormente un paso cromatográfico de intercambio catiónico (Ozcengiz y cols., 2004). Por otro lado, la proteína Prn1 se purificó a partir del sobrenadante de extracción, derivado de calentar a 60 °C el cultivo celular (Gould-Kostka y cols., 1990). Para pertactina (Prn1), en todos los reportes descritos se han utilizado dos pasos cromatográficos sucesivos para el procesamiento del sobrenadante de extracción. Gould-Kostka utilizó la cromatografía de intercambio catiónico (DEAE-sefariosa) seguida de Affi-Gel Blue (Gould-Kostka y cols., 1990). Por otra parte, Li y cols utilizaron un intercambiador aniónico y posteriormente uno catiónico para obtener la proteína Prn1 (Li y cols., 2016).

2.5.3 Duración de la inmunidad adquirida por vacunación

La protección conferida por la vacunación con vacunas celulares decae en el tiempo y resulta en poca o ninguna a los 4-12 años posterior a la última dosis aplicada (Sheridan y cols., 2014). La caída porcentual anual de la inmunidad varía entre el 2 % y el 13 % (WHO, 2015). En Australia, el análisis de la incidencia de la enfermedad pertussis en niños inmunizados con vacunas celulares, acelulares o con esquemas que incluyeron la combinación de ambos tipos, mostró una mayor incidencia asociada a aquellos que recibieron alguna vez la vacuna acelular (Sheridan y cols., 2015). Las vacunas acelulares poseen una efectividad ≥ 55 % después de la primera dosis y ≥ 83 % después de la tercera dosis. Posteriormente, la efectividad declina a 59 % entre los 3 y 4 años (Quinn y cols., 2014). A partir de estos datos es posible inferir la necesidad de introducir estrategias de vacunación que refuercen la inmunidad en niños, adolescentes y adultos, quienes pueden transmitir la bacteria a infantes susceptibles. Actualmente esta práctica puede ser abordada con vacunas acelulares.

2.5.4 Estrategias de vacunación actuales

En los últimos 10 años más del 80 % de las muertes por pertussis han ocurrido en neonatos o infantes con edades inferiores a los tres meses (Prevention., 2015). Para evitar las muertes en estas edades se recomienda la inmunización de las madres a partir del tercer trimestre de gestación (Prevention., 2013). Un estudio clínico controlado y a doble ciegas muestra que la administración de una dosis de la vacuna Adacel en el tercer trimestre de embarazo es segura, permite títulos elevados de IgG materna en los neonatos, los cuales perduran hasta los dos meses, y no altera sustancialmente la respuesta del infante durante el periodo en el que se administra la serie primaria con la vacuna acelular Pentacel (Munoz y cols., 2014).

Estudios de cohortes apoyan también la seguridad y efectividad (ausencia de casos) de esta estrategia en comunidades con una alta incidencia de la enfermedad (Walls y cols., 2016). Además, la práctica es recomendable porque la inmunización de la madre gestante produce un incremento significativo de Ac específicos (IgG e IgA) en la leche materna (Abu Raya y cols., 2014). La inmunización de las madres gestantes muestra mejores indicadores de costo-efectividad que la estrategia de capullo, la cual se basa en la inmunización selectiva de los contactos cercanos a los neonatos (Forsyth y cols., 2015).

Otras estrategias tales como la aplicación de dosis de refuerzos en adolescentes y adultos así como la vacunación universal de los adultos pueden contribuir en el futuro a disminuir la incidencia en niños menores de 3 meses. Se estima que la inmunización universal de adultos mayores de 65 años podría evitar en EE.UU 97 000 casos anuales, de los cuales más de 5 000 serían infantes (McGarry y cols., 2014).

2.5.5 Cambios en la epidemiología de la enfermedad posterior a la introducción de las vacunas

Inicialmente, las vacunas celulares se administraron en diversas regiones del mundo con programas y estrategias dirigidos a inmunizar la población de infantes, práctica conocida como inmunización primaria. Los esquemas de vacunación implementados fueron de 3, 4 y 5 meses de edad, o 2, 4 y 6 meses o 3 y 5 meses, con una inmunización de refuerzo a los dos años de edad para las dos primeras estrategias y al año para la tercera. No mucho después, se comprobó una disminución significativa de la mortalidad y la morbilidad en las regiones donde los programas de vacunación se ejecutaron con una cobertura superior al 90 % (2010; Zepp y cols., 2011).

Las vacunas celulares utilizadas causaron efectos secundarios con diferentes grados de severidad. Debido a esto, algunos países decidieron interrumpir sus programas, en otros la vacunación continuó pero decreció el porcentaje de cobertura y en un tercer grupo de países, la cobertura de vacunación continúa siendo alta. Años más tarde, la incidencia de la enfermedad aumentó sustancialmente en los países que renunciaron a sus programas de inmunización, lo que resultó en incrementos considerables en índices de morbilidad y mortalidad. Algunos países reintrodujeron la vacunación después de una década y otros no lo hicieron. (Guiso, 2015).

En las regiones donde se administraron vacunas celulares de alta eficacia y con coberturas ≥ 90 % se observó un cambio en el modelo de transmisión de la tosferina. Antes de introducir las vacunas, la tosferina incidía mayormente en niños con edades entre 5-7 años. Los niños convalecientes permanecían protegidos por periodos entre 12-20 años. Con el transcurso del tiempo la inmunidad de

los adolescentes y adultos inmunes podía ser reestimulada por el contacto con niños infectados. Este comportamiento epidemiológico protegió la mayoría de los infantes, quienes adquirían la inmunidad pasivamente de madres inmunes y por tanto existía una probabilidad baja de contraer la enfermedad de familiares inmunizados o estimulados repetidamente de manera natural (Hewlett y Edwards, 2005).

Con posterioridad a la introducción de las vacunas, los índices de mortalidad y morbilidad disminuyeron significativamente. Sin embargo, de forma inesperada aumentaron los casos de infantes infectados generalmente por hermanos mayores o sus padres (Edwards, 2005). La transmisión niño a niño evolucionó hacia un modelo en el que los adolescentes/adultos con una inmunidad disminuida se infectan y contagian a los infantes no inmunes (Zepp y cols., 2011). Estas observaciones confirmaron estudios anteriores que sugirieron que tanto la inmunidad natural como la adquirida por vacunas tiene una duración entre cuatro y doce años (Wendelboe y cols., 2005).

2.5.6 Cambios en *Bordetella pertussis* posterior a la introducción de las vacunas

En la década de 1990 se informó que las cepas que circulaban en Europa eran diferentes de las cepas utilizadas en las vacunas (Mooi FR y cols., 2007). En la medida que las poblaciones de *B. pertussis* cambiaron genética y fenotípicamente, la diversidad de los aislados clínicos circulantes disminuyó respecto al periodo anterior al uso de las vacunas (Bouchez y cols., 2008). Las variaciones genéticas tales como SNPs (del inglés, *single nucleotide polymorphism*) o las variaciones en repeticiones cortas se encuentran en los genes que codifican para los factores de virulencia PT y Prn, FIM y Tcf (Mooi, 2010) y no en aquellos que codifican para LPS/LOS (Albitar-Nehme y cols., 2013) o la ACT (Chenal-Francisque y cols., 2009). En la década de 1990, en las regiones con una cobertura de vacunación alta, se aislaron de niños infectados, cepas con el alelo *ptxP3* del promotor del gen de PT (Mooi, 2010). La severidad de la tosferina en niños se asocia significativamente con el genotipo *ptxP3* (Clarke y cols., 2015). El alelo *ptxP3* predomina en la mayoría de los aislados de los países de Europa (van Gent y cols., 2015).

A partir de estas observaciones, algunos autores plantean que la inmunidad de rebaño inducida por el uso extensivo de las vacunas acelulares, las cuales direccionan la inmunidad a unos pocos factores de virulencia, favorece la circulación de cepas que no producen los antígenos de la vacuna (Guiso, 2009). No obstante, los aislados clínicos que no sintetizan los antígenos presentes en las vacunas acelulares se describen desde antes de la introducción de estas (Stefanelli y cols., 2009; Hegerle y cols., 2012).

Las cepas que no producen pertactina (Prn-) se aíslan en diferentes países como Estados Unidos (Pawloski y cols., 2014), Israel (Bamberger y cols., 2015), Australia (Lam y cols., 2014), Japón (Otsuka y

cols., 2012), Canadá (Tsang y cols., 2014) y en seis países de Europa (Zeddeman y cols., 2014). Los síntomas clínicos de las cepas Prn- son similares a los asociados con los aislados que producen Prn (Bodilis y Guiso, 2013).

2.5.7 Desarrollo de nuevas vacunas y adyuvantes contra *Bordetella pertussis*

Se postula que el aumento de la incidencia se debe a que las vacunas celulares o acelulares actuales inducen un nivel de inmunidad protectora de limitada duración frente a las cepas emergentes de *B. pertussis* (Mooi y cols., 2015). En consecuencia se necesitan vacunas que induzcan Ac de mayor calidad protectora, que generen una inmunidad efectiva de mayor duración, con una eficacia igual o superior a las vacunas en uso y lógicamente deseable también, que contribuyan a que la incidencia de efectos adversos sea cada vez menor (Salim y cols., 2015).

A partir de considerar evidencias recientes que sugieren que las vacunas celulares tienden a tener una eficacia más robusta frente a los cambios evolutivos del patógeno, se desarrollan estrategias dirigidas a obtener nuevas vacunas celulares. Una de ellas se basa en la obtención de un candidato menos reactogénico como resultado de remover las moléculas de LOS por extracción con agua-butanol (Dias y cols., 2013). Otros grupos intentan mejorar las vacunas acelulares con el uso de vesículas de la membrana externa de la bacteria (Fernandez y cols., 2013; Ormazabal y cols., 2014). Las preparaciones vacunales desarrolladas mediante ambas estrategias confieren protección en ratón pero aún deben realizarse los estudios de seguridad y eficacia en humanos. Respecto a la aceptación pública, es probable que los países que han utilizado vacunas acelulares por largos periodos accedan a incorporar nuevas vacunas, si estas se basan en mejoras de las vacunas acelulares ya establecidas (van den Biggelaar y Poolman, 2016).

Las vacunas acelulares pueden mejorarse mediante la adición de nuevos antígenos así como la incorporación de nuevos adyuvantes a sus formulaciones. En los próximos años se prevé la realización de estudios clínicos con vacunas acelulares con los toxoides PT y ACT obtenidos por manipulación genética (Sebo y cols., 2014; Seubert y cols., 2014). La incorporación de otros factores como el autotransportador Vag8 (de Gouw y cols., 2014a) y las proteínas IRP 1–3 y AfuA (Alvarez Hayes y cols., 2013) se encuentran dentro de los abordajes futuros. Todos estos antígenos son inmunogénicos y protectores en el modelo de ratón. La adición de conjugados LOS-PTg a las formulaciones acelulares se suma a las opciones que intentan mejorar la eficacia de la vacunas (Robbins y cols., 2014).

En la medida que aumenta el conocimiento de los mecanismos inmunológicos que sustentan la respuesta protectora contra el patógeno, se evidencia la necesidad de potenciar la respuesta de las vacunas acelulares mediante la adición de moléculas adyuvantes tales como el monofosforil lípido A (MFLA) y agonistas del receptor TLR9 (oligonucleótidos con motivos CpG no metilados) (Agnolon y cols., 2015). En ratones, ambos han mostrado ser mejores y más eficientes inductores de la respuesta de tipo Th1 respecto a las preparaciones basadas solamente en alúmina; particularmente los CpG, favorecen la inducción de una respuesta de memoria más efectiva contra *B. pertussis* (Brummelman y cols., 2015).

2.5.7.1 Obtención de proteínas de fusión recombinantes

Con el objetivo de mejorar las vacunas y de reducir el número de componentes presentes en las vacunas acelulares se han diseñado y evaluado en ratones disímiles variantes de proteínas híbridas. La fusión de la subunidad S1 de PTg al toxoide tetánico resulta inmunogénica y protectora contra tétanos pero ineficaz contra pertussis (Boucher y cols., 1994). La fusión de las subunidades S1 y S3 de PT y FHA ha resultado en una construcción S1-S3-FHA inmunogénica en ratones, en este estudio no se evaluó la capacidad protectora de proteína obtenida (Lee y cols., 2002). La proteína de fusión PDT, compuesta por subunidad S1 de PTg, el toxoide diftérico y el fragmento C de la toxina tetánica, se obtuvo en *E. coli* y fue capaz de inducir en ratones anticuerpos que reconocen las tres toxinas nativas mediante *Western blotting* (Aminian y cols., 2007). La fusión de diferentes variantes de la proteína pertactina no se han abordado con anterioridad.

2.5.8 Desarrollo de vacunas contra *Bordetella pertussis* en Cuba

Cuba es uno de los países que utiliza una vacuna de naturaleza celular para combatir la tosferina. Desde la aplicación de la vacuna DTPc en 1970 disminuyeron los índices de mortalidad y morbilidad. En 1970 se informaron 1 192 infectados, la cifra fue superada posteriormente por 2 147 casos, pero ya en 1973 se observó una disminución significativa, hasta reportarse uno y dos casos en 1992 y 1994, respectivamente. Después del año 1994 no se informaron más casos en el territorio nacional (MINSAP, 2015). La vacuna DTPc se sustituyó en el año 2006 por la vacuna pentavalente (DTPc+HB+Hib) y actualmente se administra a todos los infantes a los 2, 4, 6 y 18 meses de edad, con una cobertura de 100 % (MINSAP, 2015).

Sin embargo, un problema que comparten muchos países, entre ellos Cuba, es la carencia de una infraestructura nacional con una red eficiente para el aislamiento, el diagnóstico molecular y la caracterización microbiológica de *B. pertussis*. Por este motivo, la enfermedad tosferina se diagnostica

clínicamente con frecuencia pero se desconoce las especificidades de su etiología. Investigaciones recientes evidencian casos definidos con la sintomatología de la enfermedad (Monroy-Vaca y cols., 2014). Otras entidades del Ministerio de Salud Pública muestran preocupación respecto a la tosferina en el territorio nacional, a partir de considerar el endemismo regional y mundial de pertussis (Martínez C y cols., 2012). La situación epidemiológica de Cuba pudiera ser similar a la de muchos países cuyos programas de inmunización se desarrollan con altas coberturas de vacunación.

En Cuba se encuentra en fase de desarrollo un candidato vacunal basado en proteoliposomas extraídos de la membrana externa de *B. pertussis* (Fernandez y cols., 2013). Las nanoestructuras han resultado inmunogénicas y protectoras en el modelo de ratón y la estrategia tiene además la potencialidad de aplicarse a cepas atenuadas genéticamente. Al igual que otras estrategias, la principal limitación podría gravitar en la seguridad. Según se ha informado el candidato presenta concentraciones de endotoxinas (dosis/ratón) entre 6 y 10 veces superior a lo informado para las vacunas acelulares comerciales (< 100 EU/dosis) (Brito y Singh, 2011).

Hasta la fecha no se han publicado estudios dirigidos a mejorar las vacunas acelulares comercialmente disponibles.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos

3.1.1 Cepas de *Escherichia coli*

La cepa TOP10F' derivada de MC1061, con genotipo *F'[lacI^q Tn10(tet^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 λ* (Casadaban y Cohen, 1980); se empleó para la clonación de las variantes alélicas *prnA1*, *prnA2* y los seis mutantes híbridos del gen *prnA*. La cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RP con genotipo *E. coli B F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Camr]* (Weiner y cols., 1994), se utilizó en los experimentos de expresión de las diferentes variantes génicas de pertactina.

3.1.2 Cepas de *Bordetella pertussis*

La cepa Tohama I (Parkhill y cols., 2003) se empleó para amplificar mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) el gen *prnA1* que codifica para Prn1. El aislado clínico CH53 se utilizó para amplificar el gen *prnA2* mediante PCR que codifica para la pertactina tipo 2, (Prn2).

La cepa BPCNIC0311 [*ptxA2*, 9K/129G/*prnA2*] se obtuvo en el laboratorio de Biología molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, como un servicio en el marco de un acuerdo de colaboración científica. La cepa se deriva del aislado clínico BP165 [*ptxA1*, *prnA1*] (Sekura y cols., 1983; Proenza-Alfonzo y cols., 2013). El microorganismo se modificó genéticamente para producir el toxoide genéticamente modificado PTg (9K/129G) y la variante Prn2. El toxoide PTg (9K/129G) se generó al mutar el triplete (cgc) 9R por (aag) 9K y (gaa) 129E por (ggg) 129G (Seubert y cols., 2014). Esta cepa se empleó para la obtención y purificación de las proteínas PTg, FHA y Prn2.

La cepa BP18323 [*prnA6*] se utilizó en los experimentos de reto intracerebral en el modelo MICA (ver acápite 3.20.5 y 3.20.6).

3.2 Medios y condiciones para el cultivo de *Escherichia coli*

El medio líquido LB [del inglés, *lysogeny broth* (Bertani, 2004)] se empleó para la obtención de biomasa de la cepa TOP10F' transformada, para la purificación de ADN plasmídico, así como la pesquisa de clones positivos. El medio se utilizó además para crecer la cepa BL21(DE3) CodonPlus RP en los experimentos de expresión y para la generación de biomasa para la purificación de proteínas. El medio LB contiene (por litro), 10 g de triptona, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, pH = 7,5) (Sambrook y cols., 1989). El medio LA (del inglés *lysogeny agar*) (Bertani, 2004) es la variante sólida del caldo LB, contiene además 15 g/L de agar bacteriológico, y se utilizó para la obtención de colonias aisladas en placas de Petri

(Sambrook y cols., 1989). Para el cultivo de la cepa TOP10F' transformada con los diferentes plasmidios derivados de pET28a+, los medios LA y LB se suplementaron con kanamicina (Sigma-Aldrich, EE.UU) a una concentración final de 50 µg/mL, LAK o LBK, respectivamente. Para el cultivo de la cepa BL21(DE3) CodonPlus RP transformada con los derivados de pET28a+, el medio LAK o LBK se suplementó además con cloranfenicol, 34 µg/mL, (Merck), LAKC o LBKC respectivamente.

3.3 Medios y condiciones generales para el cultivo de *Bordetella pertussis*

El medio sólido Bordet Gengou Agar Base (Difco TM), complementado con 15% (v/v) de sangre desfibrinada de carnero (BGA), se preparó según las recomendaciones del fabricante. Se utilizó para la obtención de colonias aisladas en placas de Petri, el monitoreo de la actividad β hemolítica, la verificación de la pureza de los cultivos fermentados así como la comprobación de la efectividad de la inactivación de los sobrenadantes y los precipitados celulares de *B. pertussis*. El medio sólido Charcoal Agar Base (CHAB) (Difco TM) se preparó según las recomendaciones del fabricante. Se utilizó para la obtención de colonias aisladas en placas de Petri para la preparación de los bancos celulares de trabajo.

El medio Stainer-Sholte (SS) (Stainer y Scholte, 1970) se utilizó para multiplicar la bacteria con el objetivo de purificar ADN cromosomal. Su composición (por litro): 10,7 g de glutamato monosódico, 0,24 g de L-prolina; 2,5 g de NaCl; 0,5 g de KH₂PO₄; 0,2 g de KCl; 0,1 g de MgCl₂·6H₂O; 1.82 g de Tris base; 0,01 g de FeSO₄·H₂O; 0,02 g de CaCl₂·2H₂O; 0,04 g de L-cisteína monohidratada; 0,1 g de glutatión reducido; 0,02 g de L-ácido ascórbico; y 0,004 g de ácido nicotínico. Los reactivos se adquirieron de Aplichem. Los componentes glutamato, prolina, NaCl, KH₂PO₄, KCl, MgCl₂·6H₂O y Tris base se prepararon como una formulación basal (pH = 7,2). El resto de los componentes se prepararon como una solución concentrada 100X (complemento). La esterilización del medio se realizó por filtración a través de un tamiz de poro 0,2 µm (Minisart Sartorius).

El medio de cultivo líquido THJS descrito por Thalen (Thalen y cols., 1999) se utilizó para crecer la cepa BPCNIC0311. Un litro de medio contiene 1,87 g de glutamato monosódico; 1,83 g de L-lactato al 90 %; 0,24 g de L-prolina; 3,3 g de NaCl; 0,1 g de NH₄Cl; 0,5 g de KH₂PO₄; 0,5 g de KCl; 0,1 g de MgCl₂ 6H₂O; 1,525 g de base Tris; 0,01 g de FeSO₄ H₂O; 0,02 g de CaCl₂ 2H₂O; 0,04 g de clorhidrato de L-cisteína; 0,1 g de glutatión (reducido); 0,02 g de ácido L-ascórbico y 0,004 g de ácido nicotínico. El glutamato monosódico, L-lactato, NaCl, KH₂PO₄, KCl, MgCl₂ 6H₂O, Tris base, y CaCl₂ 2H₂O se prepararon en una formulación basal y se esterilizaron por filtración. Con los componentes restantes se preparó el

complemento, con una concentración cien veces superior al medio base y se esterilizó también por filtración. El pH final del medio suplementado se ajustó a 7,3. Todos los reactivos se adquirieron de Applichem GmbH (Alemania).

Las operaciones microbiológicas se realizaron en gabinete laminar AirTech (Riesgo biológico II). Para obtener colonias aisladas se realizaron diluciones seriadas décuples hasta 10^{-4} a partir de una muestra conservada a $T = -80^{\circ}\text{C}$ en medio SS con glicerol al 30 %. Las células se sembraron en placas BGA y se incubaron durante 72 h a 35°C con humedad relativa $\geq 70\%$. A partir de estas placas se preparó una suspensión celular con una $\text{Abs}_{530\text{ nm}} = 0,05$. La suspensión (50 μL) se dispersó en placas frescas de BGA. Después de 72 h y bajo las mismas condiciones de incubación, el césped bacteriano se cosechó y resuspendió en 1 mL de medio SS. La suspensión celular obtenida se empleó en la inoculación de matraces de Erlenmeyer de 0,25 L con 0,03 L de medio líquido SS. Estos se inocularon a una $\text{Abs}_{530\text{ nm}} = 0,1$ y se incubaron a 35°C durante 24 h y una agitación constante de 200 rpm. Posteriormente, los cultivos con $\text{Abs}_{530\text{ nm}} \geq 0,8$ se seleccionaron para cosechar las células mediante centrifugación a 6000 g durante 20 min a 4°C . El precipitado celular se utilizó para la purificación del ADN cromosomal.

3.4 Purificación de ADN cromosomal, plasmídico y en fragmentos

Para purificar el ADN cromosomal de las cepas de *B. pertussis* Tohama I y CH53 se empleó el estuche comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega, según las instrucciones recomendadas por el fabricante en la Sección IIIG del manual TM050. Para purificar el ADN plasmídico a partir de *E. coli* se utilizó el estuche comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. Los fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR o digestiones enzimáticas se purificaron mediante el estuche comercial Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System, según las instrucciones recomendadas por el fabricante.

3.5 Metodología general y herramientas bioinformáticas utilizadas en el diseño de las variantes de pertactina híbrida de Prn1 y Prn2

Para diseñar las variantes híbridas de Prn1 y Prn2 se consideraron las características inmunológicas y estructurales de la proteína pertactina. Como se muestra en la figura 2 (acápite 2.2.4.2.3), esta molécula se pliega en forma de una hélice beta dextrógira a partir de la cual emergen numerosos lazos (Emsley y cols., 1994). Los estudios de mapeo epitópico sugieren que más del 70 % de los lazos localizados a lo largo de la hélice intervienen en la evasión inmune (Hijnen y cols., 2007b). La respuesta de Ac de carácter protector se dirige fundamentalmente contra una región que involucra epitopos discontinuos,

cuyos motivos de unión se localizan en lazos del extremo amino y la R1 (Hijnen y cols., 2007b). Por otro lado, próximo al extremo carboxilo se ubica una región que desempeña una función esencial en el plegamiento de pertactina (Oliver y cols., 2003; Junker y cols., 2006; Hijnen y cols., 2007b).

Los elementos analizados justificaron un diseño aditivo, en el cual se incluye la secuencia completa de pertactina. El diseño se basó en la fusión de dos fragmentos A y B, cada uno con un lazo R1 de variantes diferentes de pertactina. Para ello se trazó la estrategia que se muestra en la Figura 4. La molécula Prn2 se modeló automáticamente por homología utilizando como molde la estructura 1DAB.pdb (Prn1). Posteriormente, se determinó para Prn1 y Prn2 la región de la hélice beta que interacciona con el lazo de la R1. A partir de la región determinada y utilizando el diagrama topológico de pertactina, se precisaron los límites de los fragmentos A y B, para que una vez fusionados los fragmentos, se preservara la disposición espacial de las tres láminas betas A, B y C que estructuran la hélice beta de pertactina. Las hebras betas que forman las vueltas de la hélice en la interface entre ambos fragmentos se evaluaron en cuanto a su similitud, para que no se afectaran los contactos de la estructura secundaria en la interface y se conservara la regularidad topológica en la molécula híbrida. Posteriormente, se procedió a la evaluación de la factibilidad del diseño híbrido mediante la fusión virtual de ambos fragmentos y la evaluación *in silico* de los modelos híbridos obtenidos.

La modelación de la proteína Prn2 se realizó por comparación de forma automática mediante el servidor I-TASSER (Zhang, 2009), al que se le suministró el modelo cristalográfico 1DAB.pdb (Prn1) como molde. Los contactos aminoacídicos entre el lazo de la R1 (R₂₂₆-G₂₆₀) y la hélice beta, la confección del diagrama topológico de Prn mediante el análisis de los contactos entre los aminoácidos de las hebras betas adyacentes a lo largo de la molécula y la evaluación de la superposición de las vueltas en la interface de los fragmentos, se realizó con el programa *Molecular Operating Environment* (MOE) versión 2009.10. Para estas operaciones se utilizó el modelo cristalográfico 1DAB (Prn1) informado por Emsley y cols (Emsley y cols., 1994), el modelo de la proteína Prn2 obtenido con I-TASSER y las asignaciones de estructura secundaria contenidas en la base de datos 1DAB.dssp. La fusión virtual de los fragmentos A y B se realizó mediante el programa WHATIF (Anexo 1). Los moldes obtenidos con WHATIF se utilizaron para modelar, por comparación, las proteínas PRH1-2 y PRH2-1 con el programa I-TASSER. La calidad de los modelos híbridos obtenidos se evaluó con el servidor Prosess (www.prosess.ca).

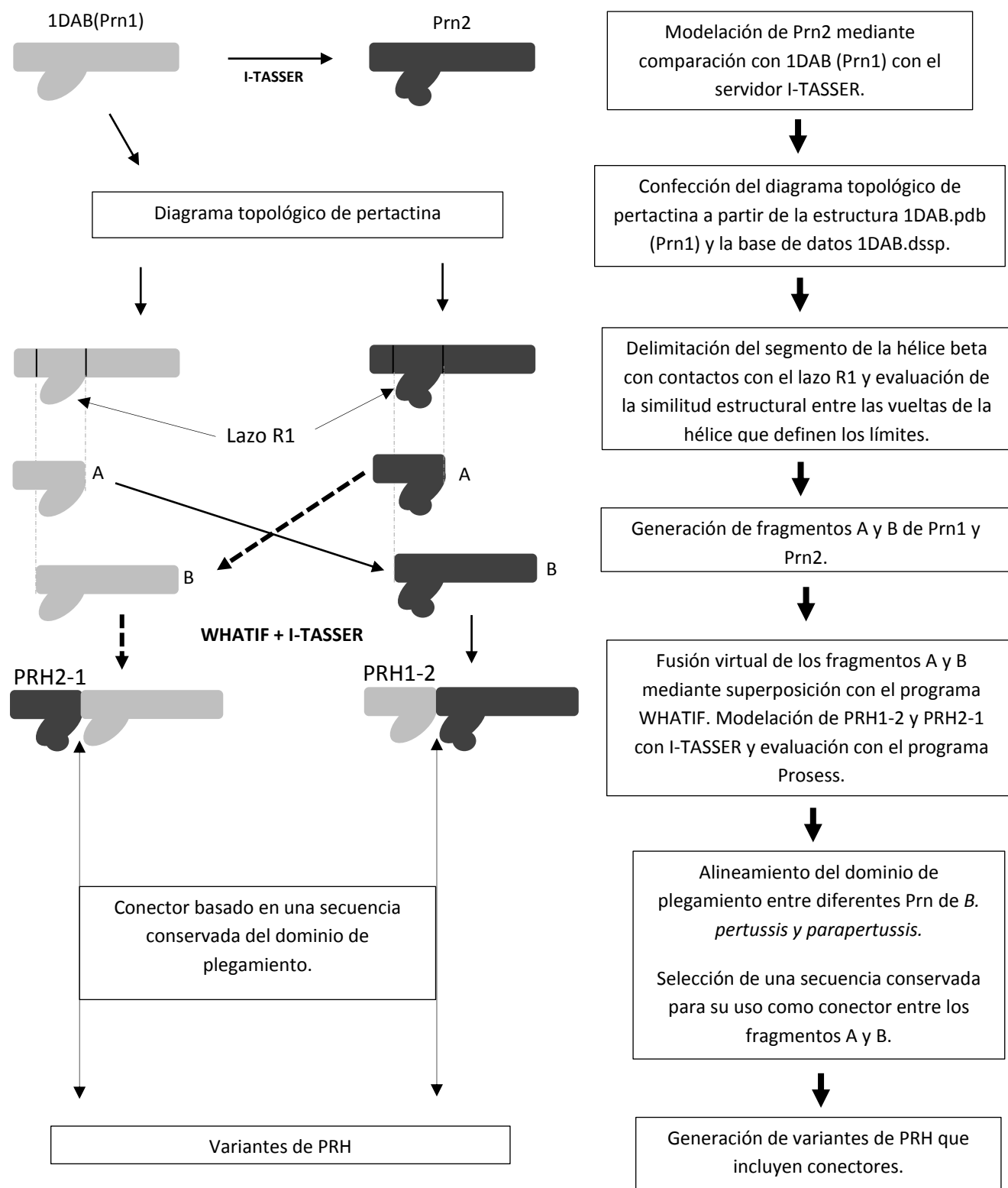


Figura 4. Estrategia utilizada en el diseño de las pertactinas híbridas.

Para la visualización de las estructuras y confección de figuras se utilizó el programa Chimera versión 1.10.2.

Como el diseño híbrido constituye una extensión del extremo amino de Prn y el plegamiento de Prn es vectorial, iniciándose en el dominio de plegamiento del extremo carboxilo y avanzando gradualmente hacia el extremo amino (Renn y cols., 2012), se insertó, entre los fragmentos A y B, una secuencia conservada del dominio de plegamiento. Esta secuencia podría favorecer el plegamiento del fragmento A y también aumentar la distancia entre los lazos R1 en la molécula híbrida y por tanto favorecer el reconocimiento individual de cada lazo por parte de los anticuerpos.

Para la identificación de secuencias conservadas presentes en el dominio de plegamiento se utilizaron las secuencias de *B. parapertussis* (Gen, BPP 1150; Acceso Uniprot: P24328) así como las 13 variantes descritas para *B. pertussis*: Prn1; Acceso Uniprot: Q546U4; Prn2, Acceso Uniprot: O88143; Prn 3, Acceso Uniprot: O69259; Prn4; Acceso Uniprot: Q9S6M9; Prn 5; Acceso Uniprot: Q9S3M8; Prn6, Acceso Uniprot: O69257; Prn7, Acceso Uniprot: Q9S6N1; Prn8; Acceso Uniprot: Q9S6N0; Prn9, Acceso Uniprot: Q93L98; Prn10, Acceso Uniprot: Q8RSU0; Prn11; Acceso Uniprot: Q8GJ68; Prn12; Acceso GenBank: BAF35031,1; Prn13, Acceso Uniprot: A4UTL5.

Las secuencias se compararon mediante alineamiento múltiple con el algoritmo Clustal-X (Thompson y cols., 1997) disponible en el programa Vector NTI 7.1 y ClustalW2 (Larkin y cols., 2007) del servicio de Internet <http://services.uniprot.org>.

3.6 Materiales y métodos generales de la Biología Molecular utilizados para obtener las construcciones genéticas codificadoras de las variantes PRH

Las enzimas de restricción y de ligamiento, las ADN polimerasas termoestables de *Thermus aquaticus* (Taq Pol) y de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) y el marcador de peso 1 kb se adquirieron de Promega Corporation, EE.UU. La ADN polimerasa termoestable de *Pyrococcus sp.* strain KOD (Platinum Pfx) se adquirió de Invitrogen, EE.UU. Estas enzimas se utilizaron en las soluciones tamponadas y condiciones del fabricante. El inductor IPTG (isopropiltiol- β -D-galactósido), los reactivos de tinción rojo Ponceau y Azul Coomassie R-250, el agente intercalante Bromuro de Etidio, Agarosa Tipo I-A, dimetil sulfóxido (DMSO) y AEC (3-amino-9-etil-carbazol) se adquirieron de Sigma-Aldrich, EE.UU. El disolvente N, N'-dimetilformamida se adquirió de Caledon.

Los métodos empleados en las reacciones enzimáticas, las reacciones de ligamiento, la transformación genética de bacterias y la electroforesis en gel de agarosa se realizaron por procedimientos previamente descritos (Sambrook y cols., 1989). Las electroforesis de ADN se realizaron en geles de agarosa al 0,8 % (m/v) en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH = 8,0) a 5 V/cm.

Las construcciones genéticas obtenidas se caracterizaron mediante análisis de restricción doble con las endonucleasas de restricción: Nde I/BamH I (Promega, EE.UU). Los fragmentos resultantes se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio. Los clones con patrones de restricción similares a los esperados se seleccionaron como positivos. La secuencia nucleotídica de los insertos se caracterizó completamente por SAUT (Macrogen, Corea del Sur).

3.7 Oligonucleótidos utilizados en la construcción de los vectores y la secuenciación de los genes recombinantes

En el anexo 2 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos (ONC) utilizados en la amplificación de los genes *prnA1* y *prnA2* por PCR, la secuenciación automática (SAUT) de los diferentes genes por ambas cadenas y en la construcción por PCR de los genes recombinantes híbridos. La síntesis de los ONC se realizó en el Departamento de Química-Física del CIGB con el sistema automático “Gene Assembler Plus DNA syntetizer” (Amersham Pharmacia Biotech). La síntesis de los ONC usados en la SAUT se realizó por el servicio Macrogen SA (Corea del Sur).

3.8 Obtención mediante PCR de los fragmentos de ADN codificantes del dominio extracelular de Prn1 y Prn2 de *Bordetella pertussis*

Los segmentos de los genes *prnA1* y *prnA2* que codifican para el dominio extracelular de Prn1 y Prn2 respectivamente, se amplificaron individualmente mediante PCR a partir de ADN cromosomal de las cepas *B. pertussis* Tohama I [*prnA1*] y CH53 [*prnA2*] (Figura 5). Para ello se utilizó el juego de ONC pET-A0-new-L y pET-D-new reportados previamente (Hijnen y cols., 2005). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 μ L y en tubos de 0,2 mL de pared fina (Eppendorf). Se utilizó 1 μ g de ADN cromosomal; 0,2 μ M de cada ONC; 0,2 μ M de dATP, dTTP, dGTP, y dCTP (dNTPs); 1,5 mM MgCl₂, 10 % DMSO (v/v) y 2,5 U de la enzima Pfu ADN polimerasa en el tampón Pfu Pol (Promega, EE.UU). Los fragmentos se amplificaron en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 4 min a 94 °C, desnaturalización 1 min a 94 °C, hibridación 1 min a 63 °C, extensión 4 min a 72 °C y 30 ciclos, así como un paso final de extensión de 10 min a 72 °C. Los fragmentos de ADN amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % con bromuro de etidio (0,5 mg/L) y posteriormente

se purificaron con el estuche de *Promega Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System*. Los fragmentos obtenidos presentan sus extremos romos por la acción correctora 3'→5' de la ADN polimerasa Pfu.

3.9 Construcción de los plasmidios de expresión pET28a-*prn1* y pET28a-*prn2*

Los segmentos de ADN con los genes *prnA1* y *prnA2* que codifican para el dominio extracelular de Prn1 y Prn2, respectivamente, así como el vector pET28a+ (Novagen, EE.UU) se digirieron por separado mediante digestión doble con las enzimas Nde I y BamH I (Promega, EE.UU). Los fragmentos de ADN y el vector lineal digeridos, se purificaron con el juego de reactivos *Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EE.UU). En la reacción de ligamiento se mezclaron por separado 20 ng del vector lineal, 20 ng de los fragmentos de ADN de cada gen (relación molar inserto:vector 3,5:1), 3 unidades (U) de la enzima ADN T4 ligasa, en el tampón ADN T4 ligasa en un volumen final de 10 µL. De esta forma los genes quedan fusionados por su extremo 5' a una secuencia de 51 nucleótidos que codifica para el polipéptido HHHHHHSSGLVPRGSHM, que contiene seis histidinas consecutivas y la secuencia señal de corte para la enzima trombina.

La reacción de ligamiento se incubó a 16 °C durante 1 h y seguidamente a 65 °C por 15 min. La mezcla inactivada se dializó durante 30 min sobre una membrana VSWP0025 (Millipore) contra agua purificada estéril. Los productos de la reacción de ligamiento se introdujeron en la cepa TOP10F' por electroporación en las siguientes condiciones: cubeta de 1 mm (*E. coli* Pulser Cuvette 1 mm BioRad, EE.UU), 40 µL de células electrocompetentes y 1 µL de mezcla de ligamiento, la mezcla se mantuvo en hielo. Posteriormente, la mezcla recibió un pulso de 1800 V (R = 200 Ω, C = 25 µF) en electroporador (Gene Pulser II; BioRad). Inmediatamente después se añadió 500 µL de medio LB frío. Luego, la suspensión celular transformada se incubó a 37 °C durante 1 h. Pasado este tiempo, 1 µL de la suspensión celular se mezcló con 50 µL de caldo LB y se dispersó homogéneamente en placas con medio LAK. Las placas se incubaron durante 18 h a 37 °C. Con este procedimiento se obtuvieron más de 20 colonias por placa. Posteriormente, una colonia aislada se inoculó en precultivos de 5 mL de medio LBK y se crecieron a 37 °C durante 15 h con agitación constante de 150 rpm. A partir de los cultivos crecidos se purificó el ADN plasmídico para la identificación de clones positivos mediante análisis de restricción doble con las endonucleasas: Nde I/BamH I. Los clones positivos se transformaron en *E. coli* y se purificaron para la SAUT de los genes por ambas cadenas. Los clones correctos se denominaron pET28a-*prn1* y pET28a-*prn2*.

3.10 Construcción de los plasmidios de expresión **pET28a-prh1-2**, **pET28a-prh1-cc-2**, **pET28a-prh1-cl-2**, **pET28a-prh2-1**, **pET28a-prh2-cc-1** y **pET28a-prh2-cl-1**

En la figura 5 se muestra la estrategia general abordada para la obtención de los plasmidios codificantes para las construcciones híbridas. Esta se basó en la amplificación mediante PCR de dos fragmentos complementarios A (no fosforilado) y B (fosforilado) a partir de los plasmidios parentales pET28a-prn1 y pET28a-prn2, respectivamente. Los fragmentos A y B, al ligarse correctamente restituyen el gen que confiere resistencia a kanamicina y se obtiene el plasmidio pET28a-prh1-2 y el gen híbrido *prh1-2*.

Para construir el plasmidio pET28a-prh1-2, se utilizó por una parte, el plasmidio parental pET28a-prn1 y el juego de ONC 1, 2 (ver Anexo 2 y 3) para amplificar un fragmento no fosforilado de 4996 pb con un segmento de la secuencia 5'→3' del gen *prnA1*. Por otra parte, a partir del plasmidio pET28a-prn2 y el juego de ONC 5,6 se amplificó un fragmento fosforilado de 2956 pb con el segmento del gen *prnA2*. En lo adelante el Fragmento Fosforilado Complementario, amplificado con el juego de ONC 5,6 se refiere como FFC5,6. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 µL y en tubos 0,2 mL (Eppendorf) de pared fina. Se empleó 0,1 µg del plasmidio parental; 0,3 µM de cada ONC, 0,3 µM de los dNTPs; 1 mM MgSO₄; 2,5 U de Platinum Pfx ADN polimerasa en el tampón Pfx 1X y 2X de la solución *PCRx Enhancer*. Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C; desnaturalización de 15 s a 94 °C; hibridación-extensión de 5,5 min a 68 °C; 10 ciclos y un paso final de extensión de 10 min a 68 °C. Ambos fragmentos amplificados presentan extremos romos y contienen información complementaria para la restitución del marcador de selección que confiere resistencia a kanamicina. En la reacción de ligamiento se mezclaron 1,2 µg de FFC5,6 y 1,7 µg del fragmento no fosforilado. Los procedimientos de ligamiento, electroporación y pesquisa de clones fueron los descritos para pET28a-prn1 (acápite 3.9), con la excepción de que la reacción de ligamiento se incubó 4 h a 16 °C, y que para obtener más de 20 colonias aisladas la siembra se realizó con 50 µL de la mezcla de transformación.

Los vectores descritos a continuación se construyeron mediante el mismo procedimiento general.

pET28a-prh1-cc-2. A partir de pET28a-prn1 y el par de ONC 1,3 se obtuvo un fragmento de 5029 pb no fosforilado con la región 5 prima del gen *prnA1*. Este fragmento incluye además, en su extremo 3 prima, la secuencia codificante para el conector corto IDNATWVMTDN.

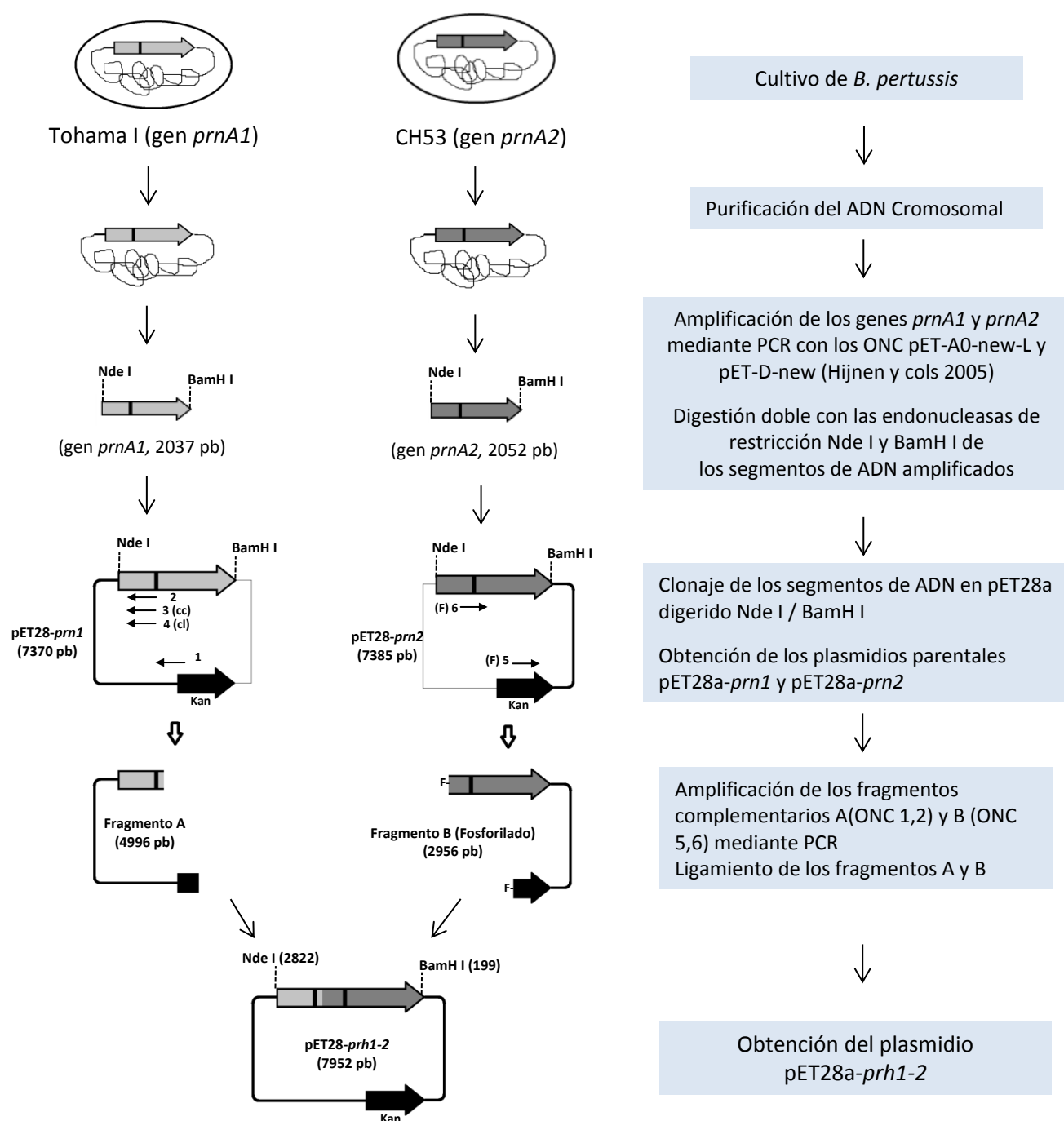


Figura 5. Estrategia utilizada para la construcción del plasmidio pET28a-prh1-2. Los plasmidios pET28a-prh1-cc-2 y pET28a-prh1-cl-2 se construyeron al amplificar mediante PCR el fragmento A con los ONC 1,3 y 1,4 respectivamente. De esta forma, en los fragmentos A se incorporan las secuencias conectoras cortas (cc) y largas (cl). Estos fragmentos se ligaron por separado al fragmento B fosforilado (ONC 5,6). Un procedimiento similar se utilizó para obtener los plasmidios pET28a-prh2-1, pET28a-prh2-cc-1, pET28a-prh2-cl-1, pero intercambiando los vectores parentales en las reacciones de PCR.

Este fragmento al ser ligado al FFC5,6 permite la restitución del gen que confiere resistencia a kanamicina.

pET28a-prh1-cl-2. A partir de pET28a-prn1 y el par de ONC 1,4 se obtuvo un fragmento de 5062 pb no fosforilado con la región 5 prima del gen *prnA1*. Este fragmento incluye además, en su extremo 3 prima, la secuencia codificante para el conector largo IDNATWVMTDNIDNATWVMTDN. Este fragmento al ser ligado al FFC5,6 permite la restitución del gen que confiere resistencia a kanamicina.

Para obtener los plasmidios **pET28a-prh2-1**, **pET28a-prh2-cc-1** y **pET28a-prh2-cl-1**, se realizó el mismo procedimiento descrito con los vectores parentales intercambiados. Se utilizó el vector pET28a-prn1 con el par ONC 5,6 para generar el fragmento FFC5,6 de 2941 pb con el segmento del gen *prnA1*. Por otro lado, a partir de pET28a-prn2 y los juegos de ONC 1,2; 1,3 y 1,4 se obtuvieron los fragmentos no fosforilados de 5011 pb, 5044 pb, y 5077 pb, con la región 5 prima del gen *prnA2*. Estos tres fragmentos, al ser ligados correctamente por separado con el fragmento fosforilado, permiten la restitución del gen que confiere resistencia a kanamicina. El anexo 3 resume las características de las construcciones genéticas obtenidas en este trabajo.

3.11 Inducción de la expresión de las construcciones genéticas codificadoras de las variantes Prn y PRH en *Escherichia coli*

Las células de la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RP se transformaron, mediante electroporación, por separado con las diferentes construcciones genéticas y se sembraron en placas con medio LAKC. Posteriormente, se tomó una colonia y se inoculó en 5 mL de medio LBKC. Este cultivo se incubó durante 15 h a 37 °C bajo agitación constante a 150 rpm. El cultivo crecido se inoculó en un medio LBKC fresco de 5 mL a una $Abs_{600\text{ nm}} = 0,1$. Cuando el cultivo alcanzó una $Abs_{600\text{ nm}}$ entre 0,4 y 0,6, se añadió el inductor de la expresión (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se incubaron por 6 h adicionales en las mismas condiciones. Posteriormente, las células se cosecharon mediante centrifugación (10 000 g, 4 °C, 15 min) y el precipitado celular se almacenó a T = -80 °C hasta su análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y *Western blotting*.

3.12 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Para evaluar la síntesis de las diferentes Prn y PRH se empleó la electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio al 10 % (SDS-PAGE, del inglés "*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*") (Laemmli, 1970). El precipitado celular correspondiente a 1 mL del

cultivo bacteriano se resuspendió en 200 μ L de solución tampón reductora de la muestra [100 mM Tris-HCl, 5 % (v/v) 2-Mercaptoetanol, 2 % (m/v) SDS, 10 % (v/v) glicerol, pH = 6,9] con bromofenol azul como indicador del frente de corrida. La suspensión celular se incubó 20 min a 95 °C, seguido de 5 min de enfriamiento en hielo. El volumen de aplicación fue de 10 μ L. Las corridas electroforéticas se realizaron por duplicado en cámara BIORAD (EE.UU) bajo corriente constante de 30 mA. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie CR-250 para la visualización de las bandas de las diferentes proteínas. La imagen de los geles de SDS-PAGE pertenecientes a muestras de los experimentos de expresión o de purificación de proteínas se digitalizó en escáner (HP Scanjet 3570c) y posteriormente se analizó con el programa computacional ImageJ versión 1.37 (National Institutes of Health, Bethesda, EE.UU).

3.13 Inmunodetección de las diferentes variantes de Prn y PRH

La identidad de cada una de las proteínas se evaluó mediante *Western blotting*. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C; Pharmacia Biotech). A continuación se realizó la inmunodetección ajustando lo descrito previamente (Towbin y Gordon, 1984). La membrana se incubó con solución PBS-LT (Leche descremada, 50 g/L; Tween 20, 0,05% v/v en solución salina tamponada por fosfatos, del inglés, *phosphate buffer solution*, PBS) durante 1 h a 25 °C. Para la detección de las diferentes variantes de Prn y PRH, la membrana se incubó con 0,17 μ g/mL del anticuerpo monoclonal (AcM) Pem19 en solución PBS-LT durante 1 h a 25 °C. Este AcM reconoce el epitopo lineal RELSA, ubicado próximo al extremo carboxilo de pertactina, región no incluida en la estructura tridimensional informada por Emsley y cols (Emsley y cols., 1996; Hijnen y cols., 2005). Seguidamente, la membrana se incubó con el anticuerpo de carnero anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma-Aldrich, EE.UU) diluido 1:10 000 en solución PBS-LT. Entre los pasos de incubación con los Ac la membrana se lavó dos veces con solución PBS-T (0,05 % v/v de Tween 20 diluido en PBS) durante 5 min a 25 °C. La membrana se incubó en solución de revelado [50 mM Acetato de Sodio pH = 5,5; 0,02% (m/v) de AEC (3-amino-9-etil-carbazol) disuelto en N, N'-dimetilformamida y Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) al 0,05% (v/v)]. La imagen de la membrana se digitalizó en un escáner HP Scanjet 3570c.

3.14 Caracterización de proteínas por espectrometría de masas

Las muestras de biomasa de los experimentos de inducción de la síntesis de proteínas en *E. coli* (acápite 3.11) se trasladaron al Departamento de Espectrometría de Masas del CIGB. Las muestras se procesaron mediante SDS-PAGE, según el procedimiento descrito previamente (acápite 3.12). Las bandas se

visualizaron con la tinción con Azul Coomassie y las mayoritarias se escindieron del gel y posteriormente se digirieron proteolíticamente con tripsina (Gonzalez y cols., 2003). Luego, los péptidos se extrajeron del gel para su análisis por espectrometría de masas. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas híbrido con geometría ortogonal QTOF-1 (Micromass, UK) equipado con una fuente de ionización nanospray. El software de procesamiento de los espectros de masas empleado fue MassLynx versión 3.5 (Micromass, UK). La identificación de proteínas se realizó de manera automática con el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Adicionalmente, los espectros resultantes de la espectrometría de masas en sucesión (MS/MS), se inspeccionaron manualmente y se consideró una identificación confiable cuando 4 o más fragmentos y'' consecutivos se asociaron a señales intensas.

3.15 Purificación de las diferentes variantes de pertactina (Prn ó PRH) obtenidas en *Escherichia coli*

Para generar la biomasa necesaria para la purificación de proteínas se utilizaron cultivos de 0,3 L. A partir de un cultivo crecido de 5 mL, se inoculó un medio fresco de 50 mL de LBKC, que se utilizó después para inocular los cultivos de 0,3 L. Las condiciones de inoculación, inducción, cosecha y almacenamiento fueron similares a las descritas antes (acápite 3.11). La biomasa obtenida (1 g de peso húmedo) se resuspendió en cada caso en 10 mL de solución de ruptura (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % del tensoactivo no iónico Tritón X-100, pH 8,0). La suspensión celular se incubó en hielo y se sonicó durante 1 min a una amplitud ajustada a 70 %, seguido de una pausa de 5 min. Los pasos de sonicación y pausa se repitieron cuatro veces. Seguidamente, el lisado celular se centrifugó a 10 000 gravedades a 4 °C durante 30 min. Luego, el material insoluble se sometió a tres ciclos de lavado/centrifugación con el tampón 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0. Posteriormente, el precipitado resultante se solubilizó en 10 mL del tampón de extracción: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 4 M urea, 10 mM Benzamidina, pH 8,0. Después de centrifugar, el sobrenadante se filtró a través de una membrana 0,2 μ m con la ayuda de una unidad de filtración al vacío (Sartorius, Alemania). La muestra filtrada se diluyó hasta una concentración de proteína total de 3 mg/mL en tampón de equilibrio 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 4 M urea, pH 8,0. Posteriormente, la muestra diluida se aplicó a una columna con la resina Ni^{2+} -NTA (Qiagen, Alemania), equilibrada con la misma solución. Seguidamente, la columna se lavó secuencialmente primero con el tampón de equilibrio y después con 10 mM imidazol en tampón de equilibrio. La elución se realizó aumentando la concentración de imidazol a 50 mM igualmente en tampón de equilibrio. Luego, el eluato con las proteínas desnaturalizadas se diluyó 10 veces en el

tampón de renaturalización: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 200 mM L-arginina, pH 8,8. Posteriormente, la muestra diluida se dializó durante 24 h a 4 °C contra el tampón de renaturalización utilizando una membrana de diálisis con un valor de corte de 30 kDa (Spectrum Laboratories, EE.UU). Finalmente, la muestra se dializó contra el tampón 50 mM Tris pH = 8,8, para posteriormente proceder a su concentración por Amicon (Amersham) hasta un valor de $0,4 \pm 0,1$ mg/mL. Para el almacenamiento a largo plazo las proteínas se conservaron en presencia de 10 mM benzamidina (Applichem, Alemania) y se mantuvieron a -20 °C.

3.16 Procedimientos utilizados en la purificación de PTg, FHA y Prn2 a partir de *Bordetella pertussis* BPCNIC0311

3.16.1 Preparación del inóculo

La cepa BPCNIC0311 conservada en glicerol al 30 % (v/v) a una temperatura $T = -80\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$, se sembró en placas con medio sólido CHAB (Difco, TM). Las placas se incubaron durante 96 h a 35 °C con una humedad relativa $\geq 70\%$. Luego, las colonias aisladas se cosecharon y se preparó una suspensión bacteriana con $Abs_{530\text{ nm}} = 0,1$ que se dispersó en placas frescas de medio CHAB. Después de 72 h de incubación a las mismas condiciones descritas antes, el césped bacteriano se cosechó para luego inocular 0,2 L de medio THJS a una $Abs_{530\text{ nm}} = 0,1$ en un matraz de Erlenmeyer de dos litros. Este cultivo se mantuvo durante 24 h a 35 °C y una agitación constante de 180 rpm. Luego, al cultivo crecido ($Abs_{530\text{ nm}} \geq 2$) se le añadió glicerol anhidro hasta alcanzar una concentración de glicerol 30 % v/v. Finalmente, el cultivo se distribuyó en partes alícuotas de 20 mL y se almacenó a $T = -80\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.

3.16.2 Crecimiento de *Bordetella pertussis* BPCNIC0311 en biorreactor

Para multiplicar la bacteria en el biorreactor, se inoculó una alícuota de 20 mL en un matraz de Erlenmeyer de 2 L con 0,2 L de medio THJS (ver acápite 3.3) a una $Abs_{530\text{ nm}}$ inicial $\geq 0,1$. Los cultivos se incubaron durante 24 h a 35 °C con agitación constante a 180 rpm. Posteriormente, un cultivo (0,2 L) con $Abs_{530\text{ nm}} \geq 2$ se transfirió al biorreactor de 7,5 L (Marubishi Co LTD, Japón) con 3 L de medio THJS. La bacteria se cultivó controlando las variables operacionales siguientes: temperatura $T = 35 \pm 1\text{ °C}$, nivel de oxígeno disuelto mayor que 20 %, agitación igual a 100 rpm y una aireación de 0,3 vvm. El pH 7,3 se controló con ácido ortofosfórico al 10 % (v/v) y la formación de espuma se inhibió por la adición de pequeñas cantidades de una solución al 10 % (v/v) del antiespumante Glanapon DG (Bussetti & Co GmbH). La fermentación se interrumpió a las 18 h, momento en que el cultivo alcanzó una $Abs_{530\text{ nm}} > 4$. Cada 3 y 6 h se tomaron muestras del cultivo bacteriano por un puerto estéril.

La concentración de la proteína PTg en el sobrenadante de cultivo se estimó mediante ELISA (acápite 3.18). La pureza del cultivo se verificó mediante la tinción de Gram así como la siembra de muestras en placas de agar triptona soya. La actividad β hemolítica se comprobó a las 18 h, por la siembra en placas BGA, de diluciones décuples hasta 10^{-6} , de muestras del cultivo. El ADN cromosomal de la bacteria se obtuvo en duplicado, a partir de muestras duplicadas al final de la fermentación, este se purificó mediante el estuche comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega ya descrito (acápite 3.4). El ADN cromosomal se envió al servicio Macrogen para la SAUT de los genes *ptx* y *prnA* por ambas cadenas.

3.16.3 Purificación de PTg, FHA y Prn2

La purificación de PTg y FHA se realizó modificando el procedimiento descrito previamente por Ozcengiz y cols (Ozcengiz y cols., 2004). Como se muestra en la figura 6, la fermentación se detuvo a las 18 h y a continuación el cultivo se centrifugó a 10 000 *g* durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para obtener PTg y FHA, mientras que el precipitado celular se utilizó para la purificación de Prn2. El sobrenadante se esterilizó pasándolo a través de una cápsula Sartobran Midicap (Sartorius, Alemania). Muestras del sobrenadante filtrado se evaluaron en placas de BGA para monitorear la presencia de células vivas de *B. pertussis*. Luego, al sobrenadante libre de células vivas se le añadió gradualmente urea 10 M hasta una concentración final de 2 M urea (0,7 L urea 10 M para 2,85 L de sobrenadante de *B. pertussis*), esta operación se realizó a temperatura $T = 23 \pm 2$ °C y bajo agitación constante de 150 rpm. Seguidamente, la muestra se ajustó a pH = 6,0 con ácido ortofosfórico al 10 % (v/v). Luego, la muestra se aplicó a una columna de Fractogel EMD COO XK 50/5 (diámetro, mm/altura, cm), equilibrada con el tampón A: 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaCl, 2 M urea, pH = 6,0. Las endotoxinas adsorbidas a la columna se lavaron con 10 volúmenes de columna con 0,5 % de Tritón X-100 en tampón A. La columna se lavó posteriormente con 10 volúmenes de tampón de equilibrio. La proteína PTg se eluyó al aumentar el pH con el tampón B: 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaCl, 2 M urea, pH = 7,4. Seguidamente, la proteína FHA se eluyó al aumentar el pH y la conductividad con el tampón C: 20 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, 2 M urea, pH = 8,0.

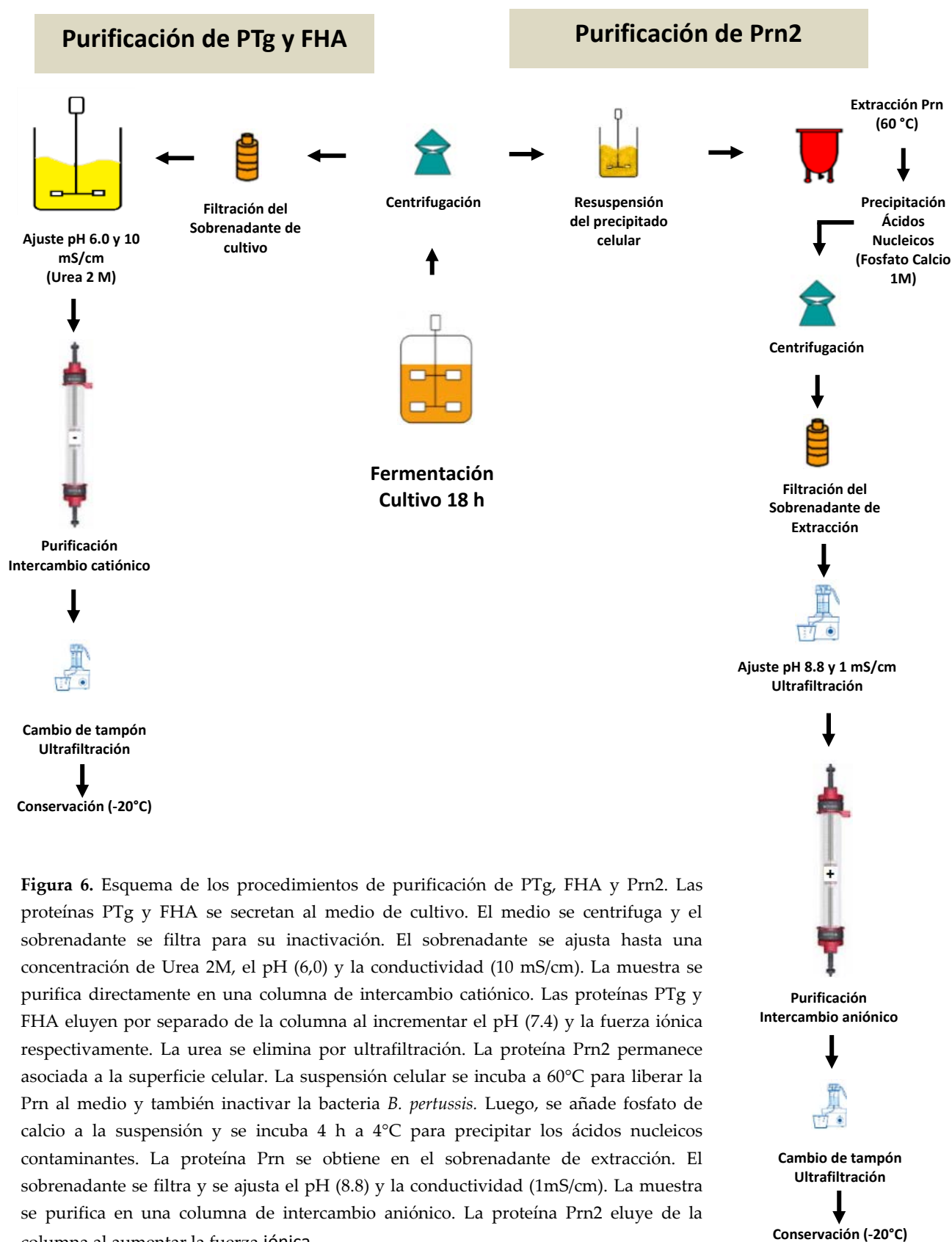


Figura 6. Esquema de los procedimientos de purificación de PTg, FHA y Prn2. Las proteínas PTg y FHA se secretan al medio de cultivo. El medio se centrifuga y el sobrenadante se filtra para su inactivación. El sobrenadante se ajusta hasta una concentración de Urea 2M, el pH (6,0) y la conductividad (10 mS/cm). La muestra se purifica directamente en una columna de intercambio catiónico. Las proteínas PTg y FHA eluyen por separado de la columna al incrementar el pH (7.4) y la fuerza iónica respectivamente. La urea se elimina por ultrafiltración. La proteína Prn2 permanece asociada a la superficie celular. La suspensión celular se incubó a 60°C para liberar la Prn al medio y también inactivar la bacteria *B. pertussis*. Luego, se añade fosfato de calcio a la suspensión y se incubó 4 h a 4°C para precipitar los ácidos nucleicos contaminantes. La proteína Prn se obtiene en el sobrenadante de extracción. El sobrenadante se filtra y se ajusta el pH (8.8) y la conductividad (1mS/cm). La muestra se purifica en una columna de intercambio aniónico. La proteína Prn2 eluye de la columna al aumentar la fuerza iónica.

Luego, las proteínas PTg y FHA se dializaron por separado con el uso del tampón D: 20 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH = 8,0; y una membrana de diálisis con un valor de corte de 30 kDa (Spectrum Laboratories, EE.UU). Las proteínas purificadas se almacenaron a T=-20 °C.

Para purificar la proteína Prn2 (Figura 6), se procedió a su disociación de la membrana externa de *B. pertussis*, según el procedimiento informado por Brennan y cols (Brennan y cols., 1988). Para ello, aproximadamente 24 g (peso húmedo) del precipitado celular se resuspendió en un volumen de 240 mL del tampón 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 8,0 y se incubó durante 60 min a 60 °C. El extracto celular se evaluó cuidadosamente en placas BGA para detectar la presencia de células vivas de *B. pertussis*. Después de centrifugar a 10 000 g durante 30 min y a 4 °C, al sobrenadante resultante, enriquecido en Prn2, se le añadió 1 M de fosfato de calcio hasta una concentración final de 0,15 M y se incubó durante 4 h a 4 °C. Después de centrifugar bajo las mismas condiciones, el sobrenadante se filtró a través de una membrana 0,2 µm y la ayuda de la unidad de filtración al vacío (Sartorius, Alemania). La muestra filtrada se dializó por ultrafiltración utilizando el sistema Amicon (Amersham), el tampón 10 mM Tris, pH = 8,8 y una membrana con un valor de corte de 30 kDa (Milipore, EE.UU). Luego, la muestra se aplicó a una columna Fractogel EMD DEAE XK 50/5 (diámetro, mm/altura, cm), equilibrada con el tampón 10 mM Tris pH = 8,8. Seguidamente, la columna se lavó con el tampón Tris 10 mM, NaCl 10 mM, pH = 8,8 y posteriormente las moléculas de Prn2 se eluyeron de la columna con el tampón Tris 10 mM, NaCl 30 mM, pH = 8,8. El eluato con la proteína Prn2 purificada se dializó contra el tampón 20 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH = 8,0 y se almacenó a T = -20 °C.

Todos los procedimientos cromatográficos para las tres proteínas se realizaron a T = 23 ± 2 °C.

Las proteínas purificadas PTg, FHA y Prn2 se analizaron por SDS-PAGE según lo descrito (acápite 3.12). Y se visualizaron por tinción con plata con el estuche comercial *Pierce™ Silver Stain Kit*, EE.UU.

Para la inmunoidentificación de PTg y FHA se utilizó el ensayo de *Western blotting* descrito antes (acápite 3.13) con los AcMs anti-S1 99/512 y 99/570 respectivamente, diluidos 1:250. Los AcMs proceden del Instituto Nacional de Estándares y Controles Biológicos, NIBSC (por sus siglas en inglés *National Institute for Biological Standards and Control*).

Además, las proteínas PTg, FHA y Prn2 purificadas se caracterizaron mediante espectrometría de masas según lo descrito (acápite 3.14).

3.16.4 Determinación de la concentración endotoxinas en las proteínas purificadas

La estimación de la concentración de endotoxinas en las muestras purificadas se realizó con el estuche comercial *Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit* (Thermofisher, EE.UU), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

3.16.5 Estimación de la concentración de PTg, FHA y Prn2 purificadas

La estimación de la concentración de proteínas se realizó por el método del ácido bicinonínico (Brown y cols., 1989). Se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) de concentraciones conocidas (0,1-1,0 mg/mL). Particularmente, la proteína PTg se estimó adicionalmente por ELISA (Ver acápite 3.18).

3.16.6 Estimación de la pureza, cantidades totales y rendimientos de las proteínas purificadas

El porcentaje de pureza de cada proteína respecto a las proteínas totales, se determinó por análisis densitométrico de su perfil en SDS-PAGE mediante el programa ImageJ, versión 1.33 (NIH, EE.UU).

Las cantidades totales de las proteínas purificadas se estimaron con la fórmula general:

$$\text{mg totales de proteína purificada} = \text{concentración (mg/mL)} \times \text{volumen (mL)} \times \text{porcentaje de pureza} / 100 \%$$

El rendimiento de las diferentes pertactinas recombinantes obtenidas de *E. coli* se estimó por la fórmula:

$$\text{Rendimiento (mg/g peso húmedo de biomasa)} = \text{mg totales de proteína purificada} / \text{peso húmedo de la biomasa o precipitado celular de partida (g)}$$

El rendimiento de las proteínas purificadas PTg, FHA y Prn2 obtenidas de *B. pertussis* se expresó en mg por litro de cultivo (caldo fermentativo) y se estimó por la fórmula:

$$\text{Rendimiento (mg/L)} = \text{mg totales de proteína purificada} / \text{volumen de caldo fermentativo (L)}$$

3.17 ELISA utilizado en la inmunoidentificación de las proteínas Prn y PRH purificadas a partir de *Escherichia coli*

Las diferentes pertactinas se evaluaron con los AcMs de origen murino Pem1, Pem4, PeM19 y PeM29 según lo informado por Hijnen y cols (Hijnen y cols., 2004; Hijnen y cols., 2005). Los AcMs Pem1 y Pem4 se generaron al inmunizar ratones con la proteína Prn1. El AcM Pem4 reconoce el epitopo lineal ₂₄₇GGFGPGGFGP₂₅₆ presente en la R1 de Prn1 y Prn2. El AcM Pem1 une el epitopo discontinuo formado por los motivos ₉₉TWDDD₁₀₃ ubicado en el extremo amino, ₂₅₂GGFGPVLDGW₂₆₁ en la R1 y PAPQPP en la R2. La región variable dos no fue incluida en la estructura tridimensional informada por Emsley y cols (Emsley y cols., 1996). Los AcMs Pem29 y Pem19 se generaron al inmunizar ratones con la proteína Prn2. El AcM Pem29 reconoce un epitopo discontinuo conformado por los motivos de unión ₁₁GERQH₁₅,

²⁰QGSDPGGV₂₄ y ⁹⁷GDTWDDD₁₀₃ localizados en lazos próximos al extremo amino, así como la secuencia ²⁴⁷GGFGPGGFGP₂₅₆ ubicada en el lazo de la R1. El AcM Pem19 une el epitopo lineal RELSA presente en el extremo carboxilo. La secuencia ⁵⁷⁰RELSA₅₇₄ reside en la región no incluida en la estructura tridimensional informada por Emsley y cols (Emsley y cols., 1996). Además, las proteínas se analizaron frente a un panel de 10 sueros de voluntarios sanos, obtenidos un mes después de administrar una dosis de refuerzo con la vacuna ADACEL (Sanofi Pasteur, Francia, tabla 1).

Las placas de microtitulación de poliestireno con 96 pozos de alta capacidad de unión (Costar® *Corning Incorporated*, EE.UU.) se sensibilizaron con 100 µL/pozo de las proteínas P.69 (Prn1) obtenida en *B. pertussis* (Novartis, Italia), así como Prn1, Prn2, PRH1-2, PRH1-CC-2, PRH1-CL-2, PRH2-1, PRH2-CC-1, PRH2-CL-1 y BSA como control negativo, todas a una concentración de 2 µg/mL y diluidas en 0,05 M de tampón carbonato-bicarbonato pH = 9,6. Seguidamente, cada pozo se bloqueó con 200 µL del tampón PBS-TB (1 % de BSA, m/v y 0,1 % de Tween 20 v/v en PBS) durante 2 h a 37 °C. El reconocimiento antigénico de cada una de las proteínas se realizó al añadir 100 µL/pozo de los diferentes AcMs específicos, sueros humanos o el control, cada uno diluidos apropiadamente en el tampón PBS-TB y luego se incubó durante 1 h a 37 °C. En un experimento previo los AcMs se normalizaron a 0,5 mg/mL y se titularon contra P.69 (Prn1) mediante diluciones seriadas dobles a partir de 1: 2000. A partir de los resultados se definieron las siguientes diluciones de los AcMs: Pem1 en 1:12 000; Pem4 en 1: 4000; PeM19 en 1: 6000 y PeM29 en 1:28 000. Las diluciones determinadas por este método ofrecieron valores de densidades ópticas ($Abs_{492\text{ nm}}$) entre 0,7 y 1,0 en un intervalo lineal ($r^2 = 0,997$). Los sueros humanos se diluyeron 1:100. Posteriormente, se añadió 100 µL/pozo del anticuerpo de carnero anti-IgG total de ratón conjugado a la peroxidasa de rábano picante (HRP del inglés, *horseradish peroxidase*) (Sigma, EE.UU) y se incubó durante 30 min a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces después de cada paso con PBS-T. Posteriormente, se añadió la solución sustrato: 500 µg/mL de orto-fenilendiamina y 0,015 % (v/v) de peróxido de hidrógeno diluidos en tampón citrato-fosfato (ácido cítrico 0,2 M, hidrógeno fosfato de sodio 0,1 M, pH 5,0) y peróxido de hidrógeno 0,006% (v/v), seguido de una incubación a $T = 23 \pm 2$ °C durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL/pozo de la solución 2 M de H₂SO₄. La densidad óptica (DO) de los pozos se determinó a una longitud de onda de 492 nm. Se consideraron positivas las muestras ensayo con valores mayores o iguales al doble de las DO obtenidas con el control negativo del experimento.

Este ensayo se utilizó para evaluar el reconocimiento de las proteínas P.69 (Prn1), Prn1, Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 después de incubar cada una a 95 °C durante 2 min. Las proteínas desnaturalizadas a 95 °C se compararon en la misma placa de microtitulación con las proteínas incubadas a 25 °C. Los AcMs y los sueros se ensayaron con 10 réplicas cada uno. Los AcMs se diluyeron según lo descrito arriba, mientras que los sueros murinos generados específicamente contra cada proteína, se diluyeron 1:1000. El porcentaje de reconocimiento se calculó según la fórmula:

$$\text{Porcentaje de reconocimiento} = \text{señal (DO}_{492\text{nm}}) \text{ de la Proteína a } 95^\circ\text{C} / \text{señal (DO}_{492\text{nm}}) \text{ de la Proteína a } 25^\circ\text{C} \times 100$$

3.18 ELISA para la identificación y la estimación de la concentración de PTg obtenida a partir de *Bordetella pertussis*

La identidad de PTg se verificó por un ELISA de producción nacional (manuscrito en preparación). Brevemente, placas de microtitulación de poliestireno de 96 pozos de alta capacidad de unión (Costar® Corning Incorporated, EE.UU.) se sensibilizaron con 100 µL/pozo de fetuina a 40 µg/mL (Sigma-Aldrich, EE.UU) como reactivo de captura. Seguidamente, cada pozo se bloqueó con 200 µL del tampón PBS-TB (1 % de BSA, m/v y 0,1 % de Tween 20 v/v en PBS) durante 2 h a 37 °C. La captura se realizó al añadir 100 µL/pozo de las muestras ensayo, la curva patrón y los controles, cada uno diluidos en el tampón PBS-TB y luego se incubó durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se añadió 100 µL/pozo del AcM anti-subunidad S1 de PT conjugado a HRP diluido en el tampón de la muestra y se incubó durante 30 min a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces después de cada paso con PBS-T. Luego, se añadieron 100 µL de la solución de sustrato (10 µg/mL de TMB- 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich, EE.UU.) en tampón citrato-fosfato (ácido cítrico 0,2 M, hidrógeno fosfato de sodio 0,1 M, pH 5,0) y peróxido de hidrógeno 0,006%, seguido de una incubación de 10 min a T = 22 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL/pozo de la solución 2 M H₂SO₄. La DO de los pozos se determinó a una longitud de onda de 450 nm. Se consideraron positivas las muestras ensayo con valores mayores o iguales al doble de las DO obtenidas con el control negativo del experimento. La concentración de PTg se calculó utilizando el programa *GraphPad Prism*, versión 6.01. La proteína de referencia JN1H 90/518 (PT, NIBSC, UK) se utilizó como estándar en el ensayo de inmunoabsorción para la estimación de concentración de PTg en el sobrenadante de cultivo.

3.19 ELISA para la detección de Ac específicos a los antígenos PTg, FHA, Prn1 y Prn2

Para la detección de Ac IgG específicos en los sueros de los ratones inmunes y los controles se utilizó procedimiento basado en el informado por Hijnen y cols (Hijnen y cols., 2005). Las placas de microtitulación de poliestireno de 96 pozos de alta capacidad de unión (Costar® *Corning Incorporated*, EE.UU.) se recubrieron por separado con los antígenos PTg, FHA, Prn1 o Prn2. A cada pozo se añadió 100 μ L de PTg a 2 μ g/mL, Prn (Prn1 o Prn2) a 2 μ g/mL o FHA a 5 μ g/mL diluidos en 0,1 M de tampón carbonato-bicarbonato pH = 9,6, seguido de una incubación de 3 h a 37 °C. Seguidamente, cada pozo se bloqueó con 200 μ L de leche descremada al 4% (m/v) (Oxoid, UK) en PBS-T durante 1 h a 37 °C. Los sueros se añadieron a los pozos a diluciones 1:100, 1:1000 y 1:5000 en PBS-T y se incubaron durante 2 h. En cada ELISA se incluyó un suero inmune obtenido de ratones inmunizados con la vacuna ADACEL, como curva de referencia con 100 unidades arbitrarias de titulación. Luego, las placas se incubaron a 37 °C por 1 h con un anticuerpo de carnero anti-IgG de ratón conjugado a HRP (Sigma-Aldrich, EE.UU) diluido 1:2 000 en PBS-T. Las placas se lavaron con PBS-T tres veces después de cada paso. Posteriormente, se añadió la solución sustrato: 500 μ g/mL de orto-fenilendiamina y 0,015 % (v/v) de peróxido de hidrógeno diluidos en tampón citrato-fosfato (ácido cítrico 0,2 M, hidrógeno fosfato de sodio 0,1 M, pH 5,0) y peróxido de hidrógeno 0,006% (v/v), seguido de una incubación a $T = 23 \pm 2$ °C durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ L/pozo de la solución 2 M H_2SO_4 . La DO se determinó a una longitud de onda de 492 nm. Se consideraron positivos los sueros de los ratones inmunes con valores mayores o iguales al doble de las DO obtenidas respecto a los sueros control negativo del experimento.

Este ensayo se utilizó además para inmunoidentificar los antígenos PTg, FHA y Prn2 purificados de *B. pertussis* en su forma nativa con sueros murinos generados contra la vacuna comercial ADACEL (Tabla 1). Para obtener el panel de ocho sueros positivos y ocho negativos se inmunizaron grupos de ratones con dos inoculaciones espaciadas cada 21 días con $\frac{1}{4}$ de la dosis humana de la vacuna ADACEL (Sanofi Pasteur, Francia) y el control negativo basado en alúmina en PBS, respectivamente. Catorce días después de administrar la segunda dosis, se sangraron los animales y se procesó la sangre para obtención de los sueros.

Adicionalmente, los sueros de los grupos inmunizados se ensayaron (diluidos 1:500) contra péptidos lineales de regiones involucradas en la protección contra *B. pertussis*. Para este ensayo se recubrió con 5

μg/mL del péptido: P1, RGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDW, cuya secuencia se localiza en la R1 de Prn1; el péptido P2, RGDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVGGLGDW, cuya secuencia está presente en la R1 de Prn2, el péptido P3, PQPGPQQPPQPPQPEAPAPQPPAG, cuya secuencia se sitúa en la R2 y el péptido P4, IVKTGERQHGIHIQGSDP, cuya secuencia se ubica en el dominio inmunodominante del extremo amino.

La determinación de las clases (IgM e IgA) y subclases de inmunoglobulina (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) se realizó mediante un procedimiento similar pero con la ayuda del estuche comercial de isotipificación de ratón (Sigma-Aldrich, EE.UU). Para este ensayo los sueros se evaluaron diluidos 1:250 o 1:500 y aparecen especificadas en el texto según el ensayo.

3.20 Experimentos en ratones

En los experimentos se utilizaron ratones hembras, BALB/c isogénicos (Bc, H-2d) y CENP OF-1 no consanguíneos (OF-1), suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana). Para los ensayos de inmunogenicidad los ratones se seleccionaron aleatoriamente, con una edad de seis semanas y un peso promedio de 19 g ± 1 g. Estos animales se manipularon en el Bioterio del CIGB. Para los ensayos en el modelo de reto intracerebral modificado (MICA, del inglés, *modified intracerebral challenge assay*) los ratones se seleccionaron aleatoriamente con un peso promedio de 12 g ± 1 g. Este ensayo se realizó en el departamento de ensayos biológicos del Centro Nacional de Biopreparados (Biocen, Mayabeque, Cuba), como parte de un acuerdo de servicio de colaboración con el CIGB. En las inmunizaciones los antígenos se adyuvaron con hidróxido de aluminio (Brenntag Biosector, Dinamarca) en una relación másica 1 : 80 (μg antígeno : μg adyuvante). Los ratones se mantuvieron en cajas con filtros bajo condiciones libres de patógenos. Todos los experimentos con animales se realizaron en correspondencia con las Guías aprobadas por el Comité Nacional de Ética y Regulación de la República de Cuba.

3.20.1 Ensayo para la determinación de la dosis mínima inductora de Ac específicos contra pertactina

Los grupos (n = 10) de ratones BALB/c se inmunizaron por la vía subcutánea con dosis de 2; 0,2; 0,02; y 0 μg/ratón de la proteína natural P.69 (Prn1) purificada a partir de *B. pertussis* (Novartis, Italia) y un volumen de 100 μL. Los animales se inmunizaron en los días 0, 14 y 28 y se sangraron el día 42. La detección de Ac IgG específicos en los sueros se evaluó con la proteína P.69 (Prn1) mediante ELISA.

3.20.2 Ensayo de inmunogenicidad de las proteínas Prn1, Prn2 y PRH obtenidas en *Escherichia coli* en ratones

La capacidad de las diferentes variantes de pertactina de inducir una respuesta de Ac se evaluó en ratones BALB/c. Los grupos (n = 9) se inmunizaron por la vía subcutánea con dosis de 0,2 µg/ratón de los antígenos, P.69 (Prn1), Prn1, Prn2, PRH1-2, PRH1-CC-2, PRH1-CL-2, PRH2-1, PRH2-CC-1 y PRH2-CL-1 y un volumen de 100 µL. Los animales se inmunizaron en los días 0, 14 y 28 y se sangraron los días -7, 14, 28 y 42. La proteína P.69 (Prn1) se utilizó como control positivo del ensayo. La detección de Ac IgG específicos en los sueros se evaluó mediante ELISA recubriendo con las proteínas Prn1 y Prn2 según lo descrito (acápite 3.19).

3.20.3 Ensayo de inmunogenicidad con las preparaciones PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1

El ensayo se realizó según las normas y procedimientos descritos (WHO, 2012). Los antígenos PTg, FHA, Prn2 purificados de *B. pertussis* y PRH2-1, se evaluaron como preparaciones de tres componentes PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1, en ratones BALB/c y OF-1. Los grupos (n = 10) se inmunizaron por la vía intraperitoneal con dosis de 5/2,5/2,5 µg/ratón y un volumen de 500 µL. El grupo control negativo se inoculó con el adyuvante diluido en PBS. Los ratones recibieron dos inoculaciones en los días 0 y 21 y se sangraron los días -2, 21 y 42. Los títulos de Ac IgG contra PTg, FHA, Prn1 y Prn2 en los sueros se determinaron mediante el ELISA descrito en el acápite 3.19.

3.20.4 Ensayo para la inducción ex vivo de la secreción de IFN γ , IL-4, IL-5 e IL-17 y determinación de sus concentraciones mediante ELISA

Las células del bazo de los ratones inmunizados y los controles se obtuvieron en condiciones asépticas y los eritrocitos se lisaron por incubación (2 min) con una solución de NH₄Cl 0,83 % (m/v). Las células se lavaron tres veces con PBS, SFB al 2 % (v/v) y se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (Gibco, Reino Unido), 2 mM de glutamina (Gibco, Reino Unido), 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma, EE.UU) y SFB 5 % (v/v). Las células se sembraron a una concentración final de 2×10^6 células/mL en placas de 6 pozos (Costar, EE.UU) y se estimularon por duplicado con las proteínas PTg, FHA y Prn2 purificadas de *B. pertussis* a una concentración final de 10 µg/mL. La concanavalina A (Sigma, EE.UU) se usó como control positivo de estimulación a una concentración de 5 µg/mL. Las células en presencia del medio se usaron como control negativo. Luego de 96 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se colectaron los sobrenadantes de cultivo. La concentración de las linfocinas en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante ELISA con los siguientes

estuches comerciales de *Thermo Scientific*: IFN γ , KMC4021, límite de detección (LD) < 2 pg/mL; IL-4, EMIL4, LD < 5 pg/mL; IL-4, KMC0051, LD < 5 pg/mL; IL-4, KMC3021, LD < 5 pg/mL. Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.20.5 Evaluación del efecto protector de las proteínas Prn1, Prn2, PRH2-1 y PRH1-CL-2 en el ensayo de reto intracerebral modificado

El ensayo se realizó según las normas y procedimientos descritos (WHO, 2012; Xing y cols., 2014a). El efecto protector de cada una de las proteínas Prn1, Prn2, PRH2-1 y PRH1-CL-2 se evaluó con tres dosis 25, 5 y 1 (μ g/ratón), en ratones OF-1 frente a la cepa letal BP18323. El control positivo del ensayo consistió en 0,5 Unidades Internacionales (UI) de la preparación celular de *B. pertussis* VPR (99) 11, la cual confiere una protección del 92 % \pm 5 %. Esta preparación se utiliza como estándar nacional de referencia en Cuba en el ensayo de reto intracerebral. Está compuesta por la cepas de *B. pertussis* BP165 (Prn1) (Proenza-Alfonzo y cols., 2013) y BP509 (Prn7) (Bottero y cols., 2007). El grupo control negativo recibió PBS en alúmina. Los grupos (n = 17) se inmunizaron una vez por la ruta intraperitoneal con los diferentes inmunógenos en un volumen de 500 μ L. Después de 21 días, los ratones de los diferentes grupos recibieron una inoculación intracerebral con 25 μ L (7×10^4 unidades formadoras de colonia, UFC) de la cepa *B. pertussis* BP18323 (Prn6) resuspendida en hidrolizado de caseína al 1 % (m/v) (Sigma-Aldrich, EE.UU) en PBS. Los animales se observaron durante 14 días y se registró la supervivencia.

3.20.6 Evaluación del efecto protector de las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 en el ensayo de reto intracerebral modificado

El experimento se realizó mediante un ensayo de reto similar al descrito en el acápite anterior. En la tabla 2 se especifican las combinaciones antigénicas y las dosis utilizadas.

Tabla 2. Variables del esquema de inmunización utilizado para la evaluación del efecto protector de las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 en el ensayo MICA.

Grupo	Inmunógeno	Dosis (µg/ratón)
1	PTg/FHA/Prn2	5/2,5/2,5
2		1/0,5/0,5
3		0,2/0,1/0,1
4	PTg/FHA/PRH2-1	5/2,5/2,5
5		1/0,5/0,5
6		0,2/0,1/0,1
7	PTg/FHA/PRH1-CL-2	5/2,5/2,5
8		1/0,5/0,5
9		0,2/0,1/0,1
10	PTg/FHA/Prn1*	5/2,5/2,5
11		1/0,5/0,5
12		0,2/0,1/0,1
13	PTg/FHA	5/2,5
14		1/0,5
15		0,2/0,1
16	VPR (99) 11 (Control positivo)	0,5 UI
17	Alúmina + PBS (Control negativo)	0

* Proteína Prn1 obtenida en *E. coli*

3.21 Análisis Estadístico

El programa *GraphPad Prism* versión 6.01 (*GraphPad Software*, San Diego California, EE.UU, www.graphpad.com) se utilizó para realizar los análisis estadísticos. La normalidad de los datos pertenecientes a los diferentes grupos muestrales se analizó mediante la prueba de *D'Agostino-Pearson* y seguidamente, la homogeneidad de varianza mediante la prueba de *Bartlett*. Los datos primarios o transformados que satisficieron ambas pruebas se examinaron posteriormente con un análisis paramétrico. Para encontrar diferencias generales entre las medias de tres o más grupos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple; para detectar diferencias entre los grupos se utilizó

la prueba de comparación múltiple *a posteriori* de *Tukey*. Para encontrar diferencias entre las medias de dos grupos se realizó la prueba paramétrica no pareada *t-student*. Los datos primarios o transformados que no cumplieron con la normalidad o la homogeneidad de varianza se examinaron con un análisis no paramétrico. Para encontrar diferencias entre las medianas de tres o más grupos se realizó la prueba de *Kruskal-Wallis*, y a continuación la prueba de comparación múltiple *a posteriori* de *Dunn*. Para encontrar diferencias entre las medianas de dos grupos se realizó la prueba no pareada U de *Mann-Whitney*. Para encontrar diferencias estadísticas entre el tiempo de supervivencia entre los grupos retados con la cepa letal BP18323 se compararon las curvas completas mediante la prueba de *Log-rank*. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ y se representaron con letras diferentes en minúscula.

4 RESULTADOS

Para evaluar el efecto de la variación tipo dos en la protección contra *B. pertussis* en preparaciones acelulares de tres componentes, se trazó la siguiente estrategia. Por una parte, se concibió la obtención, a partir de *E. coli*, de las proteínas Prn1, Prn2 así como variantes de PRH que incluyen las variaciones de tipo uno y dos. Luego, se procedió a la evaluación de su inmunogenicidad y capacidad protectora en ratones. Por otra parte, se consideró la obtención de PTg, FHA y Prn2 a partir de *B. pertussis*. La inmunogenicidad y capacidad protectora de las pertactinas Prn2 y PRH se evaluó en ratones como preparaciones vacunales de tres componentes PTg/FHA/Prn2 o PTg/FHA/PRH.

4.1 Obtención de una PRH a partir de *Escherichia coli* en cuyo diseño se incluyen las R1 de pertactina tipo uno y dos

4.1.1 Diseño de proteínas híbridas de las variantes de pertactina tipo uno y dos

A partir de la estrategia descrita en el acápite 3.5, se modeló la proteína Prn2 de forma automática y luego se determinó el segmento de la hélice beta que interacciona con el lazo de la R1 para los modelos 1DAB.pdb (Prn1) y Prn2. Además, se construyó el diagrama topológico de pertactina a partir de la asignación de las hebras beta de la estructura tridimensional presente en la base de datos 1DAB.dssp. Estos análisis permitieron definir los fragmentos A y B, cada uno con la R1 de una variante diferente de pertactina. Los fragmentos al fusionarse, deben favorecer la obtención de una PRH con una hélice beta en la cual, las tres láminas beta mantengan la misma disposición espacial de la pertactina natural. La factibilidad de este diseño se verificó mediante la fusión virtual de los fragmentos A y B y la evaluación de los modelos obtenidos. Adicionalmente, a partir de la comparación de diferentes secuencias de pertactina, se seleccionó una secuencia conservada de la región del plegamiento de pertactina. Esta secuencia se utilizó con el propósito de evaluarla como un conector entre los fragmentos A y B. Como resultado de estos análisis se diseñaron un total de seis variantes de PRH.

La calidad del modelo obtenido para la proteína Prn2 alcanzó una puntuación de 0,1, la cual se encuentra dentro de los límites de confianza del servidor [-5,2], en el cual los mayores valores indican modelos de mayor confianza. Para este modelo la desviación cuadrática media (DCM) fue de $7,8 \pm 4,4$ Angstrom.

Los contactos con el lazo R1 para las proteínas Prn1 y Prn2 se encontraron en un segmento de la hélice beta acotado por las hebras beta $_{92}\text{TLAN}_{95}$ y $_{264}\text{VDVS}_{267}$, tomando como referencia la estructura 1DAB.pdb (Figura 7 A y Figura 8). Posteriormente, se analizó la similitud de las vueltas de la hélice beta

que contienen las hebras que acotan el segmento. La vuelta de la hélice beta de 1DAB.pdb (Prn1) definida por las hebras beta $_{92}\text{TLA}_{94}$, $_{79}\text{VTV}_{81}$, y $_{85}\text{KLVAD}_{89}$ correspondientes a las láminas beta B, C y A, se superpuso a la vuelta definida por las hebras beta $_{264}\text{VDV}_{266}$, $_{270}\text{SVELA}_{274}$ y $_{277}\text{IVE}_{279}$ correspondientes también a las láminas beta B, C y A. La DCM de los átomos de los diferentes residuos entre ambas vueltas fue de 0,357 Angstrom. Luego de verificar la similitud entre las vueltas que definen la interface entre los fragmentos A y B se precisaron, manualmente, los sitios de corte. Como resultado el segmento $\text{T}_{92}\text{-S}_{267}$ se extendió en ambos extremos hasta $\text{V}_{81}\text{-S}_{269}$ en Prn1 y $\text{V}_{81}\text{-S}_{274}$ en Prn2. En la figura 7 B, se muestra que la proteína PRH1-2 se obtiene al fusionar los fragmentos A ($\text{D}_1\text{-S}_{269}$ de Prn1) y B ($\text{V}_{81}\text{-G}_{682}$ de Prn2). De igual forma se puede obtener la proteína PRH2-1 al fusionar los fragmentos A ($\text{D}_1\text{-S}_{274}$ de Prn2) y B ($\text{V}_{81}\text{-G}_{677}$ de Prn1). Por otra parte, en la figura 9 se muestra que la fusión de los fragmentos A y B permite que las hebras beta de las láminas A, B y C del fragmento B se continúen con las hebras beta de las láminas A, B y C del fragmento A, preservando la topología de la estructura secundaria de Prn.

Los modelos de las proteínas PRH1-2 y PRH2-1 que resultaron de la fusión de los fragmentos A y B se evaluaron virtualmente. La calidad obtenida para los modelos PRH1-2, PRH2-1 y el modelo cristalográfico fue parecida, con valores de 4,5, 3,5 y 3,5 respectivamente, según el servidor Prosess. En los modelos se preservó la regularidad topológica de la hélice beta de Prn. Por otro lado, la distancia entre los lazos R1 de Prn1 y Prn2 no permite impedimentos estéricos entre los mismos. (Anexo 4).

La secuencia conservada IDNATWVMTDN, presente en la región con funciones en el plegamiento (Figura 7 A, Anexo 5), se seleccionó como conector corto (CC) y la duplicación en sucesión de esta secuencia, IDNATWVMTDNIDNATWVMTDN, como conector largo (CL) (Figura 7 B).

La secuencia CL podría constituir un paso quimérico en la hélice beta de pertactina. La inserción de CL entre A y B podría modular positivamente el plegamiento del fragmento A, el cual constituye una extensión de la hélice beta, y además aumentar la distancia entre los lazos R1. Se diseñaron un total de seis variantes híbridas, las tres primeras designadas como PRH1-2, PRH1-CC-2 y PRH1-CL-2 (serie 1-2, Figura 7 C), en las cuales la R1 de Prn1 se posiciona próxima al extremo amino. Por el contrario, en las proteínas PRH2-1, PRH2-CC-1 y PRH2-CL-1 (serie 2-1, Figura 7 C), la R1 de Prn2 está próxima al extremo amino.

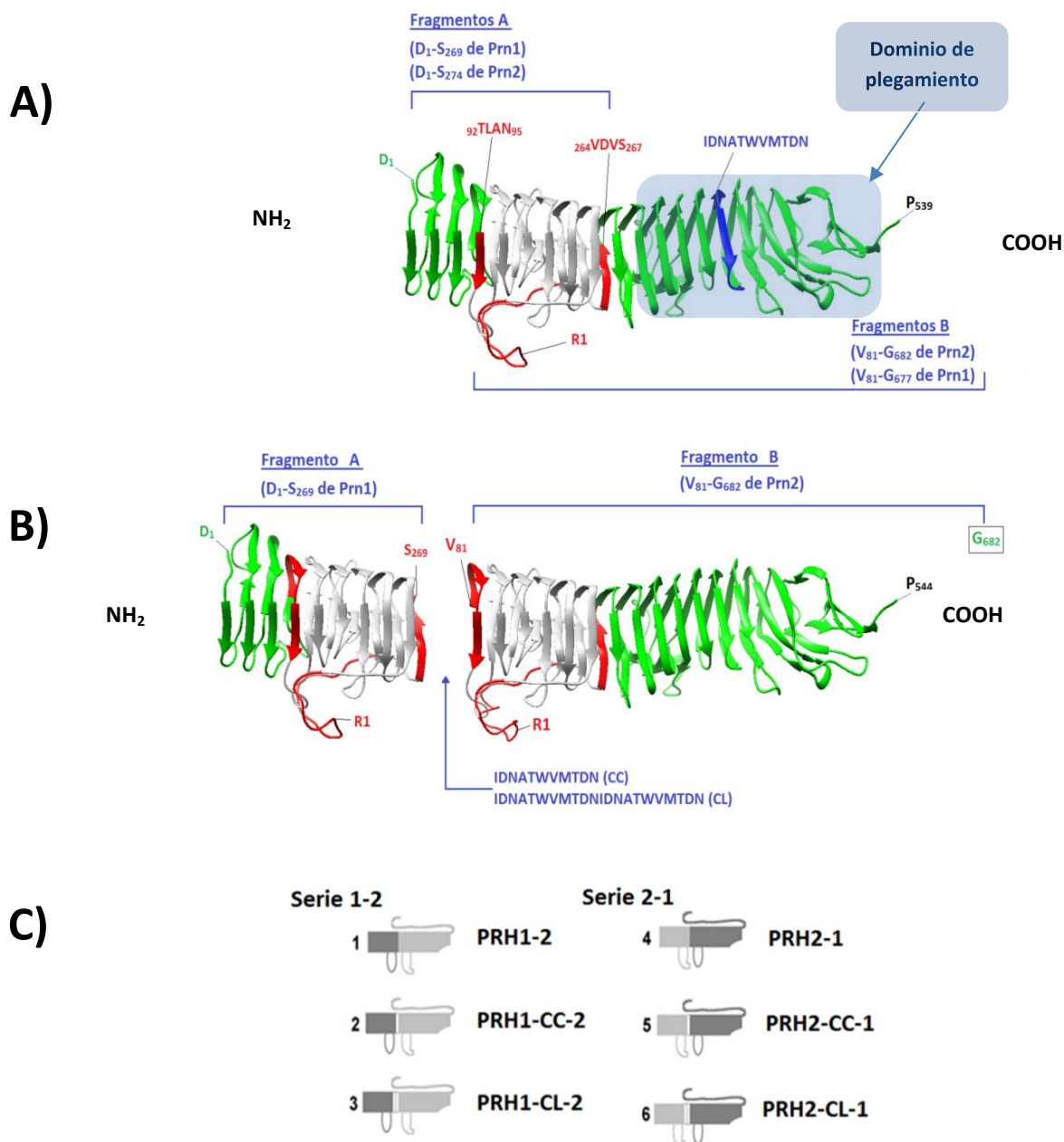


Figura 7. Diseño de las pertactinas recombinantes híbridas de Prn1 y Prn2. **A)** Representación de la estructura tridimensional de pertactina en sección longitudinal desde D₁ hasta P₅₃₉, los últimos 138 aa no se incluyeron en la estructura informada por Emsley y cols, 1996. Los contactos del lazo R1 se ubican en un segmento de la hélice beta acotado por las hebras beta 92TLAN₉₅ y 264VDVS₂₆₇. En color azul se destaca la ubicación de la secuencia IDNATWVMTDN, la cual se ubica en el dominio de plegamiento que aparece sombreado. Los segmentos señalan los límites de los fragmentos A y B. **B)** La proteína PRH1-2 se obtiene al fusionar el fragmento A = D₁-S₂₆₉ de Prn1, con el fragmento B = V₈₁-G₆₈₂ de Prn2. Las secuencias IDNATWVMTDNIDNATWVMTDN y IDNATWVMTDN se insertaron entre A y B como conectores CL y CC, conector largo y corto, respectivamente. NH₂ y COOH, extremo amino y carboxilo, respectivamente **C)** Se diseñaron dos series de PRH con tres variantes cada una. La serie 2-1 posiciona la R1 de Prn2 próxima al extremo amino y viceversa para la serie 1-2. En gris oscuro se representa el fragmento proveniente de Prn1 y en gris claro el fragmento derivado de Prn2.

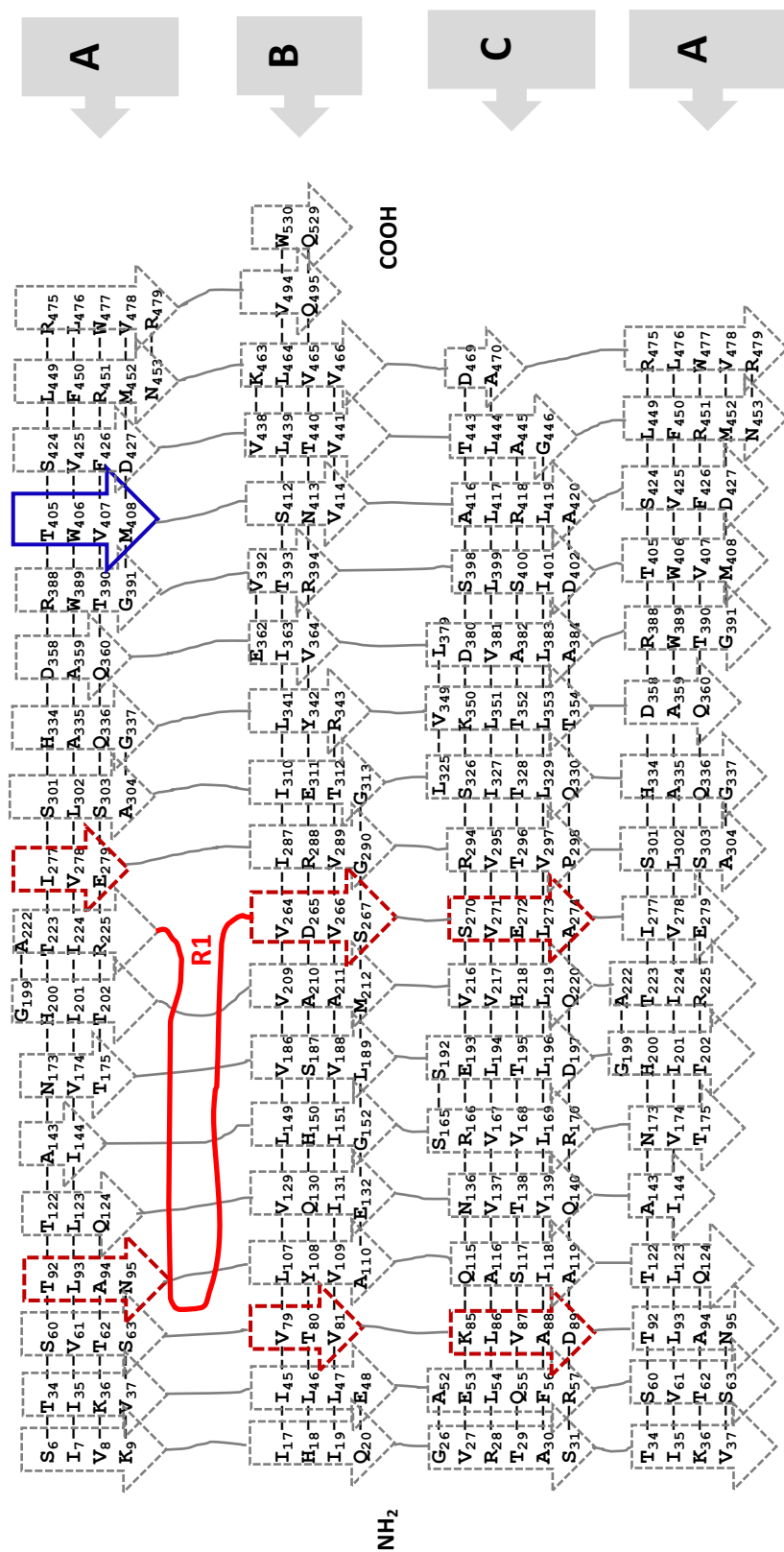


Figura 8. Diagrama topológico de la proteína pertactina, a partir de las asignaciones de estructura secundaria (hebras beta) de la estructura tridimensional 1DAB.pdb. La estructura secundaria de la proteína pertactina presenta tres láminas beta A, B y C. Las hebras beta de cada lámina se orientan paralelas e interactúan entre sí por interacciones no covalentes. La primera hebra beta de la lámina A (S₆L-V₄K₉) se conecta por un lazo a la hebra siguiente de la lámina B (I₁₇H₁₈L₁₉Q₂₀) y esta a la siguiente de la lámina C, para dar lugar a una cadena de hebras conectadas por lazos. Esta regularidad ordena en el espacio una hélice beta dextrógira. Las flechas discontinuas indican las hebras beta. Las líneas continuas que conectan las diferentes hebras beta indican los lazos. Los guiones entre residuos de hebras paralelas señalan interacciones entre hebras. La longitud de cada lazo está acotada por el final de una hebra beta y el comienzo de la siguiente. La línea roja indica el lazo de la R1. A la derecha, las flechas discontinuas señalan las láminas beta A, B y C. La lámina A se repite debajo de la lámina C para destacar la corta longitud (3 residuos) de los lazos que unen las láminas A y C. Las flechas discontinuas de color rojo indican las hebras beta de las vueltas de la hélice que acotan el segmento de la hélice beta con contactos con el lazo de la R1. La flecha continua de color azul indica la hebra beta presente en la secuencia IDNATWVM, utilizada como conector. NH₂ y COOH, extremo amino y carboxilo, respectivamente.

Fragmentos A

Di-S₂₆₉ de Pm1
Di-S₂₇₄ de Pm2

Fragmentos B

V₈₁-G₆₈₂ de Pm2 (PRH1-2)
V₈₁-G₆₇₇ de Pm1 (PRH2-1)

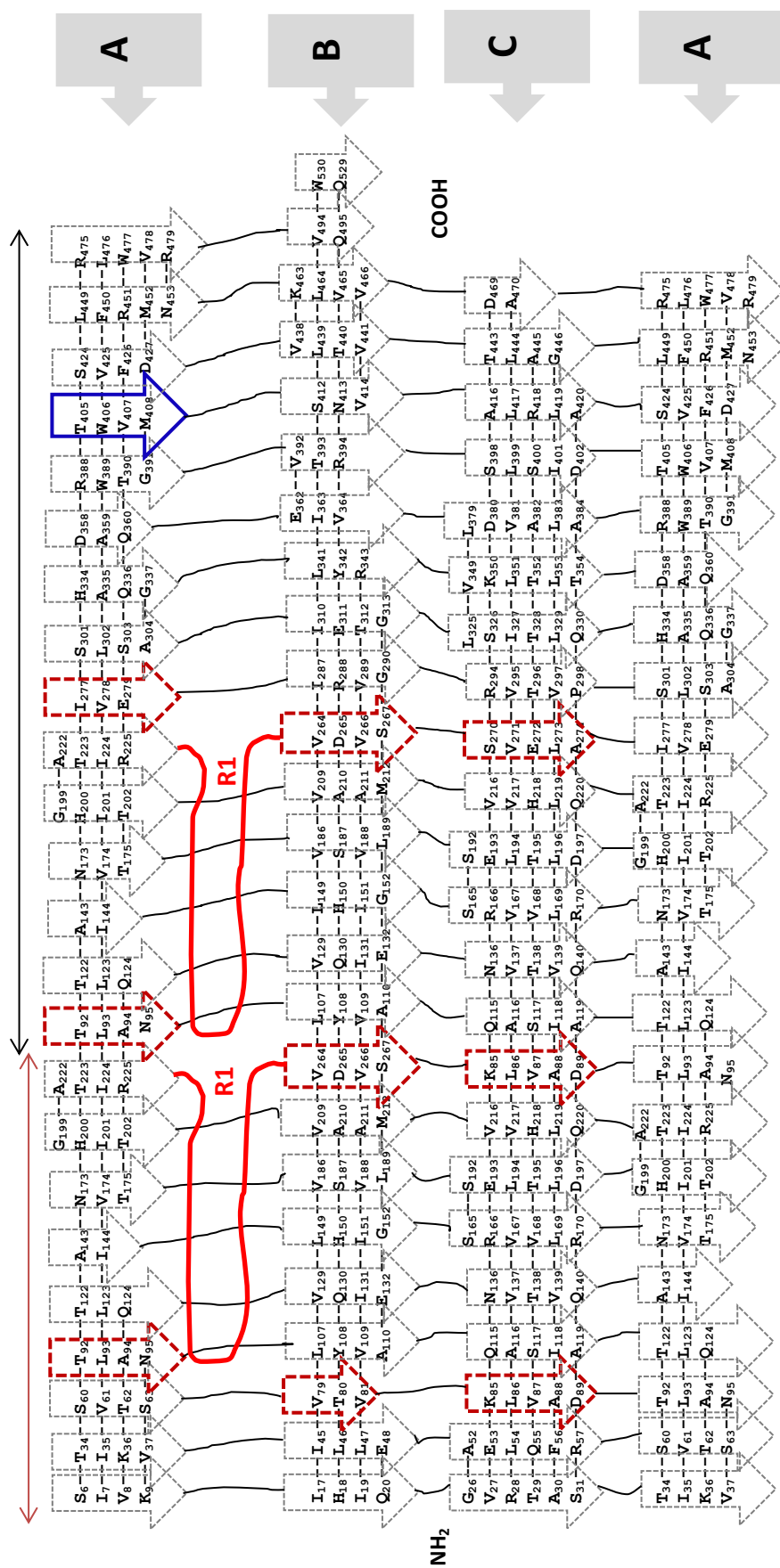


Figura 9. Diagrama topológico para las pertactinas recombinantes híbridas PRH1-2 y PRH2-1. Las flechas continuas de doble saeta representan los segmentos de las secuencias de los fragmentos A y B, que al ser fusionados dan lugar a las PRH. Las flechas paralelas con contorno discontinuo indican hebras beta. Los guiones entre residuos de hebras paralelas señalan interacciones no covalentes entre hebras. Las líneas continuas que conectan las flechas discontinuas (hebras beta) simbolizan los lazos. La longitud de cada lazo está acotada por el residuo final de una hebra beta y el primero de la siguiente. Con líneas rojas se representan los lazos de las R1. Las flechas discontinuas de color rojo indican las hebras beta de las vueltas de la hélice que acotan el segmento de la hélice beta con contactos con el lazo de la R1. La flecha continua de color azul indica la hebra beta presente en la secuencia IDNAIVWMTDN, utilizada como conector. A la derecha, las cajas grises señalan las láminas beta A, B y C. NH₂ y COOH, extremo amino y carboxilo, respectivamente.

4.1.2 Clonaje de los genes codificadores de Prn1, Prn2 y las moléculas PRH

Los genes *prnA1* y *prnA2* se amplificaron mediante la técnica de PCR. Se utilizó como molde el ADN cromosomal de las cepas de *B. pertussis* Tohama I y CH53, respectivamente. Los genes amplificados se purificaron y se clonaron en el vector de expresión en bacterias pET28a+ (Anexo 3), fusionados a una secuencia codificante para seis histidinas consecutivas y bajo el control del promotor T7. Los plasmidios positivos para la inserción de estos genes se verificaron mediante la SAUT y se comprobó que contenían las secuencias correspondientes a los genes *prnA1* y *prnA2*. Estos vectores se denominaron pET28a-*prn1* y pET28a-*prn2*, respectivamente (Anexo 3).

Los plasmidios para la expresión de los genes de las moléculas PRH se construyeron a partir de los moldes parentales pET28a-*prn1* y pET28a-*prn2* mediante la técnica de PCR según la metodología descrita en el acápite 3.10 (Figura 5). La figura 10 ejemplifica el procedimiento utilizado para construir el plasmidio pET28a-*prh1-2*, con el gen que codifica para la proteína PRH1-2. A partir de los plasmidios parentales se amplificaron los fragmentos complementarios A de 4996 pb y B de 2956 pb mediante PCR (Figura 10, carril 1). Los fragmentos A y B se ligaron y se seleccionó el plasmidio positivo por análisis de restricción con las endonucleasas Nde I y BamH I. En el análisis se escindieron los fragmentos de 2623 pb del gen híbrido y de 5329 pb, en correspondencia con el patrón de restricción esperado (Figura 10, carril 2).

La identidad del inserto se verificó mediante la SAUT por ambas cadenas y posteriormente la secuencia de ADN se tradujo en secuencia de aminoácidos (Anexo 6). Los genes codificadores para las pertactinas híbridas PRH1-CC-2, PRH1-CL-2, PRH2-1, PRH2-CC-1 y PRH2-CL-1, se obtuvieron al combinar parejas de oligonucleótidos cebadores con los moldes parentales y siguiendo el mismo procedimiento de selección de los clones positivos. De forma similar, los insertos se verificaron por SAUT y la secuencia se tradujo en secuencia de aminoácidos (Anexo 6).

4.1.3 Expresión de los genes codificadores de Prn1, Prn2 y las moléculas PRH

Los plasmidios recombinantes de expresión se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* BL21 (DE3) Codonplus RP. Después de la inducción génica, el análisis de las proteínas totales de los transformantes con las diferentes construcciones, mostró bandas mayoritarias entre 66 y 97 kDa para las proteínas Prn1 y Prn2 (Figura 11 A, carriles 1 y 2) así como bandas mayoritarias a la altura de 97 kDa para las proteínas PRH (Figura 11 B, carriles 3 al 8).

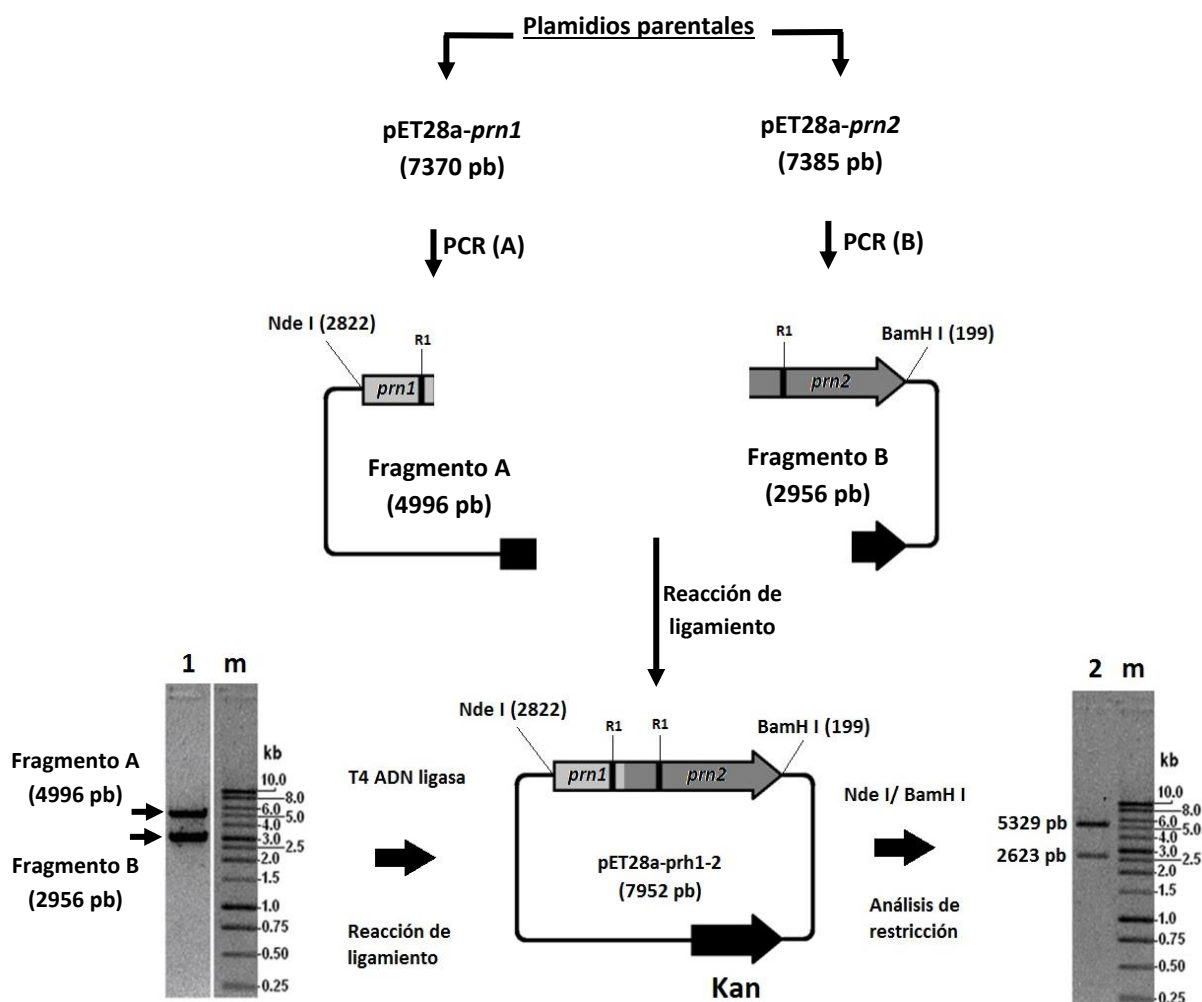


Figura 10. Diagrama de la estrategia utilizada para la construcción del plasmidio pET28a-prn1-2 a partir de pET28a-prn1 y pET28a-prn2. El fragmento A de 4996 pb, con un segmento del gen *prnA1* se amplificó mediante PCR. Se utilizó como molde el plasmidio pET28a-prn1 y los oligonucleótidos cebadores 1 y 2. El fragmento B de 2956 pb, con el segmento del gen *prnA2*, se amplificó a partir del plasmidio pET28a-prn2 y los oligonucleótidos cebadores 5 y 6. Carril 1, análisis de los fragmentos A y B (mezclados antes de su aplicación en el pozo), mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % con bromuro de etidio. Carril m: referencia de talla molecular en kilo bases, kb. Los fragmentos A y B complementarios se combinaron en una reacción de ligamiento para obtener el plasmidio pET28a-prh1-2 de 7952 pb. La construcción se analizó por análisis de restricción con las endonucleasas Nde I y BamH I. Carril 2, fragmentos del vector y el gen híbrido. Carril m: referencia de talla molecular.

En todos los clones analizados las bandas, cuya síntesis se indujo, migraron a la talla esperada de las moléculas de pertactina. Las bandas mayoritarias representaron entre el 25 % y 30 % del total de proteínas de la bacteria, según el análisis densitométrico de los geles SDS-PAGE. El análisis mediante *Western blotting* evidenció el reconocimiento específico de estas bandas por el AcM Pem19 (Figura 11 C y D).

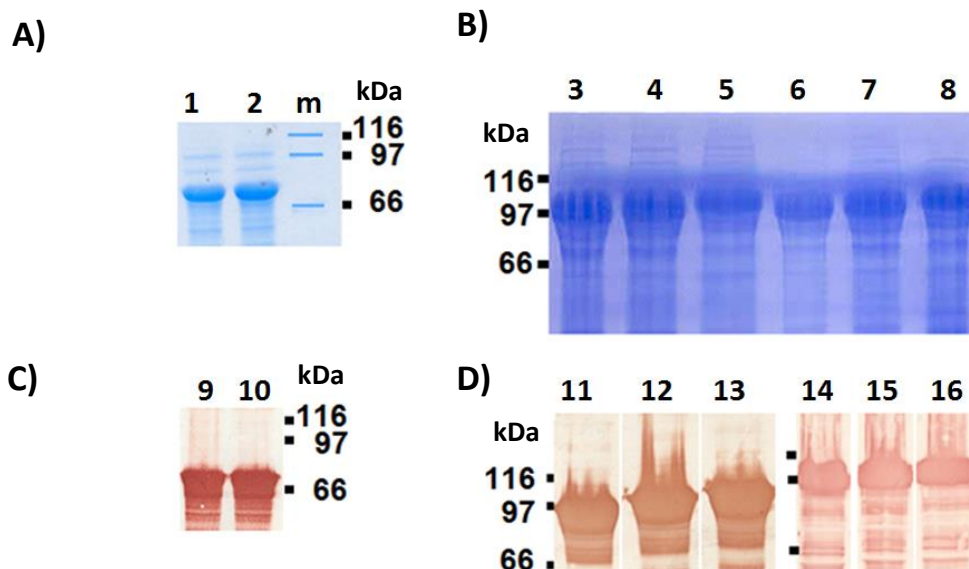


Figura 11. Caracterización de las proteínas Prn y PRH producidas en *E. coli* BL21(DE3) Codonplus RP. A y B) SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras de muestras de células totales de cada uno de los transformantes con las construcciones para Prn y PRH. Las proteínas se visualizaron con la tinción de azul Coomassie. Carriles 1 y 2, Prn1 y Prn2, respectivamente, m patrón de talla molecular en kDa (RPN5800, GE Healthcare). Carriles 3 al 8: PRH1-2, PRH1-CC-2, PRH1-CL-2, PRH2-1, PRH2-CC-1 y PRH2-CL-1 respectivamente. C y D) Inmunoidentificación mediante *Western blotting* con el AcM Pem19 de las pertactinas. Carriles 9 al 16: Prn1, Prn2, PRH1-2, PRH1-CC-2, PRH1-CL-2, PRH2-1, PRH2-CC-1 y PRH2-CL-1 respectivamente.

4.1.4 Caracterización de las proteínas Prn1, Prn2 y las seis PRH producidas en *Escherichia coli* por espectrometría de masas

La identidad de cada una de las bandas mayoritarias, en los extractos de proteínas totales de los transformantes con los plasmidios de expresión, se evaluó por espectrometría de masas. Para las ocho proteínas analizadas se encontraron secuencias pertenecientes a la proteína pertactina de *B. pertussis* con un alto nivel de confianza (score: 900-1300). Las secuencias aminoacídicas identificadas experimentalmente coincidieron con las teóricas predichas según la secuencia nucleotídica. En todas las proteínas se comprobó la presencia de las secuencias de la región amino (GSHMDWNNQSIVK $m/z = 1514,71$) y extremo carboxilo (GDRGFTGDGGG $m/z = 994,46$) (Anexo 7). Para las proteínas PRH, entre los

péptidos trípticos secuenciados se encontraron secuencias de la interface entre los fragmentos A y B, las cuales permiten distinguir entre las diferentes PRH (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación mediante espectrometría de masas de las secuencias distintivas de las PRH producidas en *E. coli*.

PRH	Nro. P.T ¹	Secuencia distintiva	GRAVY ²	Masa
PRH1-2	T20	GDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSVK	0,302	3964,95
PRH1-CC-2	T20	GDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSIDNATWVMTDNVK	0,173	5225,49
PRH1-CL-2	T20	GDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSIDNATWVMTDNIDNATWVMTDNVK	0,087	6490,13
PRH2-1	T20	GDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSVK	0,200	4414,12
PRH2-CC-1	T20	GDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSIDNATWVMTDNVK	0,100	5674,66
PRH2-CL-1	T20	GDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSIDNATWVMTDNIDNATWVMTDNVK	0,031	6939,60

1) Nro. Pep. T: Número del péptido tríptico secuenciado. 2) GRAVY: valor promedio de hidrofobicidad calculado a partir de la secuencia aminoacídica completa del péptido (del inglés, *Grand Average Hydrophobicity Values*). Puntuaciones positivas (valores > 0) indican secuencias hidrofóbicas, según Kyte y Russell, 1982 J. Mol. Biol. 157, 105-132. Los aa **VK en negritas**, al final de cada péptido, constituyen los dos primeros aa de los fragmentos B de cada PRH. Los conectores CC y CL aparecen subrayados.

4.1.5 Purificación de Prn1, Prn2 y las seis PRH a partir de *Escherichia coli*

Luego de inducir la expresión de las construcciones genéticas (acápito 3.11), la biomasa celular se sometió a un procedimiento de ruptura por ultrasonido. Después de centrifugar, las proteínas Prn1, Prn2 y las seis PRH se obtuvieron en la fracción insoluble. Los agregados se solubilizaron eficientemente en la solución tamponada de extracción en presencia de 4 M urea. La muestra solubilizada se purificó a través de la cromatografía de afinidad al ion inmovilizado Ni²⁺ (Ni-NTA). La urea presente en las fracciones eluidas se extrajo lentamente para evitar la precipitación durante el plegado de las proteínas. En todos los casos las proteínas se obtuvieron con una pureza de 90 % (Figura 12). El método empleado permitió la purificación de aproximadamente entre 8 y 10 mg de proteína por cada gramo de biomasa (peso húmedo).

4.1.6 Inmunoidentificación de las diferentes variantes de pertactina purificadas por AcMs murinos y sueros humanos anti-pertactina

Luego de purificar las diferentes variantes de Prn y PRH producidas en *E. coli*, estas se evaluaron mediante ELISA, con cuatro AcMs anti-Prn de origen murino y diez sueros de voluntarios sanos inmunizados con la vacuna Adacel. Los AcMs Pem4, Pem1 y Pem29 reconocen epitopos protectores. Los AcMs Pem4 y Pem19 se unen a epitopos lineales localizados en el lazo de la R1 y el extremo carboxilo, respectivamente. Los AcMs Pem1 y Pem29 reconocen epitopos discontinuos cuyos motivos de unión se ubican en el extremo amino y el lazo de la R1 (Anexo 8). Las diferentes Prn y PRH se reconocieron por

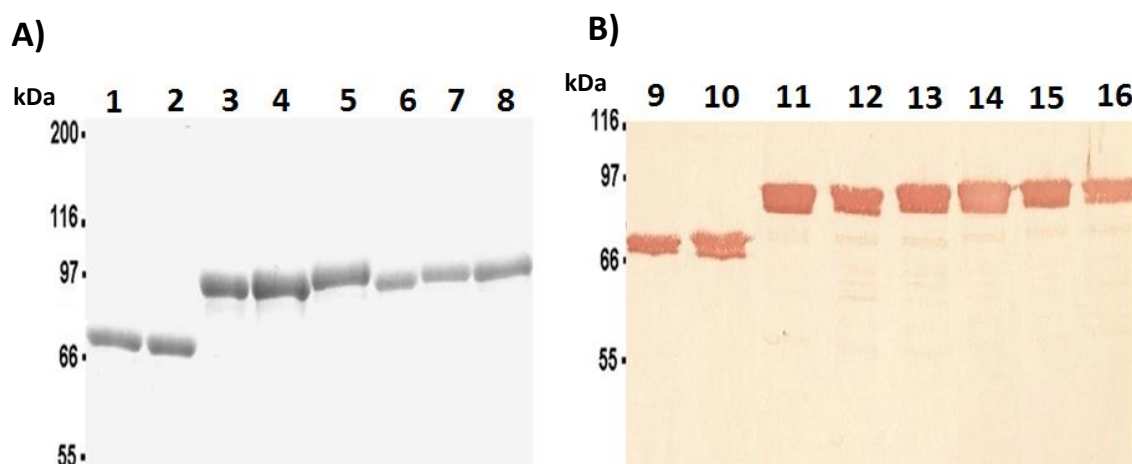


Figura 12. Caracterización de las proteínas Prn y PRH purificadas por cromatografía de afinidad Ni-NTA. A) SDS-PAGE al 10 % de las proteínas purificadas. Las proteínas se visualizaron con la tinción de azul Coomassie. Carriles 1 al 8: Prn1, Prn2, PRH1-2, PRH1-CC-2, PRH1-CL-2 y PRH2-1, PRH2-CC-1 y PRH2-CL-1 respectivamente. El patrón de talla molecular en kDa utilizado fue el RPN5800 (GE healthcare). **B)** Immunoidentificación mediante *Western blotting* con el AcM Pem19 de las diferentes variantes de pertactina. Carriles 9 al 16: Prn1, Prn2, PRH1-2, PRH1-CC-2, PRH1-CL-2, PRH2-1, PRH2-CC-1 y PRH2-CL-1 respectivamente.

todos los AcMs utilizados (Figura 13). Como promedio, la señal de reconocimiento contra las diferentes Prn y PRH fue diez veces superior respecto a la de los controles negativos. En comparación con la proteína natural P.69 (Prn1) y la recombinante Prn1, la señal de reconocimiento promedio del AcM Pem4 contra Prn2 fue 1,5 veces superior y contra las PRH dos veces superior. Por otra parte, los sueros de los individuos vacunados con la vacuna Adacel reconocieron sin diferencias ($p>0,05$) tanto las moléculas Prn1, Prn2 y P.69 (Prn1) como las PRH (Figura 14).

4.2 Evaluación inmunológica de Prn2 y las variantes PRH que incorporan Prn2 en ratones BALB/c

Una vez evidenciado el reconocimiento de las proteínas Prn y PRH mediante ELISA con AcMs y sueros humanos, se procedió a evaluar su inmunogenicidad en ratones BALB/c. En un experimento previo, la pertactina natural P.69 (Prn1) obtenida de *B. pertussis*, se adyuvó en alúmina y se administró a ratones BALB/c por la vía subcutánea con dosis de 2; 0,2; 0,02 y 0 $\mu\text{g/ratón}$ (acápite 3.20.1). La dosis de 0,2 $\mu\text{g/ratón}$ resultó la mínima inductora de títulos de Ac significativos contra la pertactina natural P.69 (Prn1) (Anexo 9). Por tanto, las proteínas Prn y PRH se adyuvaron en alúmina y se administraron a ratones BALB/c empleando el mismo procedimiento de inmunización y la dosis de 0,2 $\mu\text{g/ratón}$. En el esquema se incluyó como control positivo la pertactina natural P.69 (Prn1) y como control negativo se utilizó una preparación con igual cantidad de alúmina en PBS.

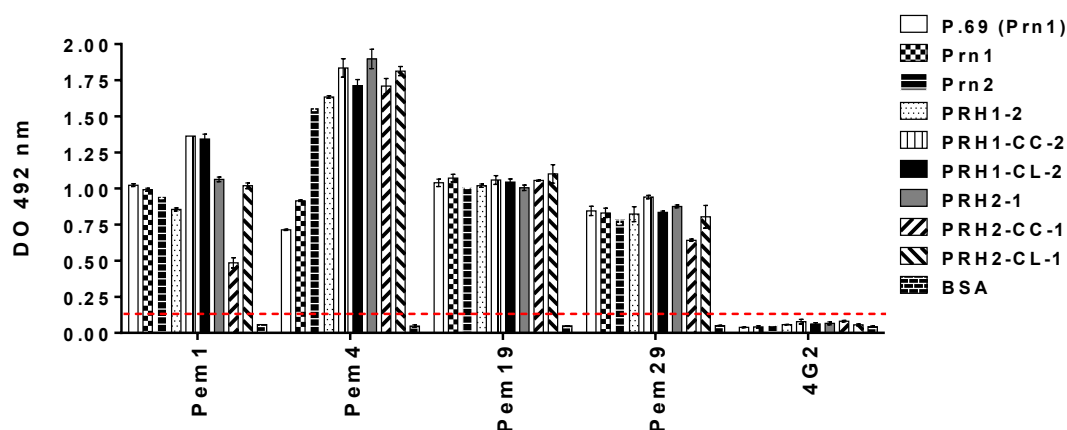


Figura 13. Inmunoidentificación de las proteínas Prn1, Prn2 y las seis PRH purificadas a partir de *E. coli*, mediante ELISA, con AcM que reconocen epítomos protectores. Los diferentes anticuerpos monoclonales se incubaron en placas de microtitulación recubiertas con cada una de las variantes de pertactina purificadas. El AcM 4G2 reconoce la proteína de la envoltura del virus Dengue y se usó como control negativo de reconocimiento. La albúmina sérica bovina (BSA; Sigma, EE. UU) se utilizó como control negativo de recubrimiento. Se consideró positiva la señal con un valor de DO superior a (la línea discontinua) dos veces el valor de DO producido contra el control negativo. P.69 es la variante de pertactina Prn1 purificada de *B. pertussis* (Novartis, Italia). Los datos se representan como las medias de los valores de DO de dos réplicas \pm la desviación estándar. La determinación de la inmunorreactividad contra los distintos antígenos se repitió tres veces. Se muestran los resultados representativos de un ensayo.

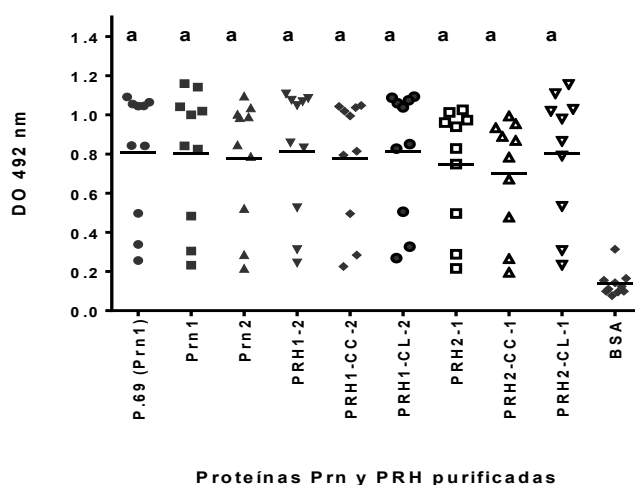


Figura 14. Inmunoidentificación de las proteínas Prn1, Prn2 y las seis PRH purificadas a partir de *E. coli*, mediante ELISA, con sueros humanos (IgG humana total) de vacunados con la vacuna comercial ADACEL. Muestras de suero de diez individuos sanos, reactivados con la vacuna comercial Adacel (Tabla 1), se incubaron en placas de microtitulación recubiertas con cada proteína Prn o PRH purificada. Las muestras se diluyeron 1:100. La albúmina sérica bovina (BSA; Sigma, EE. UU) se utilizó como control negativo de recubrimiento. El análisis estadístico entre los grupos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA y las medias se compararon con la prueba *a posteriori* de Tukey. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$). El ELISA contra los distintos antígenos se repitió tres veces. Se muestran los resultados representativos de un ensayo.

4.2.1 Respuesta de anticuerpos IgG inducida por las proteínas Prn1, Prn2 y las diferentes variantes de PRH

Los títulos de Ac específicos contra Prn1 y Prn2 inducidos por las proteínas recombinantes Prn1, Prn2 y las diferentes variantes de PRH se evaluaron mediante ELISA (acápite 3.19). Las proteínas Prn1 y Prn2 indujeron títulos de Ac anti-Prn1 (Figura 15 A) y anti-Prn2 (Figura 15 B) estadísticamente similares ($p>0,05$).

Las pertactinas híbridas PRH1-CL-2, PRH2-1, PRH1-CC-2, PRH2-CC-1 y PRH2-CL-1, con la excepción de la proteína PRH1-2, indujeron títulos de Ac anti-Prn1 estadísticamente superiores ($p<0,05$) a los estimulados por las proteínas P.69 (Prn1), Prn1 y Prn2 (Figura 15 A).

Al evaluar la respuesta IgG anti-Prn2, se observó que la proteína Prn2 y las seis variantes de PRH, indujeron títulos de Ac significativamente superiores ($p<0,05$) a los estimulados por la proteína natural P.69 (Prn1) (Figura 15 B). La proteína PRH2-1 indujo títulos de Ac IgG anti-Prn2 superiores ($p<0,001$) con respecto a las proteínas P.69 (Prn1) y Prn1; mientras que la proteína PRH1-CL-2 indujo títulos de Ac superiores ($p<0,001$) a los inducidos por las proteínas P.69 (Prn1), Prn1 y Prn2 (Figura 15 B).

4.2.2 Determinación de las clases y subclases de inmunoglobulinas inducidas por las proteínas PRH

Con el objetivo de caracterizar la respuesta de Ac contra las proteínas purificadas se realizó un ELISA para la detección de las clases y subclases de inmunoglobulinas específicas a pertactina (ver acápite 3.19). Como se muestra en la figura 16, en todos los grupos inmunizados se detectaron Ac de las clases IgA e IgM, así como Ac de las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3.

4.2.3 Evaluación de la respuesta de anticuerpos contra péptidos lineales con secuencias de regiones involucradas en la protección

Los sueros de los ratones inmunizados con las proteínas P.69 (Prn1), Prn1, Prn2, y las dos PRH más inmunogénicas que la proteína Prn1, PRH1-CL-2 y PRH2-1, se evaluaron por ELISA contra péptidos lineales de la R1 de Prn1, R1 de Prn2, la R2 y la región inmunodominante del extremo amino. Las proteínas Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 indujeron títulos de Ac específicos (IgG) contra la R1 de Prn1 (Figura 17 A) y R1 de Prn2 (Figura 17 B) estadísticamente superiores ($p<0,01$) respecto a los inducidos por las proteínas P.69 (Prn1), Prn1 y el grupo control negativo.

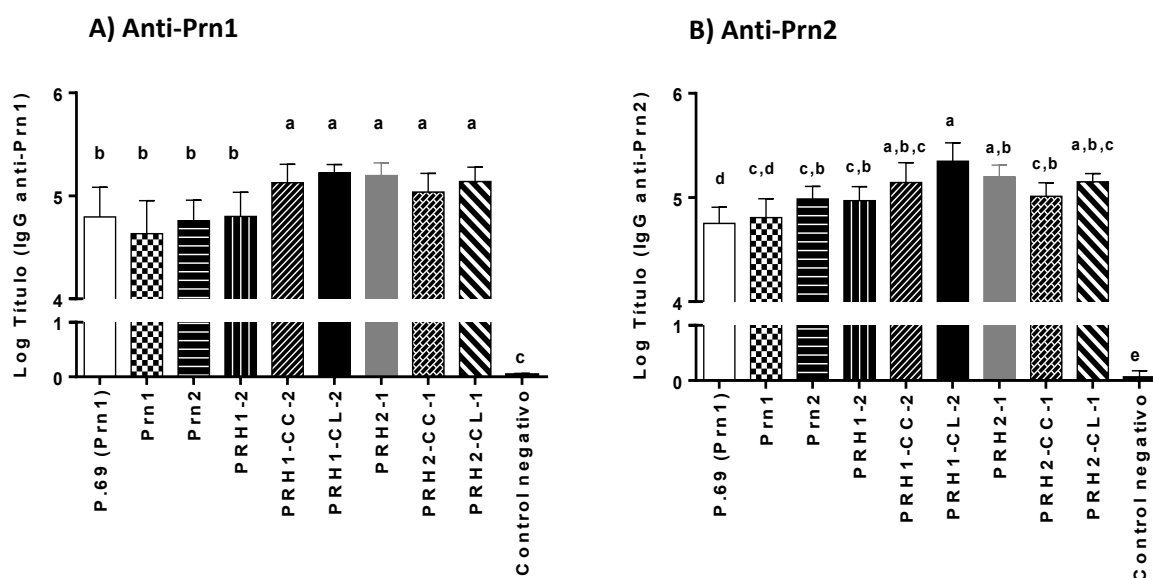


Figura 15. Títulos de anticuerpos (IgG) inducidos por Prn1, Prn2 y las diferentes PRH purificadas. Los sueros de cada grupo, $n = 9$, se ensayaron mediante ELISA contra las proteínas Prn1 (A) o Prn2 (B). Se consideró positivo el suero con un título superior a dos veces el valor de título producido por el control negativo. El análisis estadístico entre los grupos de tratamiento se realizó con la prueba paramétrica ANOVA y las medias se compararon con la prueba *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Cada barra representa la media de los títulos para un grupo \pm la desviación estándar. La determinación de los títulos contra los distintos antígenos se repitió tres veces. Se muestran los resultados de un experimento típico.

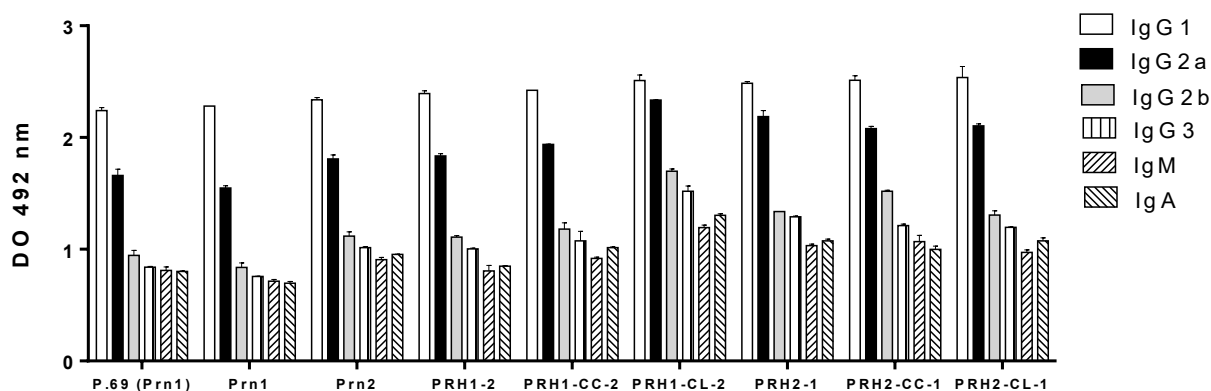


Figura 16. Clases y subclases de inmunoglobulinas inducidas en los grupos inmunizados con P.69 (Prn1), Prn1, Prn2 y las seis PRH después de la tercera inmunización determinados mediante ELISA. Los sueros de cada grupo ($n = 9$) se mezclaron proporcionalmente y se diluyeron 1:500. Luego se incubaron en placas de microtitulación recubiertas con la proteína Prn1. Se consideraron positivas las señales con una DO superior a dos veces la DO producida por el control negativo. Las barras representan las medias de los valores de DO de dos réplicas \pm la desviación estándar. Al valor de DO de cada determinación se le sustrajo el valor de DO del suero control negativo correspondiente.

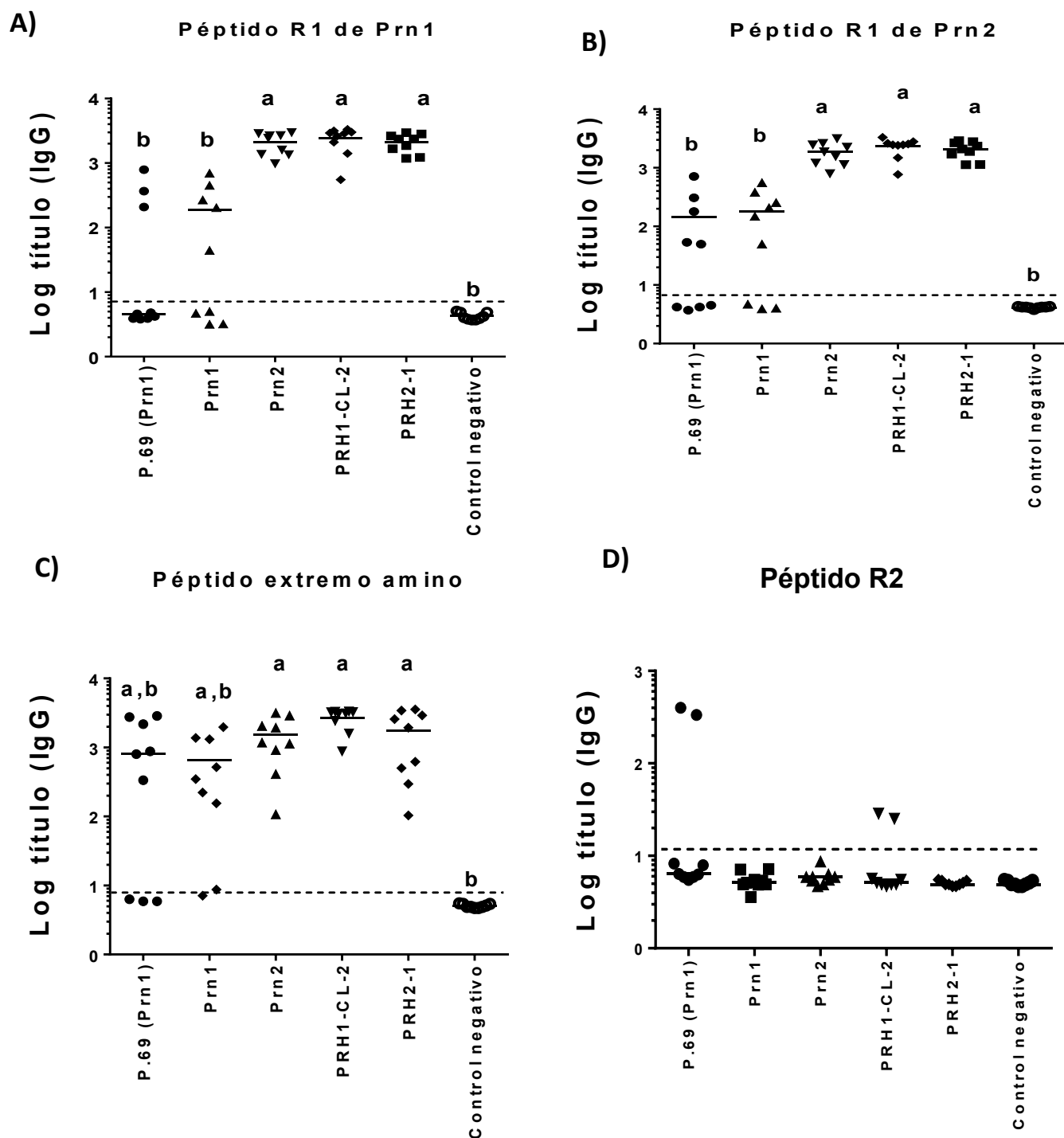


Figura 17. Títulos de anticuerpos inducidos en los grupos de ratones inmunizados con P.69 (Prn1), Prn1, Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 contra péptidos lineales de la región variable R1 de Prn1, R1 de Prn2, R2 y la región del extremo amino determinados mediante ELISA. Los sueros de cada grupo ($n = 9$), después de la tercera inmunización, se incubaron por duplicado en placas de microtitulación recubiertas con cada uno de los péptidos. Las diferencias entre los grupos se determinaron con la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* y las medianas se compararon con la prueba *a posteriori* de *Dunn*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,01$). La línea continua representa la mediana para un grupo. La línea discontinua representa un valor superior a dos veces el valor de la señal producida por el control negativo y fue utilizado como criterio de positividad. La determinación contra los distintos péptidos se repitió tres veces. Se muestran los resultados representativos de un ensayo.

Con respecto al reconocimiento del péptido del extremo amino, las proteínas PRH1-CL-2, PRH2-1 y Prn2 indujeron títulos estadísticamente diferentes ($p<0,01$) respecto a los inducidos por el grupo control negativo (Figura 17 C). La secuencia de la R2 fue reconocida sólo por dos de los nueve sueros de los animales inmunizados con P.69 (Prn1) y PRH1-CL-2 (Figura 17 D).

4.2.4 Reconocimiento de las proteínas P.69 (Prn1), Prn1, Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 desnaturalizadas mediante calor por AcMs y sueros murinos

Con el objetivo de conocer si en el reconocimiento de los epitopos protectores por parte de los anticuerpos inducidos por las proteínas Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1, median determinantes de la estructura nativa de pertactina, se realizó un ELISA, en el cual se emplearon a las proteínas P.69 (Prn1), Prn1, Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1, nativas y desnaturalizadas mediante incubación a 95 °C como recubrimiento. Cada proteína se ensayó con los AcM Pem1, Pem4, Pem29 y los sueros murinos específicos contra cada una de las proteínas. En la Tabla 4 se muestra que el reconocimiento específico de todas las proteínas ensayadas por parte de los AcMs y los sueros policlonales específicos disminuyó significativamente ($p<0,01$), según la prueba de *Mann-Whitney*.

Tabla 4. Porcentaje de reconocimiento de las proteínas Prn y PRH después de su incubación a 95 °C.

AcM y Sueros	Proteínas utilizadas en el recubrimiento				
	Prn P69.(Prn1)	Prn1	Prn2	PRH1-CL-2	PRN2-1
Pem1	13,5 ± 0,2	28,7 ± 0,4	33,2 ± 0,2	20,9 ± 1,0	32,4 ± 0,1
Pem4	26,2 ± 0,6	29,9 ± 0,7	41,1 ± 1,5	52,8 ± 5,1	58,8 ± 7,9
Pem29	4,9 ± 0,2	9,8 ± 0,1	12,2 ± 0,2	7,8 ± 0,4	12,4 ± 0,1
anti-P.69 (Prn1)	45,3 ± 0,3	43,6 ± 1,1	42,3 ± 2,4	61,0 ± 3,2	67,4 ± 1,0
anti-Prn1	23,2 ± 0,4	18,6 ± 0,2	16,0 ± 0,4	25,3 ± 1,0	36,9 ± 0,9
anti-Prn2	35,5 ± 0,2	30,1 ± 1,7	38,8 ± 0,6	52,1 ± 2,8	57,6 ± 1,2
anti-PRH1-CL-2	68,9 ± 3,4	70,9 ± 0,9	72,0 ± 4,8	82,0 ± 3,4	91,8 ± 3,5
anti-PRH2-1	52,8 ± 1,6	53,6 ± 0,9	54,2 ± 1,4	74,4 ± 2,1	80,2 ± 2,9

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (n = 10) del porcentaje de reconocimiento de las proteínas incubadas a 95 °C respecto a 25°C (100 %). Pem1 y Pem29 reconocen epitopos discontinuos. Pem4 reconoce un epitopo lineal ubicado en el lazo R1.

4.2.5 Evaluación de la capacidad protectora de Prn2, PRH2-1 y PRH1-CL-2 en el modelo MICA

Luego de demostrar la inmunogenicidad y de caracterizar la respuesta de Ac inducida por las proteínas Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1, se procedió a evaluar la capacidad de estas de conferir protección en ratones frente a la infección con la cepa letal BP18323 en el modelo MICA (acápite 3.20.5). La proteína Prn1 se

incluyó en el ensayo como control. Se evaluaron tres dosis diferentes para cada proteína: 25, 5 y 1 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. Como control positivo se incluyó un grupo de ratones inmunizados con la preparación vacunal celular de referencia *B. pertussis* VPR (99) 11. Como se muestra en la figura 18, los ratones inmunizados con el control positivo mostraron una curva de supervivencia estadísticamente diferente de la del grupo control negativo ($p < 0,001$). Para la dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, los grupos de ratones inmunizados con Prn1, Prn2, PRH1CL-2 y PRH2-1 mostraron una curva de supervivencia con diferencias significativas ($p < 0,01$) respecto al grupo control negativo. Al reducir la dosis cinco veces (5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), se observaron diferencias significativas para los grupos de ratones inmunizados con las proteínas Prn1 y PRH2-1 ($p < 0,01$), y no en los grupos inmunizados con Prn2 y PRH1-CL-2 ($p \geq 0,05$). Este resultado permitió seleccionar la variante PRH2-1 para caracterizar sus propiedades inmunológicas en combinación con PTg y FHA.

Para la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, no se observaron diferencias en las curvas de supervivencia en ninguno de los grupos inmunizados respecto al control negativo ($p \geq 0,05$).

En todos los grupos inmunizados con independencia de la dosis administrada, las curvas de supervivencia fueron diferentes al grupo control positivo ($p < 0,001$). El mayor porcentaje de supervivencia se observó en el grupo de ratones inmunizados con 25 μg de la proteína Prn2 (35 %) ($p < 0,01$).

4.3 Obtención de los componentes PTg, FHA y Prn2 a partir de *Bordetella pertussis* BPCNIC0311

Después de comprobar que las pertactinas Prn2 y PRH2-1 resultaron inmunogénicas en ratones BALB/c y confirieron supervivencia frente a la infección con la cepa letal B18323, se concibió evaluarlas coadministradas con los antígenos PTg y FHA. Para ello fue necesario obtener primero los componentes PTg, FHA y Prn2 a partir de la cepa *B. pertussis* BPCNIC0311. Como se muestra en la figura 19, en las primeras 18 horas del cultivo se alcanzó un valor promedio de $\text{DO}_{530 \text{ nm}} = 4,5 \pm 0,1$. La densidad celular se correspondió con un peso húmedo entre ocho y nueve gramos por litro de caldo fermentativo. Las concentraciones de PTg en el sobrenadante de cultivo equivalieron a

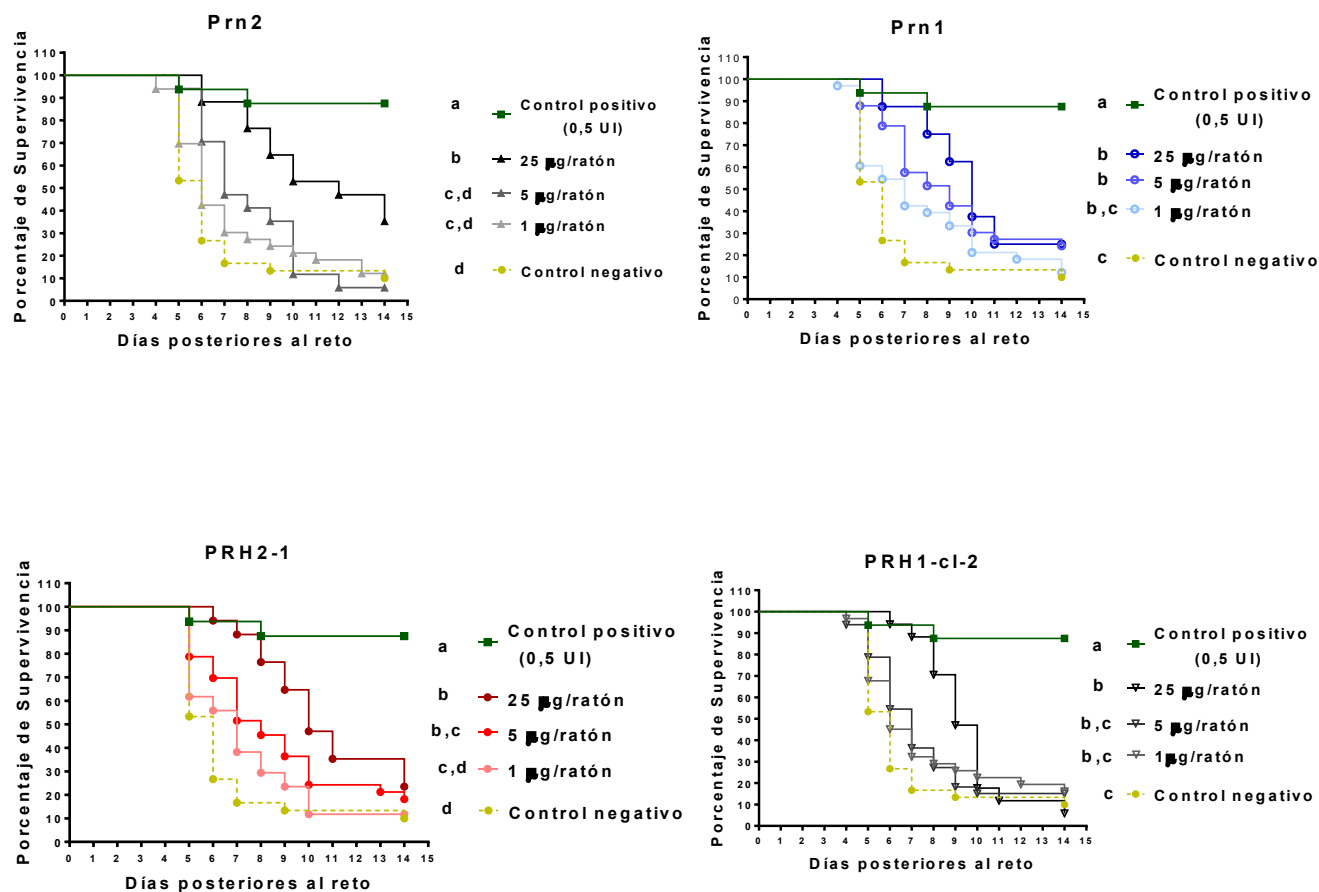


Figura 18. Curso temporal de la supervivencia de ratones OF-1 inmunizados con las proteínas Prn1, Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 y retados posteriormente con la cepa BP18323. Cada grupo ($n = 17$) recibió una administración vía intraperitoneal de 25 µg, 5 µg o de 1 µg de cada proteína adyuvada con alúmina. El grupo control positivo recibió 0.5 Unidades Internacionales de la vacuna celular de referencia VPR (99) 11. El grupo control negativo recibió una preparación de alúmina en PBS. Veintidós días después de la inmunización, cada grupo recibió una inoculación intracerebral con aproximadamente 7×10^4 UFC de la cepa virulenta BP18323. Las curvas de supervivencia se compararon con la prueba de *Log-rank*. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

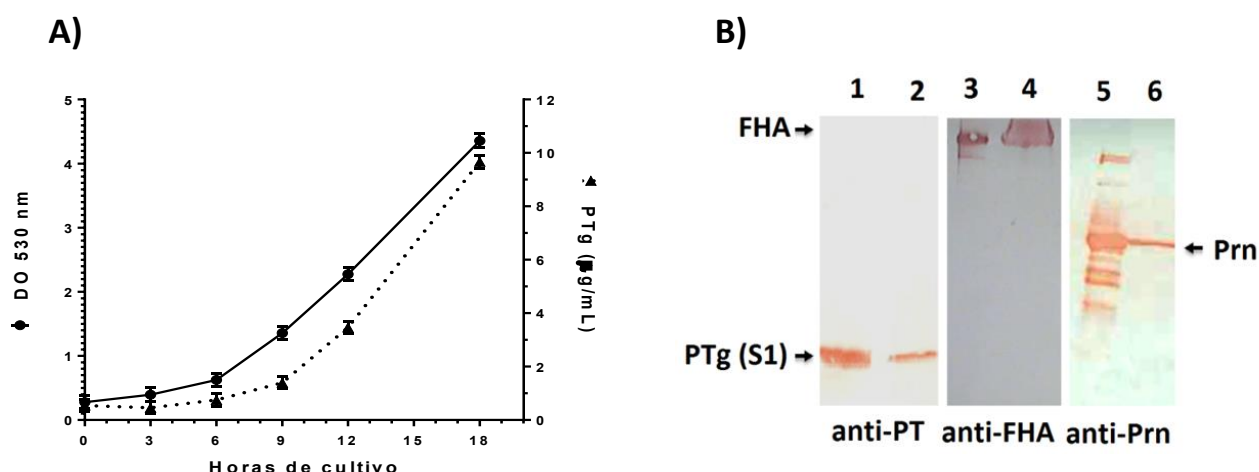


Figura 19. Crecimiento de la cepa BPCNIC0311 en el medio THIJS y producción de los antígenos PTg, FHA y Prn2.

A) Eje Y izquierdo, la línea continua que une círculos representa la densidad celular expresada en valores de DO_{530 nm}. Eje Y derecho, la línea discontinua que une triángulos indica la concentración de PTg en el sobrenadante de cultivo determinada mediante ELISA. Cada punto representa la media de dos réplicas \pm la desviación estándar. **B)** Immunoidentificación mediante *Western blotting* de PTg, FHA y Prn2 con anticuerpos monoclonales anti-PT(S1), anti-FHA y anti-Prn (Pem19). Carril 1 y 3 sobrenadante de cultivo a las 18 h concentrado 10 veces. Carril 5, sobrenadante de extracción del precipitado celular. Carriles 2, 4 y 6 controles positivos de las proteínas PT, FHA y Prn, respectivamente. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

2,2 mg/L/Abs_{530 nm} (9,5 mg/L), según el análisis del sobrenadante mediante ELISA anti toxina (acápite 3.18) (Figura 19 A). Las proteínas PTg y FHA se obtuvieron en el sobrenadante de cultivo mientras que Prn2 se obtuvo en el precipitado celular (Figura 19 B).

Por otra parte, se comprobó la presencia de actividad β hemolítica en las colonias de *B. pertussis* al término de la fermentación. No se observaron microorganismos contaminantes al analizar el cultivo por la tinción de Gram, ni crecimiento de estos en el medio triptona soya. De igual forma, al final del cultivo se verificó la identidad de las secuencias mutadas de los genes *ptxA2* y *prnA2* mediante la SAUT por ambas cadenas (Anexo 10 y 11).

4.3.1 Purificación de los antígenos PTg, FHA y Prn2

Después de identificar las proteínas PTg y FHA en el sobrenadante de cultivo y Prn2 en el precipitado celular se procedió a su purificación según el procedimiento descrito en el acápite 4.3.1. En particular, la adición de fosfato de calcio al sobrenadante de extracción de Prn2 permitió la eliminación de los ácidos nucleicos de alto peso (Anexo 12). El análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas PTg, FHA y Prn2 mostró que estas se purificaron con una pureza de 90 % (Figura 20 A y B). En la tabla 5 se muestra que las unidades de endotoxinas determinadas por LAL, resultaron inferiores a 2 UE/dosis para las tres

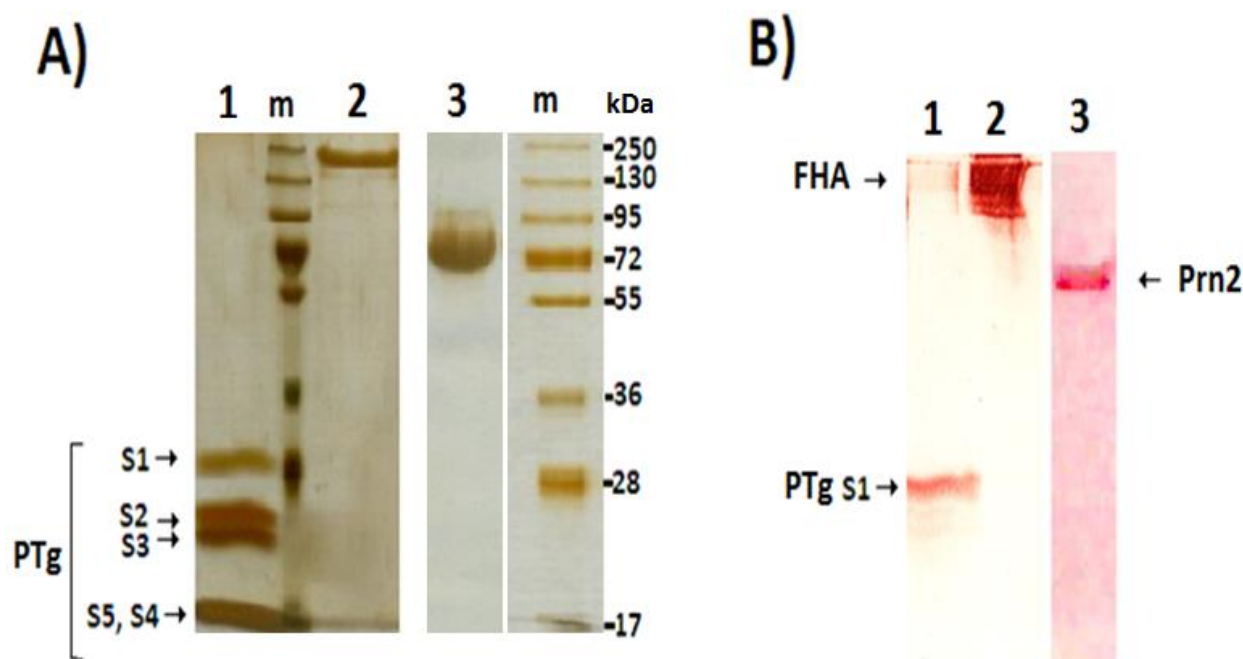


Figura 20. Caracterización de las proteínas PTg, FHA y Prn2 purificadas mediante intercambio iónico a partir de *B. pertussis* BPCNIC0311. A) SDS-PAGE al 12,5% en condiciones reductoras. Las bandas se visualizaron por tinción con plata. m, patrón de talla molecular en kDa (SM1818, Fermentas). Las proteínas PTg (carril 1) y FHA (carril 2) se purificaron mediante intercambio catiónico (COO⁻), la proteína Prn2 (carril 3) se purificó mediante intercambio aniónico (DEAE⁺). Con S1, S2, S3, S4 y S5 se designan las diferentes subunidades de la proteína PTg. **B)** Inmunoidentificación mediante *Western blotting* de las proteínas purificadas PTg (carril 1), FHA (carril 2) y Prn2 (carril 3) con anticuerpos monoclonales anti-S1 de PTg, anti-FHA y anti-Prn (Pem19), respectivamente.

Tabla 5. Cantidades obtenidas de las proteínas purificadas PTg, FHA y Prn2 y niveles residuales de endotoxinas.

	mg/L ^(a)			UE/Dosis ^(b)		
	PTg	FHA	Prn	PTg	FHA	Prn
Media ± SD	1,9±0,03	2,26±0,42	1,76±0,21	1,43±0,62	0,32±0,15	0,08±0,08

(a) La concentración de proteínas se estimó por el método de BCA. mg/L: indica miligramos de proteína purificada por Litro de caldo fermentativo. **(b)** UE/Dosis: Unidades de endotoxina residual estimado por LAL en muestras purificadas de PTg, FHA y Prn2. Los valores de endotoxinas se presentan para las cantidades de PTg (5 µg), FHA (2,5 µg) y Prn (2,5 µg) presentes en una dosis vacunal humana (Di Tommaso y cols, 1997). Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres experimentos de purificación.

proteínas purificadas. Los rendimientos fueron similares para las tres proteínas con valores totales promedios de 5 mg por fermentación de tres litros.

Las proteínas PTg, FHA y Prn2 purificadas migraron conforme a las tallas moleculares esperadas (Figura 20 A). La proteína PTg se distribuyó en cuatro bandas que migraron entre 28 y 17 kDa correspondientes a las subunidades S1, S2, S3 y S4, S5 (Skelton y Wong, 1990).

La proteína Prn2 migró a la altura de 72 kDa. La proteína FHA migró como una banda mayoritaria de aproximadamente 220 kDa. Para esta proteína se evidenciaron bandas tenues con tamaños superiores a 100 kDa, las cuales se identificaron por el AcM anti-FHA en el ensayo de *Western blotting* (Figura 20 B, carril 2). Las proteínas PTg, FHA y Prn2 se inmunoidentificaron mediante *Western blotting* con AcMs anti-PT, anti-FHA y anti-Prn (Figura 20 B).

4.3.2 Caracterización de las proteínas PTg, FHA y Prn2 mediante espectrometría de masas y ELISA con sueros murinos

Las proteínas purificadas se analizaron mediante espectrometría de masas. Las señales del espectro de masas correspondientes a la digestión trípica de cada una de las proteínas se utilizó para la búsqueda automática con el software MASCOT en bases de secuencias conocidas. El programa identificó secuencias de *B. pertussis* asociadas al antígeno PT (toxina pertussis), FHA y Prn2. Las puntuaciones resultaron superiores a los valores de confianza preestablecidos para la identificación probable. El porcentaje de cobertura de las secuencias para las proteínas PTg, FHA y Prn2 fue de 96 %, 68 % y 60 %, respectivamente (Anexo 13).

Para la proteína PTg se detectaron las señales de m/z 1005,504 y m/z 1805,013 que coinciden con la esperada para los péptidos trípticos DDPPATVYK₉ y ILGALATYQSG₁₂₉YLAHR si los aminoácidos R₉ y E₁₂₉ estuvieran sustituidos por K₉ y G₁₂₉, respectivamente. Para la proteína Prn2 se detectó la señal de m/z 1532,12, que se corresponde con la esperada para el péptido GDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVLGDGWYGVDVSGSSVELAQSSIVEAPELGAAIR, que contiene las seis secuencias GGXXP repetidas de la R1 de Prn2. Las señales de mayor intensidad correspondientes a los péptidos trípticos que contenían las mutaciones introducidas intencionalmente, K₉ y G₁₂₉ en la subunidad 1 de PTg, se seleccionaron para determinar su secuencia aminoacídica mediante MS/MS. Los cambios aminoacídicos se confirmaron. (Anexo 13. Figuras A, B y C). De igual forma, la señal correspondiente a la R1 de Prn2 se analizó por MS/MS y se verificó la secuencia de la variación de tipo dos (Anexo 13. Figuras D, E, F y G).

Las proteínas PTg, FHA y Prn2 purificadas se inmunoidentificaron en su forma nativa mediante ELISA (acápite 3.19) con sueros de ratones inmunizados con la vacuna comercial ADACEL (Tabla 1). En la figura 21 se muestra el reconocimiento significativo ($p<0,01$) de PTg, FHA y Prn2 por los sueros específicos respecto a los sueros controles negativos.

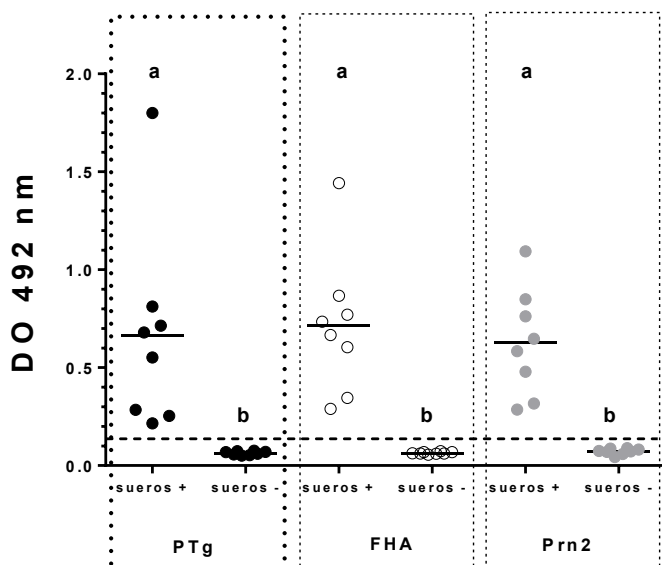


Figura 21. Inmunoidentificación de las proteínas PTg, FHA y Prn2 purificadas de *B. pertussis* BPCNIC0311. Las proteínas se inmunoidentificaron con muestras de suero ($n = 8$) de ratones OF-1 inmunizados con la vacuna comercial Adacel. Los sueros se diluyeron 1:1000 y se incubaron en placas de microtitulación recubiertas con las proteínas PTg, FHA y Prn2 purificadas. Se consideró positiva la muestra con un valor de DO superior a dos veces el valor de DO producido por los sueros negativos (Línea discontinua). El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica *Mann-Whitney*. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,01$). Las líneas continuas representan la mediana de los títulos para un grupo. El ensayo se repitió dos veces. Se muestran los resultados de un experimento típico.

4.4 Evaluación inmunológica de las proteínas Prn2 y PRH2-1 coadministradas con las proteínas PTg y FHA en ratones

4.4.1 Respuesta de anticuerpos inducida por las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 en ratones BALB/c y OF-1

Para la evaluación inmunológica de las proteínas Prn2 y PRH2-1 purificadas a partir de *B. pertussis* y *E. coli*, respectivamente, en combinación con PTg y FHA, se concibieron dos preparaciones vacunales de tres componentes PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1. En el esquema de inmunización se utilizó la dosis informada con anterioridad en un estudio de eficacia en humanos con la vacuna Triacelluvax (Tabla 1) (Greco y cols., 1996). Los componentes PTg (5 μ g), FHA (2,5 μ g), Prn2 (2,5 μ g) y PRH2-1 (2,5 μ g) se mezclaron con el adyuvante alúmina y posteriormente se administraron a ratones BALB/c (consanguíneos) y OF-1 (no consanguíneos) en un esquema de dos dosis. Un grupo de ratones inmunizados con una preparación de alúmina en PBS se usó como control negativo del estudio. Los Ac inducidos reactivos a las proteínas PTg, FHA, Prn1 y Prn2 se evaluaron mediante un ELISA (acápite 3.19).

En los ratones inmunizados con el control negativo no se detectó actividad específica en sus sueros. Como se muestra en la figura 22, después de la segunda dosis, para las dos líneas de ratón estudiadas, las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 indujeron títulos de Ac estadísticamente similares contra cada uno de los antígenos evaluados ($p \geq 0,05$).

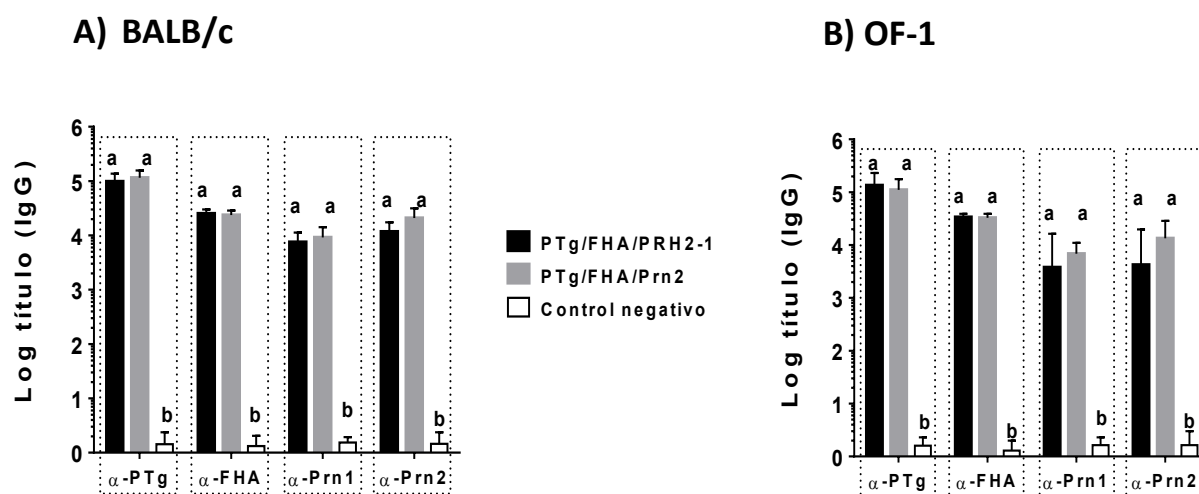


Figura 22. Títulos de anticuerpos contra los componentes PTg, FHA, Prn1 y Prn2 después de dos dosis con las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 determinados mediante ELISA. Las preparaciones vacunales PTg/FHA/PRH2-1 y PTg/FHA/Prn2 se evaluaron en ratones A) BALB/c y B) OF-1. Los sueros ($n = 10$) de los grupos inmunizados y el control negativo (alúmina en PBS) se incubaron en placas de microtitulación recubiertas con las proteínas PTg, FHA, Prn1 y Prn2. Para cada antígeno, se consideraron positivos aquellos sueros con un título superior a dos veces el valor promedio de título producido por los sueros del control negativo. El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* y las medianas se compararon con la prueba *a posteriori* de *Dunn*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,001$). Cada barra representa la mediana de los títulos para un grupo \pm el rango. La determinación contra los distintos antígenos se repitió tres veces. Se muestran los resultados representativos de un ensayo.

4.4.2 Determinación de las clases y subclases de inmunoglobulinas inducidas en ratones OF-1 inmunizados con las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1

A los sueros de los ratones OF-1 (no consanguíneos) se les determinó el patrón de clases y subclases de inmunoglobulina contra los antígenos PTg, FHA y Prn2. Como se muestra en la figura 23, ambas preparaciones vacunales indujeron Ac pertenecientes a las clases IgM e IgA, así como las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 contra los componentes PTg, FHA y Prn2.

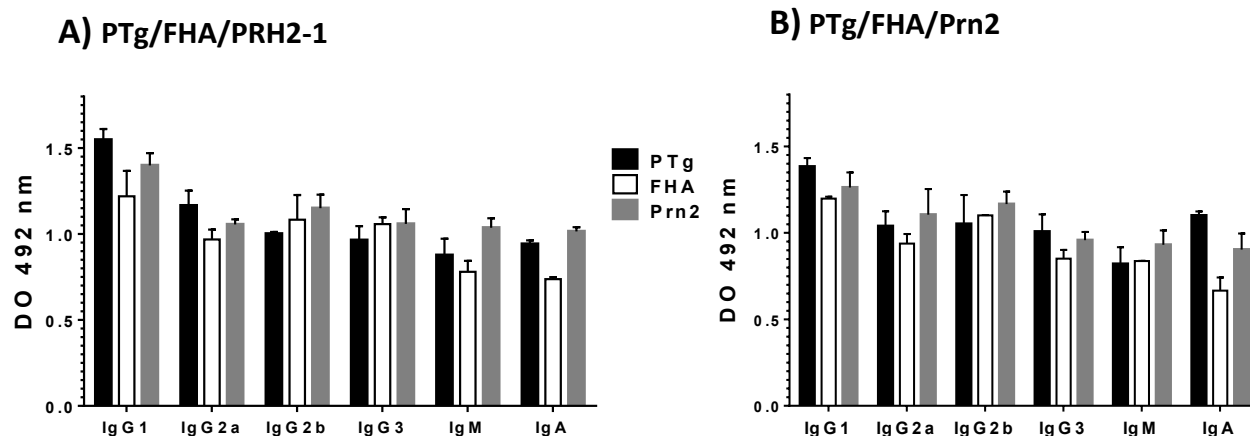


Figura 23. Clases y subclases de inmunoglobulinas contra los componentes PTg, FHA, Prn1 y Prn2 después de dos dosis con las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 determinados mediante ELISA. Las preparaciones vacunales A) PTg/FHA/PRH2-1 y B) PTg/FHA/Prn2 se evaluaron en ratones OF-1. Los sueros ($n = 10$) de cada grupo se mezclaron proporcionalmente y la muestra resultante se diluyó 1:250. Las muestras se ensayaron por duplicado en placas de microtitulación recubiertas con las proteínas PTg, FHA y Prn2. Se consideraron positivas las señales con una DO superior a dos veces la DO producida por el control negativo. Las barras representan las medias de los valores de DO de dos réplicas \pm la desviación estándar. Al valor de DO de cada determinación se le sustrajo el valor de DO del suero control negativo correspondiente.

4.4.3 Evaluación de la respuesta de anticuerpos contra péptidos lineales con secuencias de epitopos involucrados en la protección

Los sueros de ambas líneas de ratones inmunizados con PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 se evaluaron por ELISA contra péptidos con secuencias de la R1 de Prn1, la R1 de Prn2, la R2 y la región inmunodominante del extremo amino (acápite 3.19). Para este ensayo, los sueros inmunes después de dos dosis se mezclaron al azar por parejas ($n = 5$). En ninguno de los sueros evaluados se observó reconocimiento de los péptidos del extremo amino y la R2. Por otro lado, como se muestra en la figura 24 el 80 % (4 de 5) de los ratones BALB/c inmunizados, tanto con el preparado PTg/FHA/PRH2-1 como con PTg/FHA/Prn2, generaron títulos significativos ($p < 0,05$) de Ac IgG contra las regiones variables R1 de Prn1 y Prn2, en comparación con el control negativo.

No se encontraron diferencias estadísticas al comparar los títulos de Ac contra las regiones R1 inducidos por las dos preparaciones vacunales ($p \geq 0,05$).

En los ratones OF-1 el porcentaje de reconocimiento de las regiones R1 de las variantes Prn1 y Prn2 fue de 40 % (2 de 5).

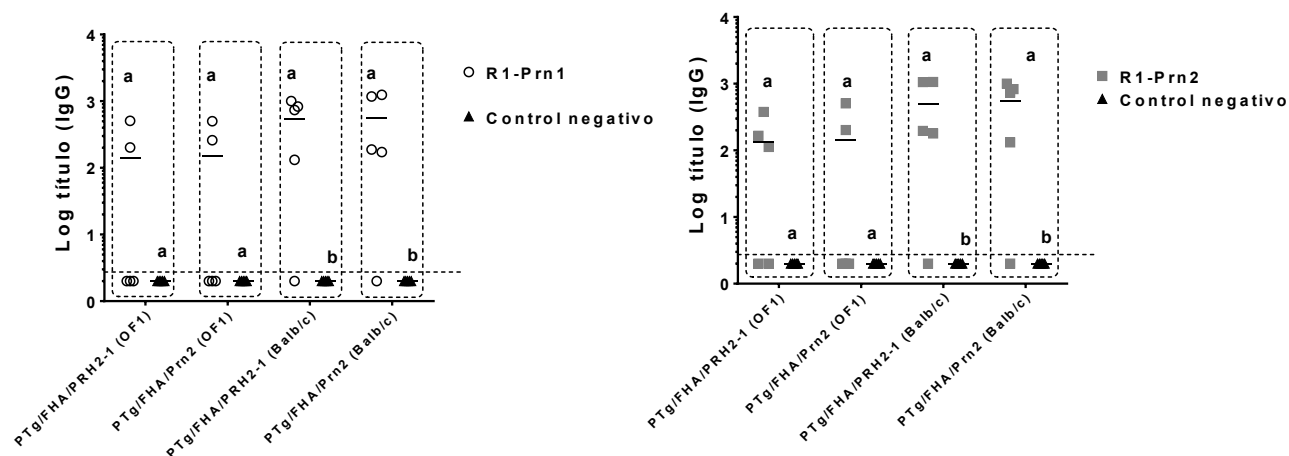


Figura 24. Títulos de anticuerpos en ratones OF-1 y BALB/c inmunizados con PTg/FHA/PRH2-1 y PTg/FHA/Prn2 contra péptidos lineales de la región variable R1 de Prn1 y R1 de Prn2 determinados mediante ELISA. Las muestras de suero ($n = 5$) se incubaron por duplicado en placas de microtitulación recubiertas con cada uno de los péptidos. Las diferencias entre los grupos se determinaron con la prueba no paramétrica *Mann-Whitney*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). La línea continua representa la mediana para un grupo. La línea discontinua representa un valor superior a dos veces el valor de DO producida por el control negativo y fue utilizado como criterio de positividad. La determinación contra los distintos péptidos se repitió dos veces. Se muestran los resultados de un experimento típico.

4.4.4 Secreción de IFN γ , IL-17, IL-4 e IL-5 de ratones OF-1 inmunizados con las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 o PTg/FHA/PRH2-1

Los esplenocitos de los ratones inmunizados y los controles se estimularon *in vitro* con las proteínas PTg, FHA y Prn2 para evaluar la secreción de diferentes citocinas. Como se muestra en la figura 25, se detectaron concentraciones estadísticamente significativas ($p < 0,01$) de IFN γ , IL-17, IL-4 e IL-5 secretadas por los esplenocitos de los ratones inmunizados con la preparación vacunal PTg/FHA/PRH2-1, respecto a los esplenocitos del grupo control. En los esplenocitos de los ratones inmunizados con la preparación vacunal PTg/FHA/Prn2 se detectaron concentraciones significativas ($p < 0,01$) de IFN γ , IL-4 e IL-5 pero no de IL-17 ($p \geq 0,05$), respecto al grupo control. No se encontraron diferencias estadísticas ($p \geq 0,05$), al comparar las concentraciones de cada una de las citocinas secretadas por los esplenocitos, entre los ratones inmunizados con las preparaciones PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1.

Tampoco se observaron diferencias estadísticas para la relación de la concentración de IFN γ e IL-4 (IFN γ /IL-4) entre los ratones inmunizados con PTg/FHA/PRH2-1 y PTg/FHA/Prn2 ($p \geq 0,05$) (Anexo 14).

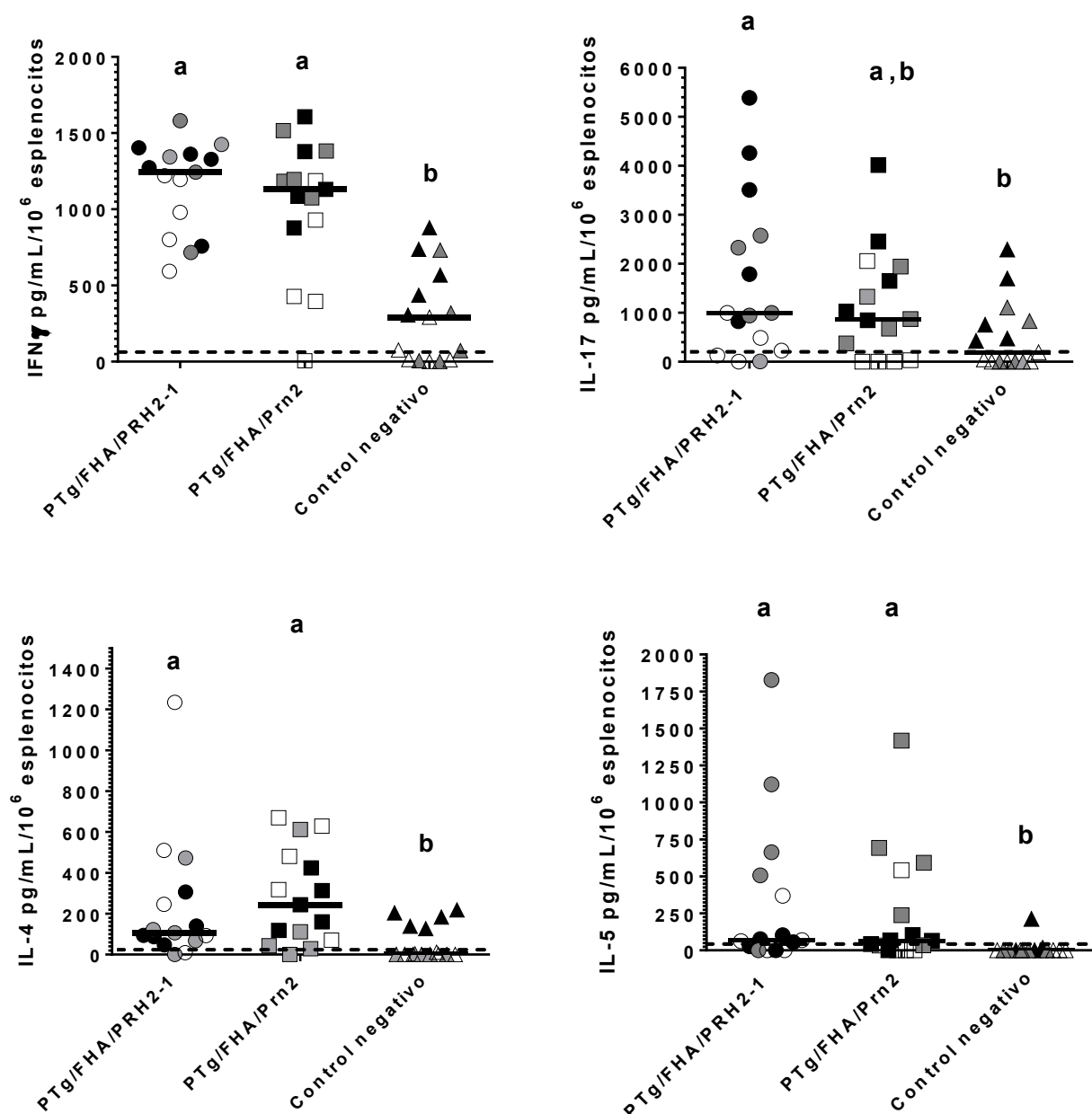


Figura 25. Concentración de citocinas IFN γ , IL-4, IL-17 e IL-5, secretadas por los esplenocitos estimulados con PTg, FHA y Prn2. Los ratones se inmunizaron con las preparaciones vacunales PTg/FHA/PRH2-1 y PTg/FHA/Prn2 adyuvadas con alúmina. El grupo control negativo recibió alúmina y PBS. Las células se extrajeron 21 días después de la segunda dosis. Cada punto muestral representa esplenocitos mezclados de dos ratones seleccionados al azar. Las figuras de color negro, blanco y gris representan células estimuladas con PTg, FHA y Prn2 respectivamente. Las citocinas se determinaron por ELISA ($n = 5$) después de 96 h de cultivo. La línea discontinua indica el control negativo de estímulo consistente en sobrenadante de cultivo de células no estimuladas. El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* y las medianas se compararon con la prueba *a posteriori* de *Dunn*. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,01$). Las líneas continuas representan la mediana de cada grupo. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. La determinación se repitió tres veces. Se muestran los resultados de un experimento típico.

4.4.5 Evaluación de las subclases de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a inducidas en ratones OF-1 inmunizados con las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 o PTg/FHA/PRH2-1

A los sueros de los ratones de cada grupo experimental, se les determinó individualmente los títulos de las subclases de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a contra los antígenos PTg, FHA y Prn2. Como se muestra en la figura 26, ambas preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 indujeron títulos de Ac IgG1 e IgG2a estadísticamente similares ($p \geq 0,05$) contra cada uno de los antígenos evaluados. A partir de los títulos de Ac IgG1 e IgG2a, se calcularon las relaciones IgG1/IgG2a. Como se muestra en la figura 27, no se observaron diferencias estadísticas entre las relaciones de los títulos IgG1/IgG2a de los sueros de los ratones inmunizados con ambas preparaciones vacunales ($p \geq 0,05$). Para cada uno de los antígenos evaluados, las relaciones de los títulos IgG1/IgG2a alcanzaron valores promedios próximos a uno.

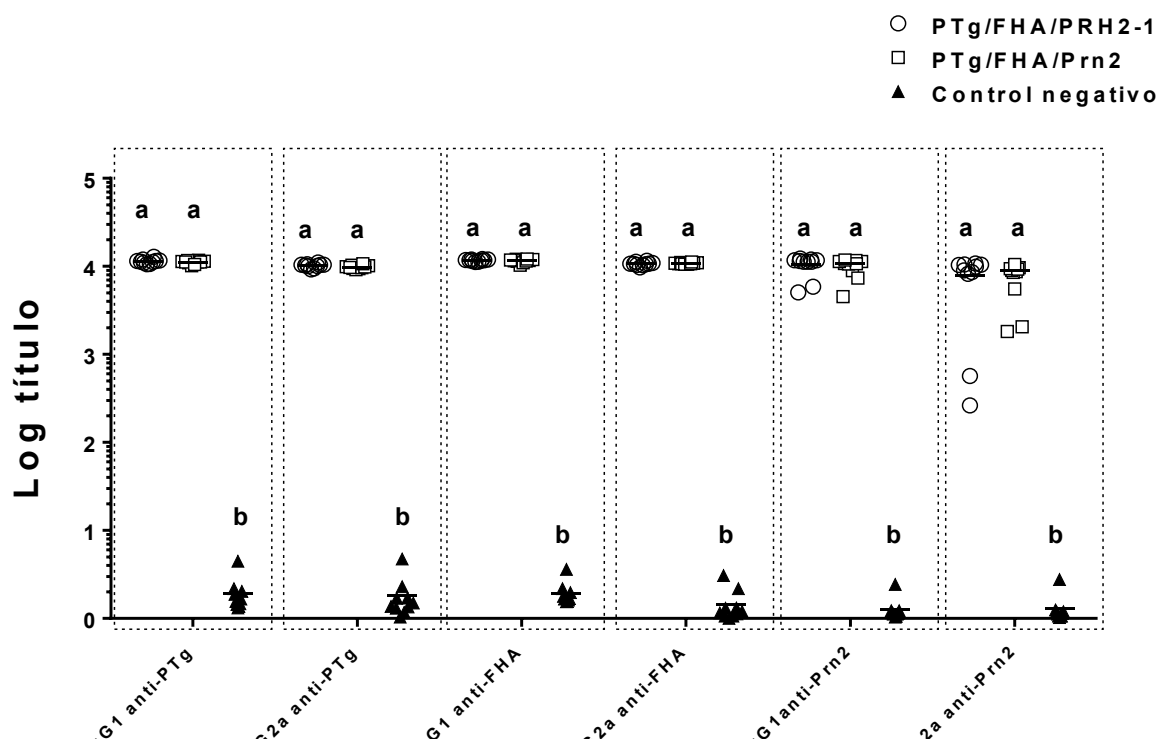


Figura 26. Títulos de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a detectadas en los ratones OF-1 inmunizados con las preparaciones vacunales PTg/FHA/PRH2-1 y PTg/FHA/Prn2 después de la segunda dosis determinados mediante ELISA. Los sueros de cada grupo ($n = 10$) se diluyeron individualmente 1:500 y se incubaron en placas de microtitulación recubiertas con cada una de las proteínas PTg, FHA y Prn2. Se consideraron positivos los valores de DO superiores a dos veces el valor promedio de DO producido por el grupo control negativo (alúmina en PBS). El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* y las medianas se compararon con la prueba *a posteriori* de *Dunn*. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,01$). Las líneas continuas representan la mediana de cada grupo. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. La determinación se repitió tres veces. Se muestran los resultados de un experimento típico.

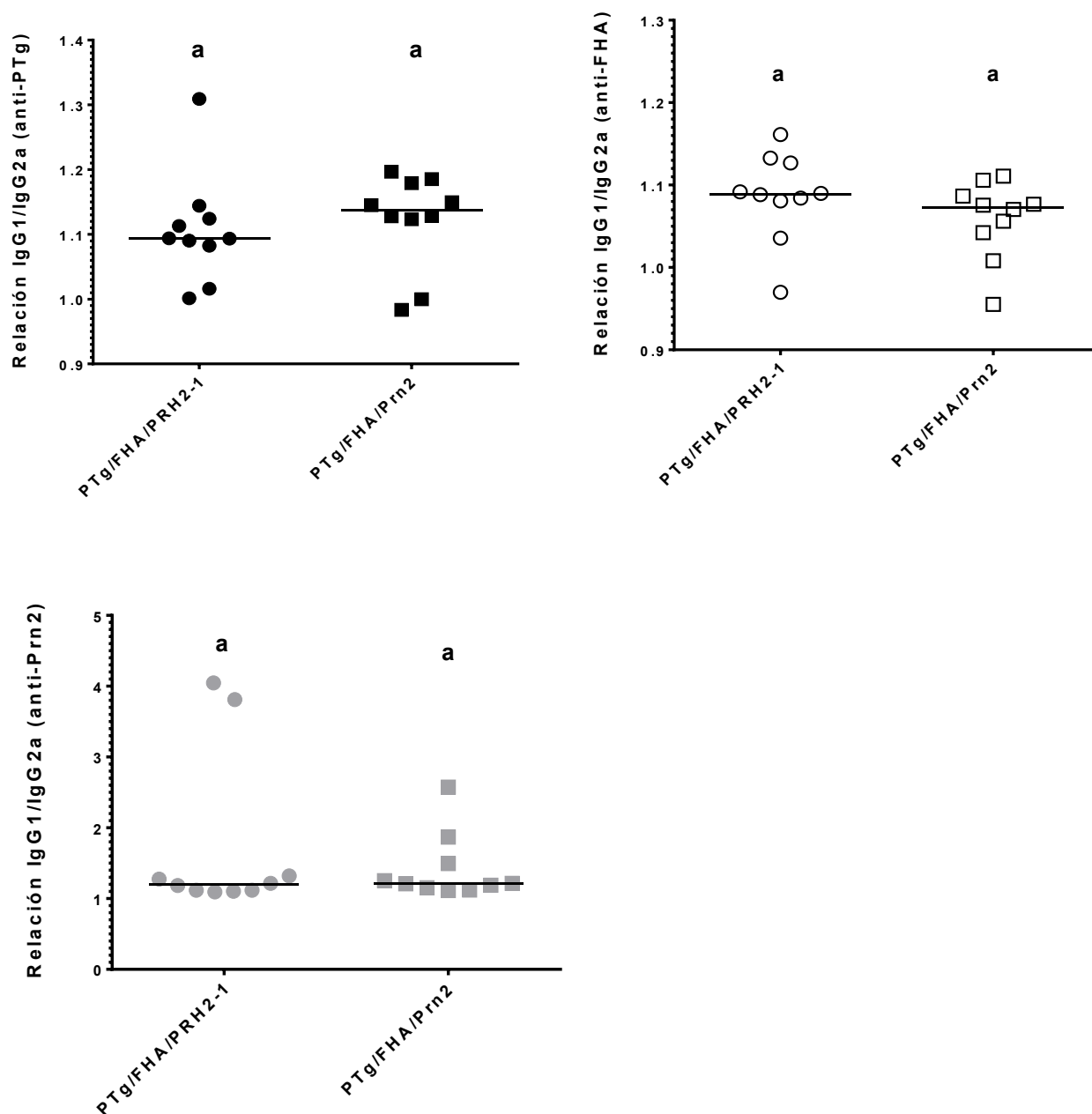


Figura 27. Relación de títulos de inmunoglobulinas IgG1/IgG2a detectadas en los ratones OF-1 inmunizados con las preparaciones vacunales PTg/FHA/PRH2-1 y PTg/FHA/Prn2 después de la segunda dosis determinados mediante ELISA. Los valores de DO superiores a dos veces el valor de DO producido por el grupo control negativo (alúmina en PBS). El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica *Mann-Whitney*. Las letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0.05$). Las líneas continuas representan la mediana de cada grupo. La determinación se repitió tres veces. Se muestran los resultados de un experimento típico.

4.4.6 Evaluación de la capacidad protectora de las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 en el modelo MICA

Después de evidenciar la inmunogenicidad de las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 en ratones OF-1, se procedió a evaluar la capacidad protectora de estas ante la infección con la cepa letal *B. pertussis* BP18323 (acápites 3.20.5 y 3.20.6). En el ensayo se incluyeron, además, las preparaciones vacunales acelulares PTg/FHA/Prn1, PTg/FHA/PRH1-CL-2 y PTg/FHA. A partir de conocer que la sensibilidad del modelo MICA permite diferenciar solamente entre animales inmunizados y controles negativos (Xing y cols., 2014a), el ensayo se diseñó con el propósito de conocer cuáles de las preparaciones vacunales acelulares eran capaces de inducir una respuesta protectora similar a una dosis protectora de una preparación celular. Para ello, se incluyó un grupo control positivo, de ratones inmunizados con 0,5 UI de la preparación vacunal celular de referencia *B. pertussis* VPR (99) 11. Como control negativo, se incluyó un grupo de animales a los que se les administró alúmina en PBS. Los animales de los diferentes grupos ($n = 17$) se inmunizaron una vez con tres dosis de las diferentes combinaciones antigénicas PTg/FHA/Prn: Dosis Mayor 5/2,5/2,5 (μg); Dosis Intermedia 1/0,5/0,5 (μg) y Dosis Menor 0,2/0,1/0,1 (μg). Veintiún días después de la inmunización, los animales se inocularon vía intracerebral con una dosis letal de la cepa BP18323. Los animales de cada grupo se mantuvieron en observación durante 14 días para registrar la mortalidad.

Como se muestra en la figura 28, el 100 % de los ratones inmunizados con el control negativo no sobrevivió el desafío, mientras que el 94 % de los ratones inmunizados con la preparación vacunal celular sobrevivió al mismo ($p < 0,01$). En los animales inmunizados con la Dosis Mayor, para todas las preparaciones vacunales acelulares ensayadas, se observó una protección similar al grupo control positivo ($p \geq 0,05$) y diferente del grupo control negativo ($p < 0,01$). En los animales inmunizados con la Dosis Intermedia, se observó un efecto protector similar al grupo control positivo ($p \geq 0,05$) y diferente del grupo control negativo ($p < 0,01$), solamente, para las preparaciones vacunales PTg/FHA/PRH2-1 (75 %) y PTg/FHA/Prn2 (70 %), a diferencia de los grupos inmunizados con las preparaciones vacunales PTg/FHA/PRH1-CL-2 (56 %), PTg/FHA (53 %) y PTg/FHA/Prn1 (41%), que sí difirieron significativamente ($p < 0,01$) de los grupos control positivo y negativo. En todos los grupos inmunizados con la Dosis Menor se observó una supervivencia sin diferencias estadísticas respecto al grupo control negativo ($p \geq 0,05$).

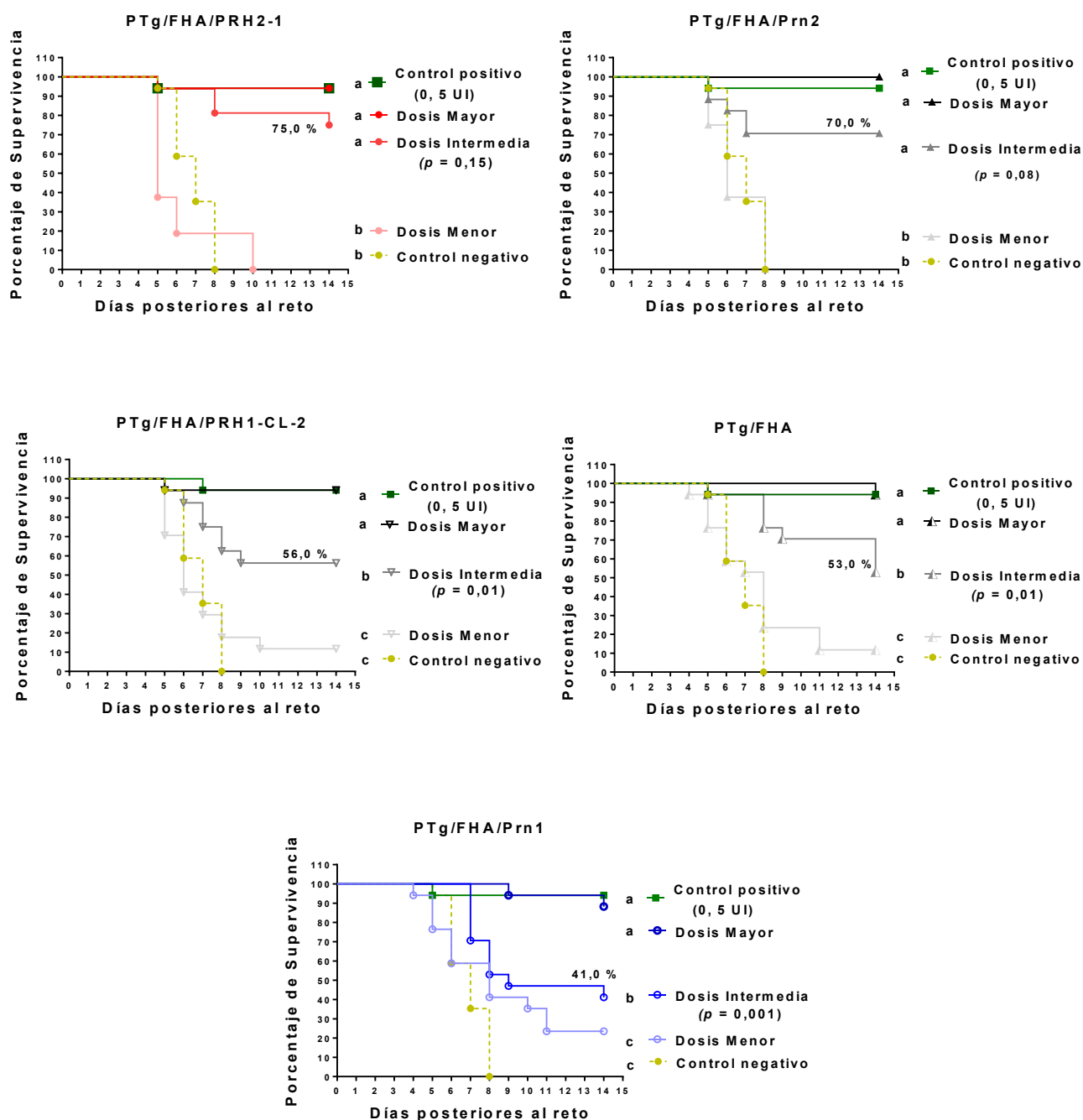


Figura 28. Protección conferida por las preparaciones vacunales PTg/FHA/PRH2-1, PTg/FHA/Prn2, PTg/FHA/PRH1-CL-2, PTg/FHA y PTg/FHA/Prn1 ante la cepa letal BPCNIC0311. Cada preparación vacunal acelular se evaluó con tres dosis diferentes designadas: Dosis Mayor, Intermedia y Menor. Los inmunógenos se adyuvaban con alúmina y se administraron a los diferentes grupos ($n = 17$). Las diferencias entre las curvas de supervivencia se determinaron mediante la prueba de *Log-rank*. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,01$). El valor de p asociado a la Dosis Intermedia resulta de comparar respecto al control positivo (preparación vacunal celular; 0,5 UI). Los valores porcentuales (%) asociados a la curva de la Dosis Intermedia representan el porcentaje de supervivencia en el día 14. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

5 DISCUSIÓN

El aumento de la incidencia de pertussis en países con altas coberturas de vacunación constituye una preocupación internacional (WHO, 2015). Las causas de este fenómeno no están del todo esclarecidas (Domenech de Celles y cols., 2016). El incremento en el número de casos ocurre tanto en países que utilizan vacunas acelulares como en los que emplean las de tipo celular (Guimaraes y cols., 2015; Wiggers y cols., 2015). Dentro de las estrategias dirigidas a evitar el aumento del número de infectados se encuentran la inmunización de madres gestantes (Walls y cols., 2016) y la reactivación en adolescentes y adultos (McGarry y cols., 2014). En estos grupos poblacionales, la Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de vacunas acelulares (WHO, 2016). Sin embargo, algunos estudios muestran una mayor incidencia de infectados en adolescentes inmunizados y reactivados con vacunas acelulares respecto a los inmunizados con vacunas celulares y reactivados con acelulares (Sheridan y cols., 2015).

En comparación con las vacunas celulares, las acelulares contienen un número reducido (< 5) de componentes específicos de *B. pertussis*, entre ellos PT_Q, FHA y Prn1 (WHO, 2015). La respuesta de Ac contra PT y Prn es la que más contribuye en la protección contra pertussis (Cherry y cols., 1998; Storsaeter y cols., 2003). Sin embargo, ambos antígenos vacunales difieren de los encontrados en los aislados de *B. pertussis* circulantes. Las vacunas se manufacturan con cepas que producen Prn1 (Mooi y cols., 2014). Por el contrario, los estudios epidemiológicos muestran el predominio de cepas que producen la proteína Prn2 en países como Australia, Estados Unidos, Brasil, Canadá, (Octavia y cols., 2012; Shuel y cols., 2013; Andrade y cols., 2014; Bowden y cols., 2014) y en 12 países europeos con la excepción de Polonia (van Gent y cols., 2015). Estudios en ratones sugieren que las cepas que producen Prn2 se adaptan mejor a la presión selectiva inducida por las vacunas celulares y acelulares respecto a cepas Prn1 (King y cols., 2001; Komatsu y cols., 2010). Otros estudios sugieren que las variaciones en los lazos de Prn desempeñan una función crucial en la evasión inmune mediada por anticuerpos (Hijnen y cols., 2007b). A partir de estas evidencias se plantea que las variaciones en pertactina pudieran favorecer, en humanos, el escape inmunológico de *B. pertussis* durante la fase de declive de la respuesta inmune y contribuir a la emergencia y predominio de las cepas Prn2 (Mooi y cols., 2014). Esta hipótesis se apoya también en estudios previos que demostraron la existencia de Ac tipo específicos anti-Prn1 o anti-Prn2 en sueros humanos, a pesar de existir una elevada reactividad cruzada entre Prn1 y Prn2 (He y cols., 2003). En este sentido la inclusión de Prn2 en las vacunas podría aumentar la efectividad de las

mismas contra las cepas productoras de Prn2. Sin embargo, se desconoce si la función protectora de Prn2 es similar a Prn1 en los modelos experimentales murinos, en particular en el modelo MICA, único ensayo validado que evalúa la capacidad protectora de las vacunas acelulares en términos de animales vivos y muertos. Vale recordar que la tosferina es una enfermedad mortal.

Las diferencias entre las vacunas y los aislados de *B. pertussis* circulantes, también se deben a elementos relacionados con la fabricación de las mismas. La enzima PT es inactivada con agentes químicos como el formaldehído. Este procedimiento destruye el 80 % de los epitopos neutralizantes presentes en la molécula PT nativa y da lugar al toxoide PT_Q (Ibsen, 1996). El mismo método se utiliza para inactivar las trazas de PT remanentes en las muestras purificadas de los otros componentes (FHA y Prn), por lo que también se afectan significativamente las propiedades inmunológicas de estos dos antígenos (di Tommaso y cols., 1994). Se postula, que en las moléculas inactivas de PT_Q, existen nuevos epitopos los cuales inducen células B de memoria menos efectivas, las cuales llegan a ser dominantes durante las sucesivas dosis de inmunización. Estas células B de memoria, podrían ser activadas en la infección natural mediante el mecanismo del pecado antigénico original y producir Ac inefectivos contra *B. pertussis* (van den Biggelaar y Poolman, 2016). Una alternativa eficiente a la inactivación química de PT es la inactivación genética, la cual ha dado lugar a la molécula PTg. La proteína PTg es más inmunogénica que PT_Q y mantiene las propiedades adyuvantes de la toxina nativa, razón por la cual se utilizan cantidades cinco veces inferiores en las vacunas respecto al antígeno PT_Q. Sin embargo, en la actualidad, no existen vacunas comerciales con este antígeno (Seubert y cols., 2014).

A partir de considerar que actualmente las cepas de *B. pertussis* circulantes producen mayores concentraciones de la PT nativa y la variante Prn2, mientras que las vacunas actuales contienen los antígenos PT_Q, FHA y Prn1; en el presente trabajo se trazó una estrategia para estudiar el efecto protector de una preparación vacunal basada en los antígenos PTg, FHA y Prn2. Con este propósito, se concibió la obtención de los antígenos PTg, FHA y Prn2, a partir de la cepa genéticamente modificada *B. pertussis* BPCNIC0311.

Además, a partir de conocer que las variantes Prn1 y Prn2 son producidas por el 80 % de los aislados clínicos (Bart y cols., 2014), se concibió obtener una pertactina híbrida de Prn1 y Prn2, denominada PRH, en el hospedero de *E. coli*. En el diseño de las proteínas PRH se incluyeron las regiones variables R1 de Prn1 y Prn2, por ser las regiones implicadas en la inducción de Ac tipo específicos en humanos. La inmunogenicidad y capacidad protectora de diferentes variantes de PRH se evaluó en ratones en

comparación con las proteínas Prn1 y Prn2, obtenidas en *E. coli*. Posteriormente, se estudió en ratones la inmunogenicidad y capacidad protectora de diferentes preparaciones vacunales de tres componentes (PTg/FHA/Prn) basadas en los antígenos PTg, FHA, Prn2 y PRH. La estrategia trazada contribuyó a valorar la posibilidad de introducir en las vacunas la variación tipo dos en combinación con PTg y FHA, con el propósito futuro de evaluar en humanos la inducción de Ac tipo específicos y su impacto en el control de la tosferina.

En la construcción de la pertactina híbrida se consideraron las características inmunológicas y estructurales de la proteína pertactina relacionadas con la función protectora. En el diseño fue necesario incluir la secuencia completa de Prn así como las regiones R1 de Prn1 y Prn2. En primer lugar, porque las diferencias aminoacídicas entre Prn1 y Prn2 residen exclusivamente en la R1 (Mooi y cols., 1998), la cual contiene epitopos protectores (King y cols., 2001). Además, con respecto a otras especies de *Bordetella*, el 66 % (35/53) de las mutaciones encontradas en pertactina se posicionan en lazos en un segmento que abarca los primeros 300 aa de la secuencia pertactina próximos al extremo amino (Diavatopoulos y cols., 2006). Este elemento guarda relación con el hecho de que el 97 % de los sueros de individuos infectados y vacunados reconocen los primeros 110 aa del extremo amino (Hijnen y cols., 2008). Asimismo, en los primeros 230 aa de esta región se localizan epitopos dominantes y subdominantes para células T cooperadoras CD4 + (Stenger y cols., 2009). Además, en el diseño se consideró la secuencia que comprende los últimos 138 aa del extremo carboxilo, excluida de la estructura tridimensional informada por Emsley y cols (Emsley y cols., 1996). Estudios de mapeo epitópico con diferentes AcM anti-Prn sugirieron que esta región se estructura próxima al extremo amino y la R1 (Hijnen y cols., 2004). A partir de este hallazgo, Hijnen y cols postularon que la disposición espacial de la región amino, R1 y carboxilo favorecen la unión de Ac contra epitopos discontinuos de carácter protector. Posteriormente, los autores demostraron que diferentes AcM que reconocen esta región, bloquean la unión de sueros humanos de alta afinidad (Hijnen y cols., 2007b). De igual forma, se consideró importante incluir en el diseño, la región del plegamiento de pertactina que abarca la mitad de la secuencia de Prn, próxima al extremo carboxilo (Oliver y cols., 2003; Renn y cols., 2012). La delección parcial de esta región, por el extremo carboxilo, suprime el reconocimiento de los Ac específicos anti-Prn que unen los epitopos discontinuos de carácter protector (Hijnen y cols., 2007b).

Estos elementos sugirieron un diseño aditivo, realizable mediante la fusión de dos fragmentos A y B, cada uno con un lazo de la R1 de Prn1 o Prn2.

Para definir la extensión de los fragmentos A y B se tuvieron en cuenta los elementos estructurales de la proteína Prn. En primer lugar, esta molécula se pliega en forma de una hélice beta dextrógira conformada por sucesivas hebras beta. Las hebras beta se ordenan transversalmente en forma de V y longitudinalmente forman tres láminas beta (Emsley y cols., 1996). En este sentido, se consideró importante preservar la regularidad topológica de las hebras y láminas beta durante la fusión de los fragmentos A y B, para permitir un plegamiento adecuado de la molécula híbrida. Además, se consideró importante incluir la región de la hélice beta con contactos con el lazo de la R1, para no afectar la estructura nativa de este.

Las secuencias de las moléculas híbridas se modelaron. En los modelos obtenidos se comprobó que la región seleccionada de la hélice beta con contactos con el lazo de la R1, permite que los lazos R1 de Prn1 y Prn2 se dispongan espacialmente a distancias adecuadas y sin impedimentos estéricos. El análisis de la superposición de las hebras beta de las vueltas de la hélice en la interface de los fragmentos, mostró una disposición espacial muy similar entre las mismas. Se verificó que la fusión de los fragmentos A y B genera un modelo de PRH en el cual se preservan las tres láminas beta de la hélice, lo cual es importante para la estructuración correcta de los epitopos protectores. En conjunto los resultados sugirieron que el diseño híbrido podía ser factible y que las proteínas PRH de Prn1 y Prn2, generadas a partir de este, pudieran ser funcionales inmunológicamente contra *B. pertussis*.

Se conoce que el plegamiento de pertactina es vectorial, se inicia en la región del plegamiento y progresa en dirección al extremo amino en un mecanismo independiente de ATP (Renn y cols., 2012). Ello permite el apilamiento gradual de las hebras beta y la consiguiente estructuración de las tres láminas betas de la hélice a todo lo largo de la molécula. La fuerza que dirige el plegamiento permite renaturalizar *in vitro* a moléculas de Prn recombinantes producidas de forma insoluble en el citoplasma de *E. coli* (Hijnen y cols., 2005). Sin embargo, como la proteína PRH resulta de la fusión de dos fragmentos, en la cual el fragmento A consiste en una extensión artificial de la hélice beta se diseñaron secuencias conectoras procedentes de la región del plegamiento. La secuencia conservada IDNATWVMTDN al duplicarse en tándem (IDNATWVMTDNIDNATWVMTDN) podría constituir un paso quimérico en la hélice beta y favorecer el plegamiento del fragmento A. La inserción de esta secuencia como un conector entre los fragmentos A y B se utilizó también con el objetivo de evaluar el efecto de separar las R1 correspondientes a Prn1 y Prn2 presentes en PRH. Finalmente, se diseñaron dos series de

PRH con tres variantes cada una. En la serie 1-2 la R1 de Prn1 se posiciona próxima al extremo amino y viceversa para la serie 2-1.

La estrategia de clonaje de los genes para las pertactinas híbridas se basó en el ensamblaje de dos segmentos A y B complementarios con la ayuda de la técnica de PCR. Se realizaron múltiples reacciones de amplificación por separado con diferentes juegos de oligonucleótidos cebadores. Como molde se utilizaron dos construcciones derivadas del vector pET-28a con los genes *prnA1* y *prnA2* codificadores de Prn1 y Prn2, respectivamente. En total se obtuvieron seis construcciones de PRH. El clonaje en el vector pET-28a permite producir las proteínas fusionadas a una secuencia de seis histidinas consecutivas en el extremo amino, lo que facilita su purificación mediante la cromatografía de afinidad al ión Ni^{2+} . La secuencia del ADN de las diferentes construcciones genéticas obtenidas se verificó por SAUT, lo que permitió la evaluación posterior de la expresión de los diferentes genes codificadores para Prn y PRH.

Las proteínas Prn1, Prn2 y las seis variantes de PRH se produjeron a porcentajes del 25 – 30 % de las proteínas totales, en correspondencia con los resultados obtenidos por Hijnen y cols (Hijnen y cols., 2005), quienes emplearon a *E. coli* para producir las pertactinas recombinantes Prn1 y Prn2, así como versiones truncadas de estas moléculas. La secuencia aminoacídica perteneciente a cada molécula de Prn o PRH producida se verificó por espectrometría de masas. Después del procedimiento de ruptura celular, las proteínas Prn y PRH se obtuvieron como agregados insolubles por lo que se utilizó urea 4 M para su solubilización, condición que fue necesario mantener durante los pasos subsiguientes de purificación. Las seis variantes PRH, así como las proteínas Prn1 y Prn2, se purificaron por cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} . Luego, las proteínas se expusieron a un procedimiento de renaturalización lenta utilizando urea 4 M como agente caotrópico. El análisis de SDS-PAGE reveló que las proteínas se obtuvieron con una pureza de 90 % en todos los casos. Las bandas correspondientes a cada una de las proteínas purificadas se inmunoidentificaron con el anticuerpo monoclonal Pem19 específico contra el epitopo lineal RELSA, el cual se localiza próximo al extremo carboxilo (Emsley y cols., 1996; Hijnen y cols., 2005). El método empleado permitió obtener cada una de las proteínas con la pureza y las cantidades requeridas para los estudios de caracterización inmunoquímicos e inmunológicos planificados.

El plegamiento de pertactina se abordó con anterioridad mediante un método de sustracción lenta del agente caotrópico, hidrocloreuro de guanidinio, a concentraciones de partida de 6 M (Hijnen y cols., 2005). Los autores demostraron que la estructura secundaria de las pertactinas recombinantes Prn1 y

Prn2 purificadas de *E. coli*, determinada por espectroscopía de dicroísmo circular, resultó similar a la pertactina natural purificada de *B. pertussis*. Además, los autores evidenciaron el reconocimiento de las pertactinas recombinantes con los AcMs Pem1 y PeM29, los cuales unen epitopos discontinuos en la proteína pertactina natural (Hijnen y cols., 2004). En particular, el AcM Pem29 reconoce un epitopo discontinuo conformado por los motivos de unión $_{11}\text{GERQH}_{15}$, $_{20}\text{QGSDPGGV}_{24}$ y $_{97}\text{GDTWDDD}_{103}$ localizados en lazos próximos al extremo amino y $_{247}\text{GGFGPGGFGP}_{256}$ ubicado en el lazo de la R1. Al introducir modificaciones puntuales en los motivos $_{11}\text{GERQH}_{15}$ o $_{20}\text{QGSDPGGV}_{24}$ se suprime o disminuye cuatro veces, respectivamente, la interacción entre el AcM Pem29 y la molécula Prn. Por otra parte, si se deletan los primeros 110 aa del extremo amino, también se elimina la interacción entre el AcM y Prn. Por otro lado, la interacción disminuye si se modifica puntualmente la secuencia $_{496}\text{TPLGSAA}_{502}$, la cual no forma parte del epitopo reconocido por Pem29 y se posiciona próxima al extremo carboxilo (Hijnen y cols., 2007b).

En el presente trabajo, las Prn y PRH purificadas fueron también reconocidas por los AcMs Pem1 y PeM29. Es válido aclarar que en las moléculas PRH los motivos $_{11}\text{GERQH}_{15}$ y $_{20}\text{QGSDPGGV}_{24}$, se encuentran solamente en el fragmento A y no en el B. La interacción entre el AcM PeM29 y las diferentes PRH no se afectó, lo que sugiere que con independencia del uso de los conectores CC y CL, el fragmento A se plegó en una conformación que preservó el epitopo discontinuo de carácter protector reconocido por este anticuerpo. Además, aunque de forma indirecta, estos resultados sugieren que el plegamiento ocurrió de forma vectorial según lo propuesto por Renn y cols (Renn y cols., 2012). Por otro lado, el AcM Pem4, que reconoce el epitopo lineal $_{247}\text{GGFGPGGFGP}_{256}$ ubicado en el lazo de la R1, mostró un mejor reconocimiento de las proteínas Prn2 y PRH, en comparación con las proteínas Prn1 y P.69 (Prn1). La variación presente en Prn2 respecto a Prn1 resulta en la duplicación en tándem del epitopo $_{247}\text{GGFGPGGFGP}_{256}$. En total, en Prn2 y las diferentes PRH están presentes dos y tres epitopos $_{247}\text{GGFGPGGFGP}_{256}$ respectivamente, mientras que en la variante Prn1 sólo uno, lo que sugiere que el mejor reconocimiento puede estar asociado a una mayor avidéz entre las moléculas de Pem4 y las variantes Prn2 y PRH.

Además, las pertactinas recombinantes Prn1, Prn2 y PRH obtenidas fueron reconocidas por sueros de individuos reactivados con la vacuna comercial Adacel, sin diferencias respecto a la pertactina natural (P.69) purificada de *B. pertussis*, lo que sugiere que entre las moléculas Prn1, Prn2 y PRH y la pertactina natural P.69 existen epitopos que comparten estructuras similares.

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a demostrar la potencialidad de las diferentes proteínas obtenidas de inducir una respuesta de Ac específicos contra Prn1 y Prn2 en ratones. Estudios precedentes evidenciaron que la pertactina de *B. bronchiseptica* obtenida en *E. coli*, adyuvada con Freund y administrada por la vía subcutánea fue capaz de inducir una respuesta robusta de Ac específicos de tipo IgG (Zhao y cols., 2010). La identidad entre las pertactinas de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* es de 90,9 % (Diavatopoulos y cols., 2006), lo que sugiere que la vía subcutánea también podría ser útil en la evaluación de la pertactina de *B. pertussis*.

En el presente trabajo primero se estimó la menor dosis de antígeno capaz de inducir títulos de Ac en más del 50 % de los animales inmunizados. Se demostró, después de tres inmunizaciones, que las dosis de 0,2 y 2 µg/ratón de la proteína natural P.69 (Prn1) de *B. pertussis*, adyuvada en alúmina y administrada por la vía subcutánea, indujo títulos de Ac sin diferencias estadísticas, no así para la dosis de 0,02 µg/ratón, en la que menos del 30 % de los animales inmunizados generaron títulos de IgG anti-Prn.

Luego, se procedió a evaluar la inmunogenicidad de las PRH en ratones BALB/c utilizando la dosis de 0,2 µg/ratón. Las proteínas evaluadas indujeron Ac específicos contra las proteínas Prn1 y Prn2. Las proteínas P.69 (Prn1), Prn1 y Prn2 indujeron títulos de Ac (IgG) anti-Prn1 similares. Este resultado sugiere, que el procedimiento utilizado en la obtención de las pertactinas recombinantes no afectó la capacidad de estas de activar los efectores específicos que median en la respuesta de Ac. Con anterioridad, Xu y cols utilizaron la vía intraperitoneal y dosis de 5 µg/ratón para comparar pertactinas (Prn1) naturales y recombinantes obtenidas en *E. coli*. En el estudio los autores demostraron que la respuesta de Ac IgG resultó similar para ambas moléculas (Xu y cols., 2011).

Después de la tercera dosis, la variante Prn2, a diferencia de Prn1, indujo mayores títulos de Ac anti-Prn2 que la proteína natural P.69 (Prn1), mientras que las proteínas híbridas PRH1-CL-2 y PRH2-1, a diferencia de las restantes PRH evaluadas, indujeron títulos de Ac anti-Prn1 y anti-Prn2 mayores que los de las proteínas P.69 (Prn1) y Prn1. Los resultados sugieren que la variación tipo dos es más inmunogénica que la de tipo uno y que esta particularidad inmunológica es posible reproducirla en el contexto de una molécula PRH.

Las diferencias observadas en los títulos de Ac (IgG) inducidos por las Prn y las PRH pueden explicarse por la interrelación de múltiples factores. Las proteínas P.69, Prn1, Prn2 y las seis PRH comparten la secuencia γ IVKTGERQHGIHIQGSDP₂₄, la cual contiene un epitopo dominante, restringido por I-A^d para

células T cooperadoras CD4 + (Th CD4+) (Stenger y cols., 2009). Sin embargo, en las proteínas PRH a diferencia de las Prn, la región V₈₁-S₂₆₉ de Prn1 o V₈₁-S₂₇₄ de Prn2 está duplicada. En esta región se localizan cuatro epitopos subdominantes para linfocitos Th CD4+ (Stenger y cols., 2009). Es posible que durante el procesamiento de las PRH en el interior de las células presentadoras de antígenos, se favorezca el procesamiento de la región duplicada y que la doble dosis de los epitopos subdominantes incremente la avidéz por las moléculas MHC-II (I-A^d). En este sentido, el número de complejos MHC-II/péptidos subdominantes en la superficie de las células presentadoras de antígenos pudo ser relativamente mayor y en consecuencia producirse una activación más cooperada del repertorio de células T y B efectoras y de memoria. Con anterioridad se demostró que los péptidos restringidos por I-A^d pueden competir entre ellos durante la unión a la molécula de MHC-II (Buus y cols., 1987).

Similar a lo explicado para los epitopos T pudo suceder para los epitopos de células B. En la región delimitada por V₈₁-S₂₆₉ de Prn1 o V₈₁-S₂₇₄ de Prn2, que como se mencionó antes está duplicada en las proteínas PRH, se posicionan tres lazos con epitopos para células B, uno de ellos el lazo R1. En las moléculas Prn2 y PRH el epitopo B del lazo R1 reconocido por el AcM Pem4, se encuentra duplicado y triplicado, respectivamente, con respecto a las moléculas Prn1. Podría especularse que las moléculas Prn2 y PRH son reconocidas y procesadas por las células B ventajosamente con respecto a las moléculas Prn1, y por tanto en Prn2 y PRH, se favorecen los eventos implicados en la respuesta de anticuerpos específica.

Al evaluar las clases de inmunoglobulinas presentes en la respuesta de Ac inducida, se comprobó que las moléculas Prn y PRH recombinantes indujeron las subclases de inmunoglobulinas IgG2a e IgG2b. Esta comprobación es importante debido a que las inmunoglobulinas IgG2a e IgG2b son mediadoras de la respuesta celular contra infecciones producidas por bacterias extracelulares en ratones (Skerry y Mahon, 2011).

Para caracterizar la respuesta de Ac inducida por las variantes Prn2 y las proteínas híbridas PRH1-CL-2 y PRH2-1, los sueros de los animales inmunizados se evaluaron mediante ELISA contra péptidos lineales con secuencias de epitopos involucrados en la respuesta protectora. Las proteínas Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 indujeron títulos de Ac contra los péptidos de la R1 de Prn1 y Prn2 mayores que los inducidos por las proteínas P.69 (Prn1) y Prn1. Este resultado está en conformidad con estudios previos con sueros de conejos que sugirieron que la R1 de Prn2 es más inmunogénica que la R1 de Prn1 (Hijnen y cols., 2008). En otro estudio, se demostró que el AcM Pem4, que reconoce la R1, protegió pasivamente a

ratones ante cepas de *B. pertussis* productoras de Prn1 o Prn2 (King y cols., 2001). En conjunto, los resultados sugieren que la variación tipo dos, al ser más inmunogénica, podría contribuir más a la respuesta protectora cruzada que la variación de tipo uno.

De igual forma, las proteínas Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 generaron títulos de Ac (IgG) significativos contra un péptido de la región del extremo amino respecto al control negativo. El péptido evaluado contiene el motivo GERQH, el cual forma parte del epitopo discontinuo reconocido por el AcM Pem29. Con anterioridad se demostró que este motivo contribuye a la capacidad protectora de moléculas sintéticas que mimetizan el epitopo discontinuo del AcM Pem29 (Hijnen y cols., 2007a).

En la respuesta protectora mediada por anticuerpos anti-Prn intervienen anticuerpos, como el AcM Pem1 y Pem29, que reconocen epitopos discontinuos. Estos anticuerpos bloquean la unión de sueros humanos de alta afinidad (Hijnen y cols., 2007b). Con el objetivo de estudiar si en la respuesta de Ac inducida por las proteínas Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 median elementos estructurales presentes en la molécula nativa P.69 (Prn1) se realizó un ELISA. En el ensayo se evaluó el reconocimiento de la pertactina natural P.69(Prn1), así como de las proteínas recombinantes Prn1, Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 desnaturalizadas por calor (95 °C), por los AcMs Pem1, Pem4 y Pem29 y los sueros murinos específicos generados contra cada una de las diferentes proteínas. Con anterioridad, Junker y cols demostraron por titulación térmica y espectroscopía de dicroísmo circular que la estructura de la molécula pertactina se modifica significativamente a temperaturas superiores a 90 °C (Junker y cols., 2006). De conformidad con lo informado por Junker y cols, el reconocimiento específico de los diferentes AcM y los sueros específicos disminuyó significativamente contra la proteína natural P.69 (Prn1) y las demás proteínas desnaturalizadas. Este resultado sugiere, aunque de forma indirecta, que en las proteínas recombinantes Prn y PRH se preservan características estructurales presentes en la pertactina natural P.69 (Prn1), las cuales pudieran estar implicadas en la respuesta de anticuerpos de carácter protector.

La capacidad de las proteínas Prn2, PRH1-CL-2 y PRH2-1 de inducir una respuesta inmune protectora ante la infección con la cepa letal BP18323 se evaluó en el modelo MICA, el cual se emplea para evaluar la capacidad protectora de las vacunas acelulares (Xing y cols., 2014b). En un estudio previo las dosis de 20 y 4 µg/ratón de la proteína Prn1 indujeron un efecto protector en este modelo (Xu y cols., 2009). Sin embargo, la variante Prn2 no se evaluó en ese estudio. En el presente trabajo, de conformidad con lo encontrado por Xu y cols, al evaluar la dosis de 25 µg/ratón, se observó que las proteínas Prn1, Prn2 y las pertactinas híbridas PRH1-CL-2 y PRH2-1 aumentaron significativamente la supervivencia de los

ratones respecto al control negativo. Este resultado sugiere que en las proteínas recombinantes purificadas están presentes características estructurales de la Prn natural implicadas en la respuesta protectora. Sin embargo, para la dosis de 5 µg/ratón, sólo las proteínas PRH2-1 o Prn1, confirieron una supervivencia significativa en comparación con el grupo control negativo.

Las diferencias observadas en la protección conferida por las proteínas Prn1 y Prn2, sugieren que frente a la cepa BP18323, para la dosis de 5 µg/ratón, la proteína Prn1 promueve una respuesta más efectiva en comparación con Prn2. El resultado observado puede estar relacionado con que la cepa BP18323 expresa la variante de pertactina tipo seis (Prn6), la cual presenta una R1 más parecida a Prn1 (96 % de identidad) en comparación con Prn2 (73,3 % de identidad). En la R1 de las moléculas Prn1 y Prn6 existe solamente un cambio conservativo en la posición 268 próxima al RGD (Ala en Prn1 y Gly en Prn6) (Mooi, 2010). Las diferencias observadas entre Prn1 y Prn2 en cuanto a conferir supervivencia frente a la cepa BP18323 (Prn6), están en conformidad con la hipótesis planteada por Mooi, la cual presupone que la divergencia entre las cepas vacunales y las circulantes puede incidir en la emergencia de nuevas cepas y el aumento de la incidencia, particularmente, durante el declive de la inmunidad específica (Mooi y cols., 1999). Es posible que durante la fase de contracción de la respuesta inmune, en la medida que disminuye la concentración de los Ac específicos en los nichos de enfrentamiento inmune, la efectividad de los mismos dependa más de los Ac generados contra epítopos discontinuos que involucran la R1 homóloga y menos de los Ac dirigidos contra epítopos lineales implicados más en la reactividad protectora cruzada. En humanos, el reconocimiento de Prn1 por parte de los sueros de pacientes inmunizados con vacunas acelulares (que contienen Prn1) es inhibido por AcMs que reconocen epítopos de la R1 (Pem1) que fueron generados en ratones por la inmunización con Prn1; sin embargo, este efecto no se observa con sueros de pacientes infectados con cepas productoras de Prn2 (He y cols., 2003). Aunque en los sueros de ratones y conejos no se ha podido demostrar la presencia de Ac tipo específicos contra Prn1 o Prn2 (Hijnen y cols., 2008), los resultados aquí obtenidos, al igual que otros estudios precedentes (King y cols., 2001; Komatsu y cols., 2010), sugieren que los mismos pueden inducirse y favorecer la protección contra una cepa productora de la variante homóloga.

La proteína PRH2-1 indujo un efecto protector similar a Prn1 para las dosis de 25 µg/ratón y 5 µg/ratón, a diferencia de la proteína PRH1-CL-2, la cual también contiene la R1 de Prn1. En ratones, la respuesta de Ac protectora anti-Prn puede inducirse contra epítopos discontinuos cuyos motivos de unión primarios se encuentran en las regiones del extremo amino y la R1, aunque también en este

reconocimiento median epitopos cercanos al extremo carboxilo. Esta característica de Prn, sugirió a Hijnen y cols que las regiones extremo amino, R1 y extremo carboxilo están próximas espacialmente (Hijnen y cols., 2007b). En las proteínas Prn1 y PRH2-1 el lazo R1 de Prn1 se encuentra en su entorno natural próximo al extremo carboxilo, lo cual pudo favorecer la generación de Ac anti-Prn1, y por tanto ambas ser más efectivas que PRH1-CL-2 al reducir la dosis de 25 µg/ratón a 5 µg/ratón. Sumado a lo anterior, podrían incidir los efectos derivados de la cercanía entre los extremo amino y extremo carboxilo. A partir de esta característica estructural de Prn, Hijnen y cols propusieron que la región conservada del extremo carboxilo, enmascara o encubre los epitopos protectores próximos al extremo amino y la región R1 (Hijnen y cols., 2007b). Esta región está constituida por los últimos 138 aa que no están incluidos en la estructura cristalográfica 1DAB. En Prn2 y PRH1-CL-2 la variación tipo dos se localiza relativamente más próxima al extremo carboxilo en comparación con PRH2-1. Es probable que en la proteína PRH2-1 la variación tipo dos y los epitopos del extremo amino, al estar más alejados del extremo carboxilo, estén relativamente más accesibles al reconocimiento por parte de los receptores de las células B y en consecuencia, contribuir más a la activación de una respuesta cruzada de carácter protector.

Por otro lado, para la dosis de 25 µg/ratón, todas las proteínas evaluadas indujeron un efecto protector, aunque al final del experimento el porcentaje de supervivencia fue mayor para la proteína Prn2. Los resultados sugieren que la proteína Prn2 puede generar un efecto protector similar al inducido por Prn1, ante la cepa BP18323, dependiendo del contexto de su presentación al sistema inmunológico. Probablemente, la inmunización con la proteína Prn2 a la dosis mayor induce una respuesta de anticuerpos protectora cruzada que compensa la ausencia de Ac tipo específicos anti-Prn1. Es posible que el efecto protector observado para Prn2 a la dosis mayor, pueda inducirse a menores dosis con la coadministración de la molécula adyuvante PTg obtenida partir del hospedero *B. pertussis*.

En la literatura consultada no se encontró un procedimiento que describiera la obtención de los antígenos PTg, FHA y Prn2 de manera integrada. Ozcengiz y cols obtuvieron las proteínas PT y FHA a partir de cultivos estáticos, con un procedimiento que incluyó la precipitación de PT y FHA con sales de sulfato de amonio, seguido de la reconstitución del precipitado y posteriormente, un paso de intercambio catiónico en presencia de urea 2 M (Ozcengiz y cols., 2004). Por otro lado, Gould-Kostka y cols purificaron pertactina después de calentar la bacteria a 60 °C y la utilización de dos pasos

cromatográficos sucesivos de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad (Gould-Kostka y cols., 1990).

En el presente trabajo, y a partir de los antecedentes mencionados, se diseñó un procedimiento para la obtención de PTg, FHA y Prn2, a partir de la cepa de *B. pertussis* modificada genéticamente BPCNIC0311. El crecimiento de la cepa *B. pertussis* BPCNIC0311 se realizó en cultivos agitados en el medio químicamente definido THIIJS (Thalen y cols., 2006b). En estas condiciones se alcanzaron densidades celulares con una DO de 4,5 y concentraciones de PTg de 9,5 µg/mL a las 18 h de cultivo. Los resultados obtenidos son consistentes con estudios precedentes que demostraron que el crecimiento de *B. pertussis* en el medio THIIJS reduce los tiempos de cultivo (Thalen y cols., 2006a) y se alcanzan concentraciones de PT superiores a 1,5 mg/L/Abs (Thalen y cols., 2006b). Estos resultados indicaron que durante la obtención de la cepa genéticamente modificada no se afectó la capacidad de esta de producir concentraciones adecuadas de PTg. Al final del cultivo se evidenció mediante la secuenciación de ADN, la presencia de las modificaciones genéticas esperadas para los genes *ptxA* y *prnA2* codificadores de PTg y la proteína Prn2, respectivamente, lo que sugiere que los cambios genéticos introducidos artificialmente son estables en las condiciones de cultivo ensayadas.

Para la purificación de PTg y FHA se eliminó el paso de precipitación por sulfato de amonio empleado en el procedimiento general y se mantuvo el paso de alta resolución de intercambio catiónico en presencia de 2 M de urea. El uso de la urea a la concentración de 2 M en la purificación de PTg y FHA resultó indispensable para evitar la agregación de estas proteínas a pH 6. La purificación de Prn2 se realizó después de calentar el precipitado celular a 60 °C, seguido de la precipitación de los ácidos nucleicos contaminantes con fosfato de calcio y la posterior utilización de la cromatografía de intercambio aniónico. Las proteínas PTg, FHA y Prn2 se purificaron con una pureza de 90 % y rendimientos totales promedios de 5 mg de los antígenos por fermentación. Las cantidades de endotoxinas detectadas fueron inferiores a las descritas para las vacunas acelulares (< 100 UE/dosis) (Brito y Singh, 2011).

El análisis mediante SDS-PAGE y *Western blotting* de las proteínas purificadas, en condiciones reductoras, demostró que la migración de la subunidad S1 de la proteína PTg se correspondió con la talla esperada. La respuesta de Ac contra PT, ya bien después de una infección o posterior a la administración de una vacuna, se dirige casi exclusivamente contra la subunidad S1 (Thomas y cols., 1989). Por su parte, la proteína FHA se obtuvo de conformidad a la obtenida por Ozcengiz y cols (Ozcengiz y cols., 2004). Respecto a esta proteína se conoce que los Ac protectores reconocen sólo

aquellas moléculas de FHA o fragmentos de esta con tamaños mayores a 92 kDa (Redd y cols., 1988). En el presente estudio, la proteína FHA se obtuvo como una banda mayoritaria cercana a los 250 kDa, mientras que los fragmentos se observaron como bandas en extremo tenues y con tallas superiores a 92 kDa. Estos fragmentos derivan de la escisión de la cadena polipeptídica de FHA y se producen eventualmente por la acción mecánica de fuerzas de cizallamiento producidas por la agitación y la aireación durante el crecimiento de la bacteria en biorreactores (Rodriguez y cols., 1993). El patrón de SDS-PAGE obtenido para las proteínas PTg y FHA fue semejante al mostrado por Watanabe y cols (Watanabe y cols., 2002). En dicho estudio se demostró que la coadministración de ambas proteínas indujo protección en el modelo de reto intracerebral y en un modelo de reto respiratorio. Por otro lado, la proteína Prn2 purificada en el presente trabajo, migró a la talla esperada y se obtuvo en correspondencia con los resultados alcanzados por Gould-Kostka (Gould-Kostka y cols., 1990). De igual forma, el patrón de SDS-PAGE para la proteína purificada Prn2 resultó similar al descrito por Romanos y cols para una pertactina nativa, los cuales demostraron además, la capacidad de la misma de conferir protección, coadministrada con PT_Q, en un modelo de reto intracerebral (Romanos y cols., 1991).

La utilización de la cepa BPCNIC0311 así como las condiciones de crecimiento utilizadas en el presente trabajo, muestran algunas ventajas en comparación con el estudio de Ozcengiz y cols, en el que PT y FHA se purificaron también como moléculas separadas (Ozcengiz y cols., 2004). En el estudio señalado, el crecimiento de *B. pertussis* y la producción de PT se realizaron en cultivos estáticos y tiempos excesivamente largos (5 días). Vale destacar que con propósitos futuros, estas condiciones resultan inviables a escala industrial en las que la agitación y la aireación, entre otros parámetros, son cruciales para la reproducibilidad de lote a lote. En el presente estudio, a diferencia del antes mencionado, se utilizó el medio de cultivo químicamente definido THJS y el medio sólido CHAB. Ambos medios se prepararon desprovistos de sangre y de hidrolizados de la proteína caseína. Los hidrolizados de caseína son responsables de las diferencias observadas en las curvas de crecimiento en cultivos agitados de *B. pertussis* (Thalen y cols., 2008). Debido a su origen animal, la utilización de ambos aditivos no resulta totalmente segura en procesos de producción de moléculas para uso parenteral en humanos. Adicionalmente, las proteínas PT y FHA obtenidas por Ozcengiz y cols, se corresponden con productos intermedios que posteriormente deben ser tratados químicamente para la inactivación de PT, a diferencia de las moléculas PTg y Prn2 purificadas en el presente trabajo, en las cuales se verificaron, mediante MS/MS, la presencia de las mutaciones introducidas artificialmente. Por otro lado, en la

purificación de PTg y FHA, no se utilizó la precipitación por sulfato de amonio antes del paso de alta resolución. Se demostró que el sobrenadante de cultivo, en presencia de urea 2 M, puede ajustarse a las condiciones de pH y conductividad necesarias para el paso de intercambio catiónico. Con propósitos futuros, este resultado permite el uso de la ultrafiltración para la concentración y ajuste del pH y conductividad del sobrenadante de cultivo. Además, evita la incubación prolongada (16 h) asociada a la precipitación salina y la centrifugación, que exigen posteriormente la solubilización de las proteínas precipitadas.

Con respecto a la purificación de pertactina también se aprecian ventajas sobre los procedimientos informados por Gould-Kostka y Li y cols, en los cuales se utilizan dos pasos cromatográficos sucesivos (Gould-Kostka y cols., 1990; Li y cols., 2016). En el presente estudio, se introdujo un paso de precipitación por fosfato de calcio, con el objetivo de precipitar los contaminantes nucleicos que interfieren en el paso de intercambio aniónico. Se demostró que pertactina se purifica con una pureza de 90 % y a las cantidades requeridas para su caracterización en un paso cromatográfico.

Los estudios físico-químicos e inmunoquímicos realizados a las proteínas PTg, FHA y Prn2 purificadas, demostraron que ellas presentan la pureza, las modificaciones introducidas, la integridad, la antigenicidad y las cantidades requeridas para abordar estudios inmunológicos.

Las vacunas acelulares que incluyen los componentes PT_Q, FHA y Prn1 son igualmente efectivas a las que incluyen PTg, FHA y Prn1, aunque estas últimas utilizan cantidades de antígenos cinco veces inferiores (Edwards y cols., 1995). En ratones, los títulos máximos de anticuerpos neutralizantes anti-PT se alcanzan a dosis entre dos y tres microgramos de PTg (Nencioni y cols., 1990). En humanos, la inmunización con la combinación PTg/FHA/ Prn1 a dosis 5/2,5/2,5 (µg) induce una respuesta de Ac específica contra PT, FHA y Prn1 y una eficacia de 85 % (Greco y cols., 1996). Es por ello, que en diferentes estudios de inmunización y protección en ratones se utilizan estas cantidades de antígenos (WHO, 2012; Xing y cols., 2014a). En el presente estudio, los antígenos PTg, FHA, Prn2 purificados del hospedero *B. pertussis* BPCNIC0311 y la proteína PRH2-1, obtenida a partir de *E. coli*, se evaluaron tomando en consideración la vía intraperitoneal, las cantidades 5/2,5/2,5 (µg) y el número de dosis recomendadas (dos dosis espaciadas cada 21 días), para la evaluación de preparaciones acelulares con el componente PTg (WHO, 2012; Xing y cols., 2014a). La respuesta humoral y celular específica se evaluó mediante la inmunización con las preparaciones vacunales de tres componentes PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1.

Las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 indujeron títulos de Ac similares contra cada uno de los antígenos independientes PTg, FHA, Prn1 y Prn2, tanto en la línea de ratones BALB/c como en OF-1. Similar a lo encontrado en los experimentos de ratones BALB/c inmunizados con las proteínas individuales Prn2 o PRH2-1, ambas preparaciones vacunales indujeron títulos de Ac significativos contra los péptidos lineales de la R1 de Prn1 y Prn2. Sin embargo, ninguna de las preparaciones indujo Ac contra los péptidos del extremo amino y la R2 en los ratones inmunizados BALB/c o OF-1. En relación a este resultado puede que la dosis de Prn usada en las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1, doce veces superior respecto a la utilizada en la evaluación individual de Prn2 y PRH2-1, contribuya junto a la vía de inmunización y número de antígenos utilizados, a que la inmunodominancia de la respuesta humoral se dirija hacia otros epitopos presentes en el inmunógeno.

Por otro lado, en los ratones OF-1, se observó que el porcentaje de reconocimiento de los péptidos de la R1 fue menor en comparación con los BALB/c. Los ratones OF-1 poseen una constitución genética heterogénea, similar a lo que ocurre en las poblaciones humanas, por lo que resulta crucial que ambas preparaciones vacunales, PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1, se evalúen en función de la capacidad protectora en comparación con preparaciones vacunales que incluyan la variante Prn1. En este sentido, vale mencionar que las proteínas individuales Prn2 y PRH2-1 a la dosis de 0,2 µg/ratón indujeron Ac que reconocieron mejor los péptidos del extremo amino y la región R1 que los inducidos por la proteína Prn1. Sin embargo, en los experimentos de protección con las proteínas individuales Prn1, Prn2 o PRH, ninguna generó un efecto protector a la dosis de 1 µg/ratón. Probablemente, la combinación de PTg con las moléculas Prn2 y PRH2-1 a dosis en el entorno de 0,2 µg/ratón pudiera estimular una respuesta inmune protectora efectiva, debido a la potenciación de la respuesta inmune asociada a menores dosis. En la línea de ratón OF-1, las dos preparaciones vacunales indujeron Ac de las clases IgM e IgA y de las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, las cuales reconocieron los antígenos PTg, FHA y Prn2. Ambas preparaciones vacunales indujeron títulos similares de anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2a contra PTg, FHA y Prn2.

La relación entre los títulos de IgG1 e IgG2a fue, de igual forma, similar y en la vecindad del valor uno, lo que sugiere que en los animales inmunizados las preparaciones estimularon un patrón de respuesta inmune mixto Th1/Th2. Las concentraciones de las citosinas IFN-γ, IL-4 e IL-5, secretadas por los esplenocitos de los ratones inmunizados con las preparaciones PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1,

resultaron similares entre ambos grupos. De igual forma, la relación de las concentraciones de IFN- γ /IL-4 fue similar y en conformidad con lo encontrado para la relación de los títulos IgG1/IgG2a.

En el presente trabajo las preparaciones vacunales, PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1, se evaluaron con el adyuvante hidróxido de aluminio. El uso de este adyuvante para la evaluación de las diferentes combinaciones antigénicas aquí estudiadas se basó en estudios precedentes. Con anterioridad se demostró que esta sal de alúmina, induce títulos de anticuerpos anti-PT, anti-FHA y anti-Prn superiores en comparación con el fosfato de aluminio (Denoel y cols., 2002). El hidróxido de aluminio estimula a través de la inducción de la prostaglandina E2 y la IL-1 β , la diferenciación de células Th2 y Th17 (Kool y cols., 2012). Es oportuno mencionar que la molécula PTg activa en las células dendríticas la secreción de IL-12, IL-1 β e IL-23, lo que estimula la polarización de la respuesta mediada por células T cooperadoras hacia un patrón Th1/Th17 (Nasso y cols., 2009). En este sentido el uso conjunto de la molécula PTg y el adyuvante hidróxido de aluminio se complementan para inducir efectores que favorecen la respuesta inmune contra *B. pertussis*. Por otro lado, la molécula PTg como adyuvante, en ausencia del hidróxido de aluminio, no estimula eficientemente la inducción de anticuerpos contra los antígenos FHA y Prn (Agnolon y cols., 2015).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, están en conformidad con estudios que demostraron que PTg induce la secreción simultánea de IFN- γ e IL-5 (Hofstetter y cols., 2002) y la generación de IgG1 e IgG2a específicos, contra los antígenos coadministrados (Ryan y cols., 1998). En ratones, la producción de la subclase de inmunoglobulina IgG2a es regulada positivamente por células T (Th1) productoras de IFN γ (Snapper y Paul, 1987; Finkelman y cols., 1988). Como fue mencionado antes, la molécula PTg conserva las propiedades adyuvantes de la proteína nativa PT, al contrario del toxoide PT_Q (Roberts y cols., 1995; Ryan y cols., 1998). El toxoide PTg activa las células presentadoras de antígenos y en ellas estimula la producción de IFN- γ , IL-1 β , IL-12, IL-6 e IL-23 entre otras citocinas, lo que permite la diferenciación de linfocitos T CD4+ en Th1, Th2 o Th17 (Ausiello y cols., 2002; Nasso y cols., 2009).

En contraste con los resultados alcanzados en el presente trabajo, ratones inmunizados con la vacuna acelular INFANRIX (PT_Q/FHA/Prn1) activaron un patrón de subclases con el predominio de IgG1 y asociado a la producción de concentraciones estadísticamente no significativas de IFN γ (Ross y cols., 2013). Aunque en el presente trabajo no se incluyeron controles con vacunas comerciales con la combinación PT_Q/FHA/Prn1, otros estudios confirman lo encontrado por Ross y cols, respecto a que las vacunas acelulares (químicamente inactivadas) inducen niveles elevados de la subclase IgG1 en

comparación con IgG2a, lo que sugiere un patrón de respuesta inmune desplazado hacia Th2. En ratones inmunizados con vacunas comerciales, tanto por la ruta subcutánea como la intraperitoneal se indujeron respuestas de Ac con una relación de títulos IgG1/IgG2a entre cuatro y ocho contra el antígeno PT (Garlapati y cols., 2011) y superior a cincuenta contra el antígeno FHA (Feunou y cols., 2014). En otro estudio, al inmunizar los ratones por la ruta intraperitoneal con la vacuna Tdap, (Boostrix), la cual posee cantidades reducidas en los componentes de tétanos, difteria y pertussis respecto a INFARIX, la relación de títulos de IgG1/IgG2a fue superior a cuatro para los tres componentes PT_O, FHA y Prn1 (Gaillard y cols., 2014).

Las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 indujeron un patrón de inmunoglobulinas diverso en clases y subclases. En este sentido, la inducción de una respuesta de Ac inductora de todas las subclases de IgG se observó en ratones inmunizados con preparaciones celulares pero no con la vacuna acelular INFANRIX (PT_O/FHA/Prn1) (Raeven y cols., 2015). La inducción de un patrón diverso en los tipos de inmunoglobulinas puede ser importante en la inmunidad contra *B. pertussis*. La respuesta de anticuerpos IgG2a e IgG2b generada contra bacterias Gram negativas auxilia a los macrófagos y neutrófilos en sus funciones fagocíticas (Michaelson y cols., 2004). Por otro lado, la subclase IgG1 desempeña una función importante en la neutralización de PT. Se conoce que la molécula PTg, soluble y en ausencia de adyuvante, es un pobre inductor de IgG2a y un excelente generador de Ac de tipo IgG1 (Gracia y cols., 2011). Además, la subclase IgG1 se transfiere más eficientemente a través de la placenta de la madre al gestante que las otras subclases (Paoletti y cols., 2000).

En cultivos *in vitro* que simulan condiciones iónicas similares a las existentes en el tracto respiratorio, se comprobó que una proporción significativa de PT está asociada a la bacteria (Thalen y cols., 2006a). *In vivo*, durante el proceso de infección, los antígenos Prn y FHA se exponen en la superficie celular de *B. pertussis* mientras que parte de las moléculas de PT son secretadas (Mattoo y Cherry, 2005). Estas observaciones permiten afirmar que una respuesta de Ac diversa en las subclases de IgG pudiera accionar en dos líneas complementarias. Por un lado, neutralizar la toxina secretada por medio de anticuerpos IgG1 y por otro, reconocer las células de *B. pertussis* por medio de IgG2a e IgG2b específicas contra FHA, Prn y PT y promover la destrucción intracelular del patógeno en los macrófagos y neutrófilos (Geurtsen y cols., 2014).

En ratones y humanos, las subclases de anticuerpos IgG presentan afinidades y selectividades diferentes por los receptores Fc presentes en las células del sistema inmunológico (Bruhns, 2012). En ratones, los

anticuerpos IgG2a unen con alta afinidad el receptor FcγRI, presente únicamente en células dendríticas derivadas de monocitos, las cuales participan en la presentación de antígenos en respuesta a las señales de peligro provenientes de los componentes de bacterias Gram negativas (Cheong y cols., 2010). De igual forma, los anticuerpos IgG2a e IgG2b unen con alta afinidad el receptor FcγRIV presente exclusivamente en macrófagos y neutrófilos. Por otra parte, tanto los subtipos IgG1, IgG2a como IgG2b unen con baja afinidad el receptor FcγRIII, el cual está presente, además de las células ya mencionadas, en las células NK, basófilos, mastocitos y eosinófilos. Por tanto, la inducción de una respuesta de Ac conformada por diferentes clases y subclases redundaría en la activación de múltiples células efectoras contra un patógeno como *B. pertussis* que también despliega múltiples estrategias de evasión inmune.

La preparación PTg/FHA/PRH2-1 generó concentraciones de IL-17, secretadas por los esplenocitos de los ratones inmunizados, superiores respecto al control negativo. Estudios en ratones inmunizados con la vacuna INFANRIX y posteriormente retados con *B. pertussis* sugieren que la protección contra *B. pertussis* es dependiente de IL-17 y no de IL-4 (Ross y cols., 2013). De conformidad con este estudio, otro anterior sugirió que la fuente de IL-17, tanto en ratones infectados como inmunizados con vacunas celulares o acelulares proviene de células Th17 (esplenocitos) (Banus y cols., 2008). Aunque esta respuesta no se caracterizó en el presente estudio, los resultados obtenidos no excluyen la posibilidad que las concentraciones de IL-17 detectadas, en los sobrenadantes de los esplenocitos estimulados, provengan, en parte, de células Th17.

La citocina IL-17 interviene en el reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de infección. La neutralización de esta molécula por la administración de un AcM anti-IL-17 reduce significativamente la expresión de la quimiocina KC y bloquea la afluencia de los neutrófilos al área de enfrentamiento inmune (Andreasen y cols., 2009).

Si bien la inmunidad celular específica inductora de IL-17 contribuye a la protección contra *B. pertussis*, es importante que la misma se complemente con la inducción de Ac específicos contra los principales factores de virulencia expresados por la bacteria. La neutralización de los mismos es crucial porque estos también intervienen en la desregulación de las funciones celulares del sistema inmunológico orquestadas por la citocina IL-17. A partir de estudios *in vitro* e *in vivo* se conoce que la enzima PT ribosila las proteínas heterotriméricas Gi de los neutrófilos, bloquea los eventos de señalización intracelular e inhibe la migración de estas células innatas (Moss y cols., 1983; Spangrude y cols., 1985; Scott y cols., 1988; Andreasen y Carbonetti, 2008; 2009). La bacteria se une a los neutrófilos que logran

acceder a la región infectada a través de las adhesinas FHA y Prn. La interacción de FHA con los neutrófilos induce la expresión de CR3 en su superficie. Este evento beneficia a la bacteria, ya que CR3 es el receptor de la enzima ACT, responsable primario de la inhibición de las funciones fagocíticas (Mobberley-Schuman y Weiss, 2005). La acción de Prn de *B. pertussis* sobre las funciones de los macrófagos y neutrófilos no se conoce, sin embargo, en *B. bronchiseptica* la pertactina es citotóxica e interviene en la resistencia a la actividad fagocítica (Forde y cols., 1999; Inatsuka y cols., 2010).

La respuesta celular inductora de IL-17 en primates convalecientes o inmunizados con una vacuna celular y posteriormente retados, se caracteriza por concentraciones de IL-17 mayores respecto a los animales retados e inmunizados con una vacuna acelular (Daptacel) (Warfel y cols., 2015). En concordancia, niños vacunados con la vacuna acelular INFANRIX tampoco incrementaron las concentraciones de IL-17 (Schure y cols., 2012; 2013). Estos estudios advierten que la inmunidad generada por las vacunas acelulares debiera inducir un patrón más afín al inducido por la infección natural, con el objetivo de que la inmunidad sea restimulada por la infección con cepas en circulación y de esta forma reactivar más eficientemente la inmunidad de rebaño.

En ratones, la inmunización con las proteínas FHA y Prn1, de forma soluble o adyuvadas con hidróxido de aluminio, tiene la pontencialidad de estimular la diferenciación de células T reguladoras productoras de IL-10, las cuales suprimen la actividad Th1 auxiliadora de clones específicos involucrados en la respuesta protectora (McGuirk y cols., 2002). Sin embargo, en el modelo de reto intranasal, la administración de la combinación PT_Q/FHA/Prn1 induce una respuesta de Ac de carácter protector superior a la conferida por la combinación PT_Q/FHA (Guiso y cols., 1999). Otros estudios demuestran que los Ac inducidos por preparaciones compuestas por PT_Q/FHA o PT_Q/FHA/Prn1 protegen pasivamente contra la infección intracerebral y respiratoria (Munoz y cols., 1981; Sato y Sato, 1984; Mills y cols., 1998). Estos resultados sugieren, que los efectos supresores de FHA/Prn1 son contrarrestados por la respuesta inducida por inmunógenos que incluyen el toxoide PT_Q. La molécula PTg ha resultado ventajosa por sus propiedades antigénicas y adyuvantes, las cuales no están presentes en la molécula PT_Q (Seubert y cols., 2014). En este sentido, un objetivo del presente estudio fue evaluar si el efecto protector inducido por una preparación vacunal que incluye la variación de tipo dos puede igualar el inducido por una preparación PTg/FHA/Prn1 frente a una cepa homóloga.

Las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1, se ensayaron en el modelo MICA ante la cepa letal *B. pertussis* BP18323 productora de Prn6. Las diferentes preparaciones PTg/FHA/Prn2,

PTg/FHA/PRH2-1, PTg/FHA/Prn1, PTg/FHA/PRH1-CL-2 y PTg/FHA, se evaluaron con el propósito de conocer cuáles eran capaces de inducir una protección similar a una dosis protectora de una preparación celular de referencia nacional, la cual incluye células inactivadas de las cepas *B. pertussis* BP165 y BP509 productoras de Prn1 y Prn7, respectivamente (Bottero y cols., 2007; Proenza-Alfonzo y cols., 2013). La variante de pertactina Prn7 tiene una región variable R1 100 % idéntica a Prn1 y difieren sólo en la posición 498 próxima al extremo carboxilo terminal [Leu (Prn1), Arg (Prn7)]. Los diferentes grupos de ratones OF-1 se inmunizaron una vez con diferentes dosis de las preparaciones vacunales acelulares PTg/FHA/Prn: Dosis Mayor (5/2,5/2,5 µg /ratón), Dosis Intermedia, (1/0,5/0,5 µg /ratón) y Dosis Menor (0,2/0,1/0,1 µg /ratón). La dosis utilizada en el control celular fue de 0,5 Unidades Internacionales (UI) la cual induce una protección del 92 % ± 5 %. El control negativo recibió alúmina en PBS.

Para todas las preparaciones ensayadas, para la Dosis Mayor, se observó un efecto protector, similar al conferido por el control positivo de naturaleza celular y diferente al control negativo. Sin embargo, al analizar la Dosis Intermedia, sólo se observó este efecto para las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1, a diferencia de las preparaciones PTg/FHA/Prn1, PTg/FHA/PRH1-CL-2 y PTg/FHA que no igualaron el efecto protector generado por el control positivo, pero que sí difirieron del control negativo. Los resultados sugieren que la adición de Prn2 a una preparación que contiene PTg/FHA incrementa su valor protector. La Dosis Intermedia usada en las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1, en relación a pertactina (0,5 µg /ratón), es cercana a la utilizada en la evaluación individual de Prn2 y PRH2-1 (0,2 µg /ratón), lo que sugiere que a esta dosis pudieron producirse Ac contra los epitopos protectores del extremo amino y la R1. En este sentido, las preparaciones PTg/FHA/Prn1 y PTg/FHA/PRH1-CL-2 pudieron estar menos favorecidas a partir de conocer que la R1 de Prn1 resultó menos inmunogénica que la de Prn2 y que la R1 de Prn2 en el contexto de la proteína PRH1-CL-2 puede estar interferida, estéricamente, por el efecto enmascarador del extremo carboxilo.

Probablemente, este efecto estérico pudo ocurrir también en el caso de la proteína Prn2 respecto a la proteína PRH2-1. En concordancia con esta afirmación está la tendencia, en términos de significación estadística, de que la protección conferida por la preparación que incluye la proteína PRH2-1 ($p=0,15$) fue más similar al control positivo que la que preparación con la proteína Prn2 ($p=0,08$).

Por otro lado, los resultados sugieren que en presencia de la molécula adyuvante PTg, la adición de Prn1 a una preparación PTg/FHA, no incrementa el efecto protector. En esta dirección, la evaluación de la

respuesta inmune inducida en los animales sanos y agónicos posterior al reto, pudiera permitir un acercamiento más directo a las variables inmunológicas asociadas a la inmunidad inducida por las preparaciones PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1, que la diferencia de las otras preparaciones vacunales. El modelo MICA, según un estudio comparativo internacional, es apropiado para la evaluación de futuras vacunas que incorporen el toxoide PTg genéticamente inactivado (Xing y cols., 2014a). En dicho estudio, se demostró una precisión similar entre el modelo MICA, el ensayo tradicional intracerebral (*Kendrick test*) y el de reto respiratorio por aerosoles. Sin embargo, una limitación de los tres modelos antes mencionados es su sensibilidad, la cual se restringe a distinguir entre los ratones inmunizados y los controles negativos (Xing y cols., 2014a). Es por ello que en el presente trabajo las diferentes preparaciones vacunales acelulares se compararon en cuanto a la posibilidad de igualar el valor protector de una preparación celular de referencia y además, diferenciarse del control negativo. Otra limitación del modelo MICA es que está validado exclusivamente para la cepa de *B. pertussis* BP18323 (Prn7) y por tanto, la función protectora de las preparaciones, PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1, respecto a cepas de *B. pertussis* productoras de Prn2 no pueden evaluarse con la precisión requerida. El presente estudio demostró que la variación de tipo dos presente en la proteína Prn2 o la pertactina híbrida PRH2-1, lejos de afectar la capacidad protectora de preparaciones acelulares que incluyen el componente PTg, la incrementan respecto a la variación de tipo uno. No obstante, subsiste la interrogante de si la proteína PRH2-1 es igualmente efectiva que Prn2 ante aislados productores de Prn2. A favor de que la variación de tipo dos, en el contexto de una proteína PRH, puede ser igual o más efectiva que en una proteína natural Prn2, está el hecho de que es una región inmunogénica alejada del efecto estérico del extremo carboxilo. La inmunización de ratones con la variante Prn2 induce AcM protectores (Pem29) que reconocen epitopos discontinuos cuyos motivos de unión no involucran la región del extremo carboxilo, a diferencia de lo que sucede con los AcM (Pem1) generados por la inmunización con la proteína Prn1 (Hijnen y cols., 2004; Hijnen y cols., 2007b). En la molécula PRH2-1 concurren elementos que pudieran favorecer la respuesta protectora contra la cepa BP18323 y quizás contra cepas productoras de Prn2. La variación tipo dos pudiera ser mejor reconocida por el sistema inmunológico al estar más próxima al extremo amino y alejada del extremo carboxilo. Por otro lado, la variación de tipo uno al encontrarse en un contexto estructural, natural, próximo al extremo carboxilo, posibilitaría la generación de Ac con tipo especificidades anti-Prn1, las cuales involucran el extremo carboxilo (Hijnen y cols., 2004; Hijnen y cols., 2007b). En conformidad con esta afirmación, la proteína

híbrida PRH1-CL-2 resultó menos efectiva que PRH2-1 en los ensayos de protección realizados tanto con las proteínas individuales como en las preparaciones vacunales de tres componentes.

A partir de considerar que la tosferina es una enfermedad mortal, vale enfatizar, que el modelo MICA es el único que cuantifica la protección en términos de animales vivos y muertos (van der Ark y cols., 2012). Aunque el modelo utiliza una vía de infección artificial, el reto intracerebral de animales inmunizados correlaciona con la eficacia de las vacunas celulares en niños (Council, 1956), lo que sugiere que el modelo MICA pudiera predecir también la eficacia de una preparación vacunal acelular. A diferencia de los modelos que utilizan la vía natural de infección (respiratoria), el modelo MICA no se afecta por la interferencia de la microbiota residente, que obliga a emplear en el reto respiratorio cantidades excesivas de la bacteria para lograr la colonización (Weyrich y cols., 2014). Otra ventaja respecto a los ensayos que emplean la ruta intranasal, es que en el ensayo MICA se utilizan animales no consanguíneos similar a lo que ocurre en poblaciones humanas (Xing y cols., 2014a).

Por otro lado, otras evidencias resaltan la importancia de demostrar en el modelo MICA que una preparación vacunal acelular es protectora. En este modelo se evalúa de forma directa la capacidad de una preparación vacunal, administrada por la vía parenteral, de inducir una respuesta inmune capaz de proteger al cerebro de los desórdenes neurológicos causados por la infección por *B. pertussis*. En humanos, los casos fatales de infantes infectados por *B. pertussis* se asocian al desarrollo de encefalitis, entre otros riesgos severos (Winter y cols., 2015). La incidencia de encefalopatías producidas por la infección por pertussis se estima en 1 por cada 1, 200-12 000 infectados. Los casos se describen en todas las edades aunque son más frecuentes en recién nacidos e infantes (Shorvon y Berg, 2008). En ratones, la infección respiratoria por *B. pertussis* activa en el cerebro la síntesis de transcritos de ARN mensajero de las citocinas inflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6. Probablemente, los factores de virulencia se transporten por la sangre al cerebro y promuevan los desórdenes neurológicos descritos (Loscher y cols., 2000).

La administración intracerebral de *B. pertussis* produce hinchazón en el cerebro de los ratones no inmunes. El efecto no se observa después de calentar la muestra a 80 °C pero se recupera al añadir PT activa a la muestra inactivada. Es válido destacar, que en este efecto contribuyen además de PT otros factores de la bacteria, ya que la inoculación intracerebral de PT por separado no induce hinchazón (Iwasa y cols., 1985). Otro estudio demostró que la administración parenteral de PT genera entre otros efectos, convulsiones, en los ratones tratados (Donnelly y cols., 2001). *In vitro*, PT destruye la

organización celular de células endoteliales humanas implicadas en la formación de la barrera hematoencefálica y promueve, a través de esta, la diapédesis de los macrófagos (Kugler y cols., 2007). En humanos, un estudio demostró altos títulos de Ac anti-PT y anti-FHA en el fluido cerebroespinal de una paciente de 7 años con encefalopatía por *B. pertussis* (Grant y cols., 1998).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sustentan la realización futura de ensayos comparativos entre las preparaciones vacunales aquí evaluadas y vacunas comerciales. De especial interés constituye la evaluación de la respuesta inmune inducida por las preparaciones PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 en las vías respiratorias. La evaluación en este compartimento de las citocinas IFN γ , IL-17 e IL-5 producidas por células T CD4+ efectoras y de memoria, la producción de IgA entre otros efectores, permitirían conocer la potencialidad de estas preparaciones en evitar la colonización y la transmisión de la bacteria. En este sentido se considera importante realizar ensayos de protección en el modelo de reto intranasal frente a cepas isogénicas de *B. pertussis* que produzcan Prn1, Prn2 o cepas negativas a pertactina.

La molécula PRH2-1 presenta ventajas respecto a las moléculas Prn1 o Prn2. Al contener dos regiones variables de pertactinas diferentes reduce a la mitad el número de moléculas a emplear en una preparación vacunal. Al considerar que en humanos se generan anticuerpos tipo específicos anti-Prn1 y anti-Prn2 (He y cols., 2003), es posible que la inmunización con PRH2-1 induzca una presión inmunológica más efectiva y evite la evasión de aislados productores de Prn1 o Prn2 y en consecuencia obstaculice la emergencia o predominio de uno u otro tipo de cepa. Además, a partir de considerar que PRH2-1 es más inmunogénica que Prn1 y Prn2, en cuanto a la respuesta de Ac anti-Prn1, la utilización de PRH2-1 podría tener un impacto más efectivo en aquellas regiones en las que circulan o predominan aislados productores de Prn1. En este sentido, se conoce que los ratones y humanos sin inmunidad previa o deficiente, son colonizados ventajosamente por aislados productores de Prn1, en comparación con las cepas productoras de Prn2 (van Gent y cols., 2011). La pertactina híbrida aquí desarrollada y los resultados alcanzados sugieren que el diseño puede utilizarse además con otras variantes de pertactina que podrían emerger en el futuro. Probablemente, el diseño podría ser de mayor utilidad con variantes de Prn con una reactividad cruzada menor a la que se observa para las variantes Prn1 y Prn2. Finalmente, sería útil evaluar la influencia del hospedero sobre las propiedades inmunoprotectoras de PRH2-1, en este sentido se podría estudiar la obtención de PRH2-1 en la membrana externa de *B. pertussis*, su posterior purificación, caracterización fisicoquímica y evaluación inmunológica.

Los resultados obtenidos demostraron que las proteínas Prn2 o PRH2-1, en combinación con PTg y FHA, al reducir la dosis cinco veces, indujeron un efecto protector similar a una dosis protectora de la preparación celular de referencia. Sin embargo, aunque no estadísticamente significativo, el porcentaje de supervivencia disminuyó al reducir la dosis de inmunógeno. Se conoce que la cantidad de antígeno y de moléculas agonistas de los receptores semejantes a Toll (TLR), influencia la inducción de la diferenciación de las células T cooperadora y de memoria (Brummelman y cols., 2015). La molécula PTg puede activar *in vitro* las células presentadoras de Ag, a través de TLR4 y TLR2, a concentraciones de 5 µg/mL; sin embargo, a concentraciones cinco veces inferiores, la activación es mediada sólo por TLR4 y se inducen mayores cantidades de IL-1β, IL-12, IL-6, IL-10 e IL-23 (Nasso y cols., 2009). Probablemente, las preparaciones vacunales, PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1, puedan aumentar su efectividad si se reducen las cantidades de antígenos a la vez que se incorporan agonistas de TLR, para disminuir la producción de IL-10 y potenciar la respuesta efectora y de memoria asociada a un patrón Th1.

En el presente estudio, los antígenos PTg, FHA, Prn2 y PRH2-1 se produjeron, purificaron y caracterizaron con las características adecuadas para su evaluación inmunológica. Se demostró que las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 o PTg/FHA/PRH2-1 adyuvadas en hidróxido de aluminio, son protectoras en el modelo MICA e inducen una respuesta de Ac de los subtipos de inmunoglobulinas IgG1, IgG2a e IgG2b, sustentada por la secreción de las citocinas IFNγ, IL-4, IL-5 e IL-17 en el caso de PTg/FHA/PRH2-1. Los resultados alcanzados y los procedimientos aquí desarrollados permiten avanzar en el diseño y desarrollo de una preparación vacunal acelular contra la tosferina que incorpore la variación de tipo dos y uno.

6 CONCLUSIONES

1. La proteína PRH2-1 obtenida en *E. coli* es reconocida por sueros humanos específicos contra *B. pertussis* y AcMs de carácter protector y su diseño comprende la secuencia completa de pertactina, las regiones variables R1 de Prn1 y Prn2 conjuntamente con el segmento de la hélice beta con contactos con el lazo R1 y la regularidad topológica de pertactina.
2. Las proteínas Prn2 y PRH2-1 estimulan en los ratones inmunizados una respuesta humoral específica contra las regiones variables R1 de Prn1 y Prn2 superior a la inducida por la proteína Prn1 y confieren supervivencia en el modelo murino de MICA, lo que sugiere que la variación de tipo dos puede considerarse dentro de las alternativas antigénicas contra *B. pertussis*.
3. Las proteínas PTg, FHA y Prn2 se obtienen por separado a partir de la cepa *B. pertussis* BPCNIC0311, con la pureza, rendimiento y las características inmunoquímicas y físicas requeridas para estudios inmunológicos en animales, lo que justifica la optimización y avance a la etapa de desarrollo del procedimiento de purificación empleado.
4. Las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 o PTg/FHA/PRH2-1 inducen en los ratones inmunizados una respuesta de anticuerpos y celular específica y en el modelo murino MICA, confieren una protección similar a una dosis protectora de una preparación celular, lo que indica que estas preparaciones pueden desarrollarse como candidatos acelulares contra la tosferina.

7 RECOMENDACIONES

- Comparar estructuralmente la proteína PRH2-1 con las pertactinas naturales Prn1 y Prn2 mediante la técnica de espectroscopía de dicroísmo circular.
- Comparar inmunológicamente a las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 con una preparación PT_Q/FHA/Prn1 o una vacuna comercial de tres componentes, respecto al tipo de respuesta T cooperadora, inducción de óxido nítrico por macrófagos, actividad opsonizante de la respuesta de Ac inducida y la respuesta de memoria B y T en la medida que se reducen las dosis.
- Evaluar las preparaciones vacunales PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRH2-1 en el modelo de reto intranasal frente a aislados clínicos que producen mayores concentraciones de PT y sintetizan las variantes Prn1, Prn2 o aislados negativos a pertactina.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. - (2006). Vaccination coverage among children entering school--United States, 2005-06 school year. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55(41): 1124-1126.
2. - Abu Raya, B., Srugo, I., Kessel, A., Peterman, M., Bader, D., Peri, R., Ashtamker, N., Gonen, R. y Bamberger, E. (2014). The induction of breast milk pertussis specific antibodies following gestational tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccination. *Vaccine* 32(43): 5632-5637.
3. - Acosta, A.M., DeBolt, C., Tasslimi, A., Lewis, M., Stewart, L.K., Misegades, L.K., Messonnier, N.E., Clark, T.A., Martin, S.W. y Patel, M. (2015). Tdap Vaccine Effectiveness in Adolescents During the 2012 Washington State Pertussis Epidemic. *Pediatrics*.
4. - Agnolon, V., Bruno, C., Leuzzi, R., Galletti, B., D'Oro, U., Pizza, M., Seubert, A., O'Hagan, D.T. y Baudner, B.C. (2015). The potential of adjuvants to improve immune responses against Tdap vaccines: A preclinical evaluation of MF59 and monophosphoryl lipid A. *Int J Pharm* 492(1-2): 169-176.
5. - Albitar-Nehme, S., Basheer, S.M., Njamkepo, E., Brisson, J.R., Guiso, N. y Caroff, M. (2013). Comparison of lipopolysaccharide structures of Bordetella pertussis clinical isolates from pre- and post-vaccine era. *Carbohydr Res* 378: 56-62.
6. - Alvarez Hayes, J., Erben, E., Lamberti, Y., Principi, G., Maschi, F., Ayala, M. y Rodriguez, M.E. (2013). Bordetella pertussis iron regulated proteins as potential vaccine components. *Vaccine* 31(35): 3543-3548.
7. - Aminian, M., Sivam, S., Lee, C.W., Halperin, S.A. y Lee, S.F. (2007). Expression and purification of a trivalent pertussis toxin-diphtheria toxin-tetanus toxin fusion protein in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 51(2): 170-178.
8. - Andrade, B.G., Marin, M.F., Cambuy, D.D., Fonseca, E.L., Souza, N.F. y Vicente, A.C. (2014). Complete genome sequence of a clinical Bordetella pertussis isolate from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(7): 972-974.
9. - Andreasen, C. y Carbonetti, N.H. (2008). Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to Bordetella pertussis respiratory tract infection in mice. *Infect Immun* 76(11): 5139-5148.
10. - Andreasen, C., Powell, D.A. y Carbonetti, N.H. (2009). Pertussis toxin stimulates IL-17 production in response to Bordetella pertussis infection in mice. *PLoS One* 4(9): e7079.
11. - Andreasen, C. y Carbonetti, N.H. (2009). Role of neutrophils in response to Bordetella pertussis infection in mice. *Infect Immun* 77(3): 1182-1188.
12. - Ashworth, L.A., Robinson, A., Funnell, S., Gorringe, A.R., Irons, L.I. y Seabrook, R.N. (1988). Agglutinogens and fimbriae of Bordetella pertussis. *Tokai J Exp Clin Med* 13 Suppl: 203-210.
13. - Ausiello, C.M., Fedele, G., Urbani, F., Lande, R., Di Carlo, B. y Cassone, A. (2002). Native and genetically inactivated pertussis toxins induce human dendritic cell maturation and synergize with lipopolysaccharide in promoting T helper type 1 responses. *J Infect Dis* 186(3): 351-360.
14. - Bamberger, E., Abu Raya, B., Cohen, L., Golan-Shany, O., Davidson, S., Geffen, Y. y Srugo, I. (2015). Pertussis Resurgence Associated with Pertactin-Deficient and Genetically Divergent Bordetella Pertussis Isolates in Israel. *Pediatr Infect Dis J* 34(8): 898-900.
15. - Banus, S., Bottema, R.W., Siezen, C.L., Vandebriel, R.J., Reimerink, J., Mommers, M., Koppelman, G.H., Hoebee, B., Thijs, C., Postma, D.S., Kimman, T.G. y Stelma, F.F. (2007). Toll-like receptor 4 polymorphism associated with the

- response to whole-cell pertussis vaccination in children from the KOALA study. *Clin Vaccine Immunol* 14(10): 1377-1380.
16. - Banus, S., Stenger, R.M., Gremmer, E.R., Dormans, J.A., Mooi, F.R., Kimman, T.G. y Vandebriel, R.J. **(2008)**. The role of Toll-like receptor-4 in pertussis vaccine-induced immunity. *BMC Immunol* 9: 21.
17. - Barnes, M.G. y Weiss, A.A. **(2001)**. BrkA protein of Bordetella pertussis inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect Immun* 69(5): 3067-3072.
18. - Bart, M.J., Harris, S.R., Advani, A., Arakawa, Y., Bottero, D., Bouchez, V., Cassidy, P.K., Chiang, C.S., Dalby, T., Fry, N.K., Gaillard, M.E., van Gent, M., Guiso, N., Hallander, H.O., Harvill, E.T., He, Q., van der Heide, H.G., Heuvelman, K., Hozbor, D.F., Kamachi, K., Karataev, G.I., Lan, R., Lutynska, A., Maharjan, R.P., Mertsola, J., Miyamura, T., Octavia, S., Preston, A., Quail, M.A., Sintchenko, V., Stefanelli, P., Tondella, M.L., Tsang, R.S., Xu, Y., Yao, S.M., Zhang, S., Parkhill, J. y Mooi, F.R. **(2014)**. Global population structure and evolution of Bordetella pertussis and their relationship with vaccination. *MBio* 5(2): e01074.
19. - Bartoloni, A., Pizza, M., Gross, R., Perugini, M., Arico, B., Domenighini, M. y Rappuoli, R. **(1988)**. Engineering bacterial toxin for the development of new vaccine against pertussis. *Tokai J Exp Clin Med* 13 Suppl: 217-222.
20. - Bass, J.W., Klenk, E.L., Kotheimer, J.B., Linnemann, C.C. y Smith, M.H. **(1969)**. Antimicrobial treatment of pertussis. *J Pediatr* 75(5): 768-781.
21. - Bergquist, S.O., Bernander, S., Dahnsjo, H. y Sundelof, B. **(1987)**. Erythromycin in the treatment of pertussis: a study of bacteriologic and clinical effects. *Pediatr Infect Dis J* 6(5): 458-461.
22. - Bertani, G. **(2004)**. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* 186(3): 595-600.
23. - Blom, J., Hansen, G.A. y Poulsen, F.M. **(1983)**. Morphology of cells and hemagglutinogens of Bordetella species: resolution of substructural units in fimbriae of Bordetella pertussis. *Infect Immun* 42(1): 308-317.
24. - Bodilis, H. y Guiso, N. **(2013)**. Virulence of pertactin-negative Bordetella pertussis isolates from infants, France. *Emerg Infect Dis* 19(3): 471-474.
25. - Bordet, J. y Gengou, O. **(1906)**. Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 20: 731-741.
26. - Boschwitz, J.S., Batanghari, J.W., Kedem, H. y Relman, D.A. **(1997)**. Bordetella pertussis infection of human monocytes inhibits antigen-dependent CD4 T cell proliferation. *J Infect Dis* 176(3): 678-686.
27. - Bottero, D., Gaillard, M.E., Fingerhann, M., Weltman, G., Fernandez, J., Sisti, F., Graieb, A., Roberts, R., Rico, O., Rios, G., Regueira, M., Binsztein, N. y Hozbor, D. **(2007)**. Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical Bordetella pertussis strains. *Clin Vaccine Immunol* 14(11): 1490-1498.
28. - Boucher, P., Sato, H., Sato, Y. y Locht, C. **(1994)**. Neutralizing antibodies and immunoprotection against pertussis and tetanus obtained by use of a recombinant pertussis toxin-tetanus toxin fusion protein. *Infect Immun* 62(2): 449-456.
29. - Bouchez, V., Caro, V., Levillain, E., Guigon, G. y Guiso, N. **(2008)**. Genomic content of Bordetella pertussis clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. *PLoS One* 3(6): e2437.

30. - Bowden, K.E., Williams, M.M., Cassiday, P.K., Milton, A., Pawloski, L., Harrison, M., Martin, S.W., Meyer, S., Qin, X., DeBolt, C., Tasslimi, A., Syed, N., Sorrell, R., Tran, M., Hiatt, B. y Tondella, M.L. **(2014)**. Molecular epidemiology of the pertussis epidemic in Washington State in 2012. *J Clin Microbiol* 52(10): 3549-3557.
31. - Brennan, M.J., Li, Z.M., Cowell, J.L., Bisher, M.E., Steven, A.C., Novotny, P. y Manclark, C.R. **(1988)**. Identification of a 69-kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 56(12): 3189-3195.
32. - Brenner, D.J., Krieg, N.R. y Staley, J.T. **(2005)**. Family III. Alcaligenaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Part C Springer*.: 647-671.
33. - Brito, L.A. y Singh, M. **(2011)**. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. *J Pharm Sci* 100(1): 34-37.
34. - Broome, C.V. y Fraser, D.W. **(1981)**. Pertussis in the United States, 1979: a look at vaccine efficacy. *J Infect Dis* 144(2): 187-190.
35. - Brown, R., Jarvis, K. y Hyland, K. **(1989)**. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* 180: 136-139.
36. - Bruhns, P. **(2012)**. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 119(24): 5640-5649.
37. - Brummelman, J., Wilk, M.M., Han, W.G., van Els, C.A. y Mills, K.H. **(2015)**. Roads to the development of improved pertussis vaccines paved by immunology. *Pathog Dis* 73(8): ftv067.
38. - Burns, D.L., Meade, B.D. y Messonnier, N.E. **(2014)**. Pertussis resurgence: perspectives from the Working Group Meeting on pertussis on the causes, possible paths forward, and gaps in our knowledge. *J Infect Dis* 209 Suppl 1: S32-35.
39. - Burns, V.C., Pishko, E.J., Preston, A., Maskell, D.J. y Harvill, E.T. **(2003)**. Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun* 71(1): 86-94.
40. - Buus, S., Sette, A., Colon, S.M., Miles, C. y Grey, H.M. **(1987)**. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science* 235(4794): 1353-1358.
41. - Byrne, P., McGuirk, P., Todryk, S. y Mills, K.H. **(2004)**. Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with *Bordetella pertussis* associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *Eur J Immunol* 34(9): 2579-2588.
42. - Carbonetti, N.H., Artamonova, G.V., Mays, R.M. y Worthington, Z.E. **(2003)**. Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 71(11): 6358-6366.
43. - Carbonetti, N.H., Artamonova, G.V., Andreasen, C., Dudley, E., Mays, R.M. y Worthington, Z.E. **(2004)**. Suppression of serum antibody responses by pertussis toxin after respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis* and identification of an immunodominant lipoprotein. *Infect Immun* 72(6): 3350-3358.
44. - Carbonetti, N.H., Artamonova, G.V., Andreasen, C. y Bushar, N. **(2005)**. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin provide a one-two punch for establishment of *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect Immun* 73(5): 2698-2703.
45. - Carbonetti, N.H., Artamonova, G.V., Van Rooijen, N. y Ayala, V.I. **(2007)**. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect Immun* 75(4): 1713-1720.

46. - Carbonetti, N.H. **(2015)**. Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathog Dis* 73(8): ftv073.
47. - Casadaban, M.J. y Cohen, S.N. **(1980)**. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 138(2): 179-207.
48. - CDC **(1992a)**. Pertussis vaccination: acellular pertussis vaccine for reinforcing and booster use--supplementary ACIP statement. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 41(Rr-1): 1-10.
49. - CDC **(1992b)**. Pertussis vaccination: acellular pertussis vaccine for the fourth and fifth doses of the DTP series update to supplementary ACIP statement. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 41(Rr-15): 1-5.
50. - CDC **(1997)**. Pertussis vaccination: use of acellular pertussis vaccines among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 46(Rr-7): 1-25.
51. - CDC **(2000)**. Use of diphtheria toxoid-tetanus toxoid-acellular pertussis vaccine as a five-dose series. Supplemental recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 49(Rr-13): 1-8.
52. - CDC **(2008)**. Prevention of Pertussis, Tetanus, and Diphtheria Among Pregnant and Postpartum Women and Their Infants. . *Morbidity and Mortality Weekly Report* 57(No. RR-4).
53. - Charles, I., Fairweather, N., Pickard, D., Beesley, J., Anderson, R., Dougan, G. y Roberts, M. **(1994)**. Expression of the *Bordetella pertussis* P.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. *Microbiology* 140 (Pt 12): 3301-3308.
54. - Charles, I.G., Li, J.L., Roberts, M., Beesley, K., Romanos, M., Pickard, D.J., Francis, M., Campbell, D., Dougan, G., Brennan, M.J. y et al. **(1991)**. Identification and characterization of a protective immunodominant B cell epitope of pertactin (P.69) from *Bordetella pertussis*. *Eur J Immunol* 21(5): 1147-1153.
55. - Chenal-Francisque, V., Caro, V., Boursaux-Eude, C. y Guiso, N. **(2009)**. Genomic analysis of the adenylate cyclase-hemolysin C-terminal region of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Res Microbiol* 160(5): 330-336.
56. - Cheong, C., Matos, I., Choi, J.H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., Koh, H., Rodriguez, A., Idoyaga, J., Pack, M., Velinzon, K., Park, C.G. y Steinman, R.M. **(2010)**. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143(3): 416-429.
57. - Cherry, J.D., Gornbein, J., Heininger, U. y Stehr, K. **(1998)**. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 16(20): 1901-1906.
58. - Cherry, J.D. y Heininger, U. **(2004)**. Pertussis and other *Bordetella* infections. In R. D. Feigin, J. D. Cherry, G. J. Demmler, and S.Kaplan (ed.), *Textbook of pediatric infectious diseases*, 5th ed. The W. B.Saunders Co, Philadelphia, Pa.: 1588-1608.
59. - Cherry, J.D. y Heininger, U. **(2009)**. Pertussis and other *Bordetella* infections. *Cherry's textbook of pediatric infectious diseases*. (6th edition. Philadelphia, PA: WB Saunders Co.): 1683-1706.

60. - Cherry, J.D. y Paddock, C.D. **(2014)**. Pathogenesis and histopathology of pertussis: implications for immunization. *Expert Rev Vaccines* 13(9): 1115-1123.
61. - Clarke, M., McIntyre, P.B., Blyth, C.C., Wood, N., Octavia, S., Sintchenko, V., Giles, L., Quinn, H., Hill, V., Hanly, G., Lan, R. y Marshall, H.S. **(2015)**. The relationship between Bordetella pertussis genotype and clinical severity in Australian children with pertussis. *J Infect*.
62. - Cohen, S., Black, A., Ross, A. y Mandel, E.D. **(2014)**. Updated treatment and prevention guidelines for pertussis. *Jaapa* 27(1): 19-25, quiz 26.
63. - Collier, A.M., Peterson, L.P. y Baseman, J.B. **(1977)**. Pathogenesis of infection with Bordetella pertussis in hamster tracheal organ culture. *J Infect Dis* 136 Suppl: S196-203.
64. - Cone, T.C., Jr. **(1970)**. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. *Pediatrics* 46(4): 522.
65. - Connelly, C.E., Sun, Y. y Carbonetti, N.H. **(2012)**. Pertussis toxin exacerbates and prolongs airway inflammatory responses during Bordetella pertussis infection. *Infect Immun* 80(12): 4317-4332.
66. - Corbel, M.J., Kreeftenberg, J.G. y Knezevic, I. **(2004)**. WHO Working Group on the standardisation and control of pertussis vaccines-report of a meeting held on 6-7 May 2003, Ferney Voltaire, France. *Vaccine* 22(3-4): 293-300.
67. - Cotter, P.A. y Miller, J.F. **(2001)**. Bordetella *Principles of bacterial pathogenesis*. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.: 619-674.
68. - Council, M.R. **(1956)**. VACCINATION against whooping-cough; relation between protection in children and results of laboratory tests; a report to the Whooping-cough Immunization Committee of the Medical Research Council and to the medical officers of health for Cardiff, Leeds, Leyton, Manchester, Middlesex, Oxford, Poole, Tottenham, Walthamstow, and Wembley. *Br Med J* 2(4990): 454-462.
69. - Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C. y Jacob-Dubuisson, F. **(2001)**. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *Embo j* 20(18): 5040-5048.
70. - Coutte, L. y Locht, C. **(2015)**. Investigating pertussis toxin and its impact on vaccination. *Future Microbiol* 10(2): 241-254.
71. - Cullinane, L.C., Alley, M.R., Marshall, R.B. y Manktelow, B.W. **(1987)**. Bordetella parapertussis from lambs. *N Z Vet J* 35(10): 175.
72. - de Gouw, D., de Jonge, M.I., Hermans, P.W., Wessels, H.J., Zomer, A., Berends, A., Pratt, C., Berbers, G.A., Mooi, F.R. y Diavatopoulos, D.A. **(2014a)**. Proteomics-identified Bvg-activated autotransporters protect against bordetella pertussis in a mouse model. *PLoS One* 9(8): e105011.
73. - de Gouw, D., Serra, D.O., de Jonge, M.I., Hermans, P.W., Wessels, H.J., Zomer, A., Yantorno, O.M., Diavatopoulos, D.A. y Mooi, F.R. **(2014b)**. The vaccine potential of Bordetella pertussis biofilm-derived membrane proteins. *Emerg Microbes Infect* 3(8): e58.
74. - De Magistris, M.T., Rappuoli, R. y Tagliabue, A. **(1991)**. Human T cell immunity against Bordetella pertussis analyzed at clonal level. *Ann Ist Super Sanita* 27(1): 33-36.

75. - Decker, M.D., Edwards, K.M., Steinhoff, M.C., Rennels, M.B., Pichichero, M.E., Englund, J.A., Anderson, E.L., Deloria, M.A. y Reed, G.F. **(1995)**. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions. *Pediatrics* 96(3 Pt 2): 557-566.
76. - Delattre, A.S., Saint, N., Clantin, B., Willery, E., Lippens, G., Loch, C., Villeret, V. y Jacob-Dubuisson, F. **(2011)**. Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC. *Mol Microbiol* 81(1): 99-112.
77. - Denoel, P., Poolman, J., Carletti, G. y Veitch, K. **(2002)**. Effects of adsorption of acellular pertussis antigens onto different aluminium salts on the protective activity in an intranasal murine model of Bordetella pertussis infection. *Vaccine* 20(19-20): 2551-2555.
78. - di Tommaso, A., de Magistris, M.T., Bugnoli, M., Marsili, I., Rappuoli, R. y Abrignani, S. **(1994)**. Formaldehyde treatment of proteins can constrain presentation to T cells by limiting antigen processing. *Infect Immun* 62(5): 1830-1834.
79. - Dias, W.O., van der Ark, A.A., Sakauchi, M.A., Kubrusly, F.S., Prestes, A.F., Borges, M.M., Furuyama, N., Horton, D.S., Quintilio, W., Antoniazzi, M., Kuipers, B., van der Zeijst, B.A. y Raw, I. **(2013)**. An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum Vaccin Immunother* 9(2): 339-348.
80. - Diavatopoulos, D.A., Cummings, C.A., Schouls, L.M., Brinig, M.M., Relman, D.A. y Mooi, F.R. **(2005)**. Bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of B. bronchiseptica. *PLoS Pathog* 1(4): e45.
81. - Diavatopoulos, D.A., Hijnen, M. y Mooi, F.R. **(2006)**. Adaptive evolution of the Bordetella autotransporter pertactin. *J Evol Biol* 19(6): 1931-1938.
82. - Domenech de Celles, M., Magpantay, F.M., King, A.A. y Rohani, P. **(2016)**. The pertussis enigma: reconciling epidemiology, immunology and evolution. *Proc Biol Sci* 283(1822).
83. - Domenighini, M., Relman, D., Capiou, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V. y Rappuoli, R. **(1990)**. Genetic characterization of Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol Microbiol* 4(5): 787-800.
84. - Donnelly, S., Loscher, C.E., Lynch, M.A. y Mills, K.H. **(2001)**. Whole-cell but not acellular pertussis vaccines induce convulsive activity in mice: evidence of a role for toxin-induced interleukin-1beta in a new murine model for analysis of neuronal side effects of vaccination. *Infect Immun* 69(7): 4217-4223.
85. - Dunne, A., Ross, P.J., Pospisilova, E., Masin, J., Meaney, A., Sutton, C.E., Iwakura, Y., Tschopp, J., Sebo, P. y Mills, K.H. **(2010)**. Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against Bordetella pertussis. *J Immunol* 185(3): 1711-1719.
86. - Dupre, E., Lesne, E., Guerin, J., Lensink, M.F., Verger, A., de Ruyck, J., Brysbaert, G., Vezin, H., Loch, C., Antoine, R. y Jacob-Dubuisson, F. **(2015)**. Signal Transduction by BvgS Sensor Kinase: BINDING OF MODULATOR NICOTINATE AFFECTS THE CONFORMATION AND DYNAMICS OF THE ENTIRE PERIPLASMIC MOIETY. 290(38): 23307-23319.
87. - Eby, J.C., Gray, M.C. y Hewlett, E.L. **(2014)**. Cyclic AMP-mediated suppression of neutrophil extracellular trap formation and apoptosis by the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *Infect Immun* 82(12): 5256-5269.
88. - Edwards, K.M., Decker, M.D., Halsey, N.A., Koblin, B.A., Townsend, T., Auerbach, B. y Karzon, D.T. **(1991)**. Differences in antibody response to whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics* 88(5): 1019-1023.

89. - Edwards, K.M., Meade, B.D., Decker, M.D., Reed, G.F., Rennels, M.B., Steinhoff, M.C., Anderson, E.L., Englund, J.A., Pichichero, M.E. y Deloria, M.A. **(1995)**. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. *Pediatrics* 96(3 Pt 2): 548-557.
90. - Edwards, K.M. **(2005)**. Overview of pertussis: focus on epidemiology, sources of infection, and long term protection after infant vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 24(6 Suppl): S104-108.
91. - Emsley, P., McDermott, G., Charles, I.G., Fairweather, N.F. y Isaacs, N.W. **(1994)**. Crystallographic characterization of pertactin, a membrane-associated protein from *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol* 235(2): 772-773.
92. - Emsley, P., Charles, I.G., Fairweather, N.F. y Isaacs, N.W. **(1996)**. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* 381(6577): 90-92.
93. - Fernandez, S., Fajardo, E.M., Mandiarote, A., Ano, G., Padron, M.A., Acosta, M., Cabrera, R.A., Riveron, L.A., Alvarez, M., Blain, K., Farinas, M., Cardoso, D., Garcia, L.G., Campa, C. y Perez, J.L. **(2013)**. A proteoliposome formulation derived from *Bordetella pertussis* induces protection in two murine challenge models. *BMC Immunol* 14 Suppl 1: S8.
94. - Feunou, P.F., Kammoun, H., Debie, A.S. y Loch, C. **(2014)**. Heterologous prime-boost immunization with live attenuated *B. pertussis* BPZE1 followed by acellular pertussis vaccine in mice. *Vaccine* 32(34): 4281-4288.
95. - Finkelman, F.D., Katona, I.M., Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. **(1988)**. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol* 140(4): 1022-1027.
96. - Forde, C.B., Shi, X., Li, J. y Roberts, M. **(1999)**. *Bordetella bronchiseptica*-mediated cytotoxicity to macrophages is dependent on bvg-regulated factors, including pertactin. *Infect Immun* 67(11): 5972-5978.
97. - Forsyth, K., Plotkin, S., Tan, T. y Wirsing von Konig, C.H. **(2015)**. Strategies to Decrease Pertussis Transmission to Infants. *Pediatrics*.
98. - Gaillard, M.E., Bottero, D., Castuma, C.E., Basile, L.A. y Hozbor, D. **(2011)**. Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality. *Infect Immun* 79(9): 3677-3682.
99. - Gaillard, M.E., Bottero, D., Errea, A., Ormazabal, M., Zurita, M.E., Moreno, G., Rumbo, M., Castuma, C., Bartel, E., Flores, D., van der Ley, P., van der Ark, A. y D, F.H. **(2014)**. Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes. *Vaccine* 32(8): 931-937.
100. - Gaines-Das, R., Horiuchi, Y., Zhang, S.M., Newland, P., Kim, Y., Corbel, M. y Xing, D. **(2009)**. Modified intracerebral challenge assay for acellular pertussis vaccines: comparisons among whole cell and acellular vaccines. *Vaccine* 27(49): 6824-6832.
101. - Garlapati, S., Eng, N.F., Kiros, T.G., Kindrachuk, J., Mutwiri, G.K., Hancock, R.E., Halperin, S.A., Potter, A.A., Babiuk, L.A. y Gerdt, V. **(2011)**. Immunization with PCEP microparticles containing pertussis toxoid, CpG ODN and a synthetic innate defense regulator peptide induces protective immunity against pertussis. *Vaccine* 29(38): 6540-6548.
102. - Geuijen, C.A., Willems, R.J., Bongaerts, M., Top, J., Gielen, H. y Mooi, F.R. **(1997)**. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun* 65(10): 4222-4228.

103. - Geurtsen, J., Fae, K.C. y van den Dobbelsteen, G.P. **(2014)**. Importance of (antibody-dependent) complement-mediated serum killing in protection against *Bordetella pertussis*. *Expert Rev Vaccines* 13(10): 1229-1240.
104. - Goldman, W.E., Klapper, D.G. y Baseman, J.B. **(1982)**. Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells. *Infect Immun* 36(2): 782-794.
105. - Gonzalez, L.J., Castellanos-Serra, L., Badock, V., Diaz, M., Moro, A., Perea, S., Santos, A., Paz-Lago, D., Otto, A., Muller, E.C., Kostka, S., Wittmann-Liebold, B. y Padron, G. **(2003)**. Identification of nuclear proteins of small cell lung cancer cell line H82: An improved procedure for the analysis of silver-stained proteins. *Electrophoresis* 24(1-2): 237-252.
106. - Goodnow, R.A. **(1980)**. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev* 44(4): 722-738.
107. - Gorringe, A.R. y Vaughan, T.E. **(2014)**. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13(10): 1205-1214.
108. - Gould-Kostka, J.L., Burns, D.L., Brennan, M.J. y Manclark, C.R. **(1990)**. Purification and analysis of the antigenicity of a 69,000 Da protein from *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol Lett* 55(3): 285-289.
109. - Gracia, A., Polewicz, M., Halperin, S.A., Hancock, R.E., Potter, A.A., Babiuk, L.A. y Gerdts, V. **(2011)**. Antibody responses in adult and neonatal BALB/c mice to immunization with novel *Bordetella pertussis* vaccine formulations. *Vaccine* 29(8): 1595-1604.
110. - Grant, C.C., McKay, E.J., Simpson, A. y Buckley, D. **(1998)**. Pertussis encephalopathy with high cerebrospinal fluid antibody titers to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin. *Pediatrics* 102(4 Pt 1): 986-990.
111. - Greco, D., Salmaso, S., Mastrantonio, P., Giuliano, M., Tozzi, A.E., Anemona, A., Ciofi degli Atti, M.L., Giammanco, A., Panei, P., Blackwelder, W.C., Klein, D.L. y Wassilak, S.G. **(1996)**. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N Engl J Med* 334(6): 341-348.
112. - Grimprel, E. y Begue, P. **(1995)**. Pertussis: the new acellular vaccines. *Pediatr Pulmonol Suppl* 11: 84-85.
113. - Grondahl-Yli-Hannuksela, K., Vuononvirta, J., Barkoff, A.M., Viander, M., Van Der Meeren, O., Mertsola, J. y He, Q. **(2012)**. Gene polymorphism in toll-like receptor 4: effect on antibody production and persistence after acellular pertussis vaccination during adolescence. *J Infect Dis* 205(8): 1214-1219.
114. - Guimaraes, L.M., Carneiro, E.L. y Carvalho-Costa, F.A. **(2015)**. Increasing incidence of pertussis in Brazil: a retrospective study using surveillance data. *BMC Infect Dis* 15: 442.
115. - Guiso, N., Capiou, C., Carletti, G., Poolman, J. y Hauser, P. **(1999)**. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* 17(19): 2366-2376.
116. - Guiso, N. **(2009)**. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines. *Clin Infect Dis* 49(10): 1565-1569.
117. - Guiso, N. **(2015)**. *Molecular Medical Microbiology*. Second Edition. Chapter 85. *Bordetella pertussis*. 3: 1507-1527.
118. - Gupta, R.K., Saxena, S.N., Sharma, S.B. y Ahuja, S. **(1988)**. Studies on the optimal conditions for inactivation of *Bordetella pertussis* organisms with glutaraldehyde for preparation of a safe and potent pertussis vaccine. *Vaccine* 6(6): 491-496.

119. - Gupta, R.K., Saxena, S.N., Sharma, S.B. y Ahuja, S. **(1990)**. Immunogenicity of glutaraldehyde inactivated pertussis vaccine. *Vaccine* 8(6): 563-568.
120. - Gupta, R.K. **(1990)**. Use of glutaraldehyde for the preparation of pertussis vaccine. *Vaccine* 8(4): 409-410.
121. - Guris, D., Strebel, P.M., Bardenheier, B., Brennan, M., Tachdjian, R., Finch, E., Wharton, M. y Livengood, J.R. **(1999)**. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis* 28(6): 1230-1237.
122. - Gustafsson, L., Hessel, L., Storsaeter, J. y Olin, P. **(2006)**. Long-term follow-up of Swedish children vaccinated with acellular pertussis vaccines at 3, 5, and 12 months of age indicates the need for a booster dose at 5 to 7 years of age. *Pediatrics* 118(3): 978-984.
123. - Hausman, S.Z. y Burns, D.L. **(2000)**. Use of pertussis toxin encoded by ptx genes from *Bordetella bronchiseptica* to model the effects of antigenic drift of pertussis toxin on antibody neutralization. *Infect Immun* 68(6): 3763-3767.
124. - He, Q., Makinen, J., Berbers, G., Mooi, F.R., Viljanen, M.K., Arvilommi, H. y Mertsola, J. **(2003)**. *Bordetella pertussis* protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J Infect Dis* 187(8): 1200-1205.
125. - Hegerle, N., Paris, A.S., Brun, D., Dore, G., Njamkepo, E., Guillot, S. y Guiso, N. **(2012)**. Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetellae* not expressing pertactin. *Clin Microbiol Infect* 18(9): E340-346.
126. - Helmy, M.F., Hammam, M., el Kholy, M.S. y Guirguis, N. **(1992)**. *Bordetella pertussis* FHA antibodies in maternal/infants sera and colostrum. *J Egypt Public Health Assoc* 67(1-2): 195-212.
127. - Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F. y Nataro, J.P. **(1998)**. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 6(9): 370-378.
128. - Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. y Ala'Aldeen, D. **(2004)**. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(4): 692-744.
129. - Hewlett, E.L. y Edwards, K.M. **(2005)**. Clinical practice. Pertussis--not just for kids. *N Engl J Med* 352(12): 1215-1222.
130. - Hewlett, E.L., Burns, D.L., Cotter, P.A., Harvill, E.T., Merkel, T.J., Quinn, C.P. y Stibitz, E.S. **(2014)**. Pertussis pathogenesis--what we know and what we don't know. *J Infect Dis* 209(7): 982-985.
131. - Higgins, S.C., Lavelle, E.C., McCann, C., Keogh, B., McNeela, E., Byrne, P., O'Gorman, B., Jarnicki, A., McGuirk, P. y Mills, K.H. **(2003)**. Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. *J Immunol* 171(6): 3119-3127.
132. - Higgs, R., Higgins, S.C., Ross, P.J. y Mills, K.H. **(2012)**. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol* 5(5): 485-500.
133. - Hijnen, M., Mooi, F.R., van Gageldonk, P.G., Hoogerhout, P., King, A.J. y Berbers, G.A. **(2004)**. Epitope structure of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen. *Infect Immun* 72(7): 3716-3723.

134. - Hijnen, M., van Gageldonk, P.G., Berbers, G.A., van Woerkom, T. y Mooi, F.R. **(2005)**. The Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin retains its immunological properties after overproduction in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 41(1): 106-112.
135. - Hijnen, M., van Zoelen, D.J., Chamorro, C., van Gageldonk, P., Mooi, F.R., Berbers, G. y Liskamp, R.M. **(2007a)**. A novel strategy to mimic discontinuous protective epitopes using a synthetic scaffold. *Vaccine* 25(37-38): 6807-6817.
136. - Hijnen, M., de Voer, R., Mooi, F.R., Schepp, R., Moret, E.E., van Gageldonk, P., Smits, G. y Berbers, G.A. **(2007b)**. The role of peptide loops of the Bordetella pertussis protein P.69 pertactin in antibody recognition. *Vaccine* 25(31): 5902-5914.
137. - Hijnen, M., He, Q., Schepp, R., Van Gageldonk, P., Mertsola, J., Mooi, F.R. y Berbers, G.A. **(2008)**. Antibody responses to defined regions of the Bordetella pertussis virulence factor pertactin. *Scand J Infect Dis* 40(2): 94-104.
138. - Hofstetter, H.H., Shive, C.L. y Forsthuber, T.G. **(2002)**. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol* 169(1): 117-125.
139. - Howson, C.P., Howe, C.J. y Fineberg, H.V. **(1991)**. Histories of pertussis and rubella vaccines. Adverse Effects of Pertussis and Rubella Vaccines. (Washington, DC National Academy Press): 9-31.
140. - Ibsen, P.H. **(1996)**. The effect of formaldehyde, hydrogen peroxide and genetic detoxification of pertussis toxin on epitope recognition by murine monoclonal antibodies. *Vaccine* 14(5): 359-368.
141. - Inatsuka, C.S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J.F. y Cotter, P.A. **(2010)**. Pertactin is required for Bordetella species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect Immun* 78(7): 2901-2909.
142. - Iwasa, S., Ishida, S. y Akama, K. **(1985)**. Swelling of the brain in mice caused by pertussis vaccine--its quantitative determination and the responsible factors in the vaccine. *Jpn J Med Sci Biol* 38(2): 53-65.
143. - Jefferson, T., Rudin, M. y DiPietrantonj, C. **(2003)**. Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine* 21(17-18): 2003-2014.
144. - Ju, C.L., Sheu, G.C., Cheng, Y. y Lu, C.H. **(1997)**. Production and purification of Bordetella pertussis toxin. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 30(2): 72-83.
145. - Junker, M., Schuster, C.C., McDonnell, A.V., Sorg, K.A., Finn, M.C., Berger, B. y Clark, P.L. **(2006)**. Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13): 4918-4923.
146. - Kajava, A.V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M.N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. y Steven, A.C. **(2001)**. Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis and related bacterial secretory proteins. *Mol Microbiol* 42(2): 279-292.
147. - Kendrick, P.L. **(1933)**. LABORATORY: RAPID AGGLUTINATION TECHNIC APPLIED TO B. PERTUSSIS AGGLUTINATION. *Am J Public Health Nations Health* 23(12): 1310-1312.
148. - Kendrick, P.L., Eldering, G., Dixon, M.K. y Misner, J. **(1947)**. Mouse Protection Tests in the Study of Pertussis Vaccine: A Comparative Series Using the Intracerebral Route for Challenge. *Am J Public Health Nations Health* 37(7): 803-810.

149. - Khelef, N. y Guiso, N. **(1995)**. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett* 134(1): 27-32.
150. - Kimura, A., Mountzouros, K.T., Relman, D.A., Falkow, S. y Cowell, J.L. **(1990)**. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect Immun* 58(1): 7-16.
151. - Kimura, M. y Hikino, N. **(1985)**. Results with a new DTP vaccine in Japan. *Dev Biol Stand* 61: 545-561.
152. - King, A.J., Berbers, G., van Oirschot, H.F., Hoogerhout, P., Knipping, K. y Mooi, F.R. **(2001)**. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology* 147(Pt 11): 2885-2895.
153. - Kirimanjeswara, G.S., Mann, P.B. y Harvill, E.T. **(2003)**. Role of antibodies in immunity to *Bordetella* infections. *Infect Immun* 71(4): 1719-1724.
154. - Komatsu, E., Yamaguchi, F., Abe, A., Weiss, A.A. y Watanabe, M. **(2010)**. Synergic effect of genotype changes in pertussis toxin and pertactin on adaptation to an acellular pertussis vaccine in the murine intranasal challenge model. *Clin Vaccine Immunol* 17(5): 807-812.
155. - Kool, M., Fierens, K. y Lambrecht, B.N. **(2012)**. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J Med Microbiol* 61(Pt 7): 927-934.
156. - Kugler, S., Bocker, K., Heusipp, G., Greune, L., Kim, K.S. y Schmidt, M.A. **(2007)**. Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model. *Cell Microbiol* 9(3): 619-632.
157. - Laemmli, U.K. **(1970)**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
158. - Lam, C., Octavia, S., Ricafort, L., Sintchenko, V., Gilbert, G.L., Wood, N., McIntyre, P., Marshall, H., Guiso, N., Keil, A.D., Lawrence, A., Robson, J., Hogg, G. y Lan, R. **(2014)**. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg Infect Dis* 20(4): 626-633.
159. - Lapin, J.H. **(1943)**. Whooping cough. *Springfield, IL: Charles C. Thomas*;
160. - Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. y Higgins, D.G. **(2007)**. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
161. - Leber, A.L. **(2014)**. Pertussis: relevant species and diagnostic update. *Clin Lab Med* 34(2): 237-255.
162. - Lee, S.F., Halperin, S.A., Knight, J.B. y Tait, A. **(2002)**. Purification and immunogenicity of a recombinant *Bordetella pertussis* S1S3FHA fusion protein expressed by *Streptococcus gordonii*. *Appl Environ Microbiol* 68(9): 4253-4258.
163. - Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, N., Novotny, P. y Brennan, M.J. **(1991)**. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(2): 345-349.

164. - Leininger, E., Ewanowich, C.A., Bhargava, A., Peppler, M.S., Kenimer, J.G. y Brennan, M.J. **(1992)**. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the Bordetella pertussis adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 60(6): 2380-2385.
165. - Li, Z., Zhang, Y., Wang, Q., Li, Z., Liu, Y., Zhang, S., Zhang, G., Ma, G., Luo, J. y Su, Z. **(2016)**. Purification design and practice for pertactin, the third component of acellular pertussis vaccine, from Bordetella pertussis. *Vaccine*.
166. - Livey, I., Duggleby, C.J. y Robinson, A. **(1987)**. Cloning and nucleotide sequence analysis of the serotype 2 fimbrial subunit gene of Bordetella pertussis. *Mol Microbiol* 1(2): 203-209.
167. - Locht, C. **(1999)**. Molecular aspects of Bordetella pertussis pathogenesis. *Int Microbiol* 2(3): 137-144.
168. - Locht, C. **(2007)**. Bordetella: Molecular Microbiology. *Horizon Bioscience*.
169. - Loscher, C.E., Donnelly, S., Lynch, M.A. y Mills, K.H. **(2000)**. Induction of inflammatory cytokines in the brain following respiratory infection with Bordetella pertussis. *J Neuroimmunol* 102(2): 172-181.
170. - Lyons, A.B. **(1997)**. Pertussis toxin pretreatment alters the in vivo cell division behaviour and survival of B lymphocytes after intravenous transfer. *Immunol Cell Biol* 75(1): 7-12.
171. - Makhov, A.M., Hannah, J.H., Brennan, M.J., Trus, B.L., Kocsis, E., Conway, J.F., Wingfield, P.T., Simon, M.N. y Steven, A.C. **(1994)**. Filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J Mol Biol* 241(1): 110-124.
172. - Marr, N., Shah, N.R., Lee, R., Kim, E.J. y Fernandez, R.C. **(2011)**. Bordetella pertussis autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance. *PLoS One* 6(6): e20585.
173. - Martínez C, D., Mendoza D, V., Peraza G, T., Carmenate M, A. y Morera A, B. **(2012)**. Pertussis-like syndrome and whooping cough. *Revista Cubana de Medicina General Integral* 28(4).
174. - Mastrantonio, P., Giuliano, M., Stefanelli, P., Sofia, T., De Marzi, L., Tarabini, G., Quarto, M. y Moiraghi, A. **(1997)**. Bordetella parapertussis infections. *Dev Biol Stand* 89: 255-259.
175. - Matheson, A.J. y Goa, K.L. **(2000)**. Diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine adsorbed (Triacelluvax; DTaP3-CB): a review of its use in the prevention of Bordetella pertussis infection. *Paediatr Drugs* 2(2): 139-159.
176. - Mattoo, S. y Cherry, J.D. **(2005)**. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies. *Clin Microbiol Rev* 18(2): 326-382.
177. - Mazar, J. y Cotter, P.A. **(2007)**. New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol* 15(11): 508-515.
178. - McGarry, L.J., Krishnarajah, G., Hill, G., Masseria, C., Skornicki, M., Pruttivarasin, N., Arondekar, B., Roiz, J., Pelton, S.I. y Weinstein, M.C. **(2014)**. Cost-effectiveness of Tdap vaccination of adults aged ≥ 65 years in the prevention of pertussis in the US: a dynamic model of disease transmission. *PLoS One* 9(1): e72723.
179. - McGuirk, P. y Mills, K.H. **(2000)**. Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis. *Eur J Immunol* 30(2): 415-422.

180. - McGuirk, P., McCann, C. y Mills, K.H. **(2002)**. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 195(2): 221-231.
181. - Melvin, J.A., Scheller, E.V., Miller, J.F. y Cotter, P.A. **(2014)**. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol* 12(4): 274-288.
182. - Melvin, J.A., Scheller, E.V., Noel, C.R. y Cotter, P.A. **(2015)**. New Insight into Filamentous Hemagglutinin Secretion Reveals a Role for Full-Length FhaB in *Bordetella* Virulence. *MBio* 6(4).
183. - Merkel, T.J., Boucher, P.E., Stibitz, S. y Grippe, V.K. **(2003)**. Analysis of bvgR expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 185(23): 6902-6912.
184. - Mertsola, J. **(2014)**. Editorial commentary: pertussis is less severe in vaccinated than in unvaccinated patients. *Clin Infect Dis* 58(11): 1530-1532.
185. - Michaelsen, T.E., Kolberg, J., Aase, A., Herstad, T.K. y Hoiby, E.A. **(2004)**. The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*. *Scand J Immunol* 59(1): 34-39.
186. - Millen, S.H., Lewallen, D.M., Herr, A.B., Iyer, S.S. y Weiss, A.A. **(2010)**. Identification and characterization of the carbohydrate ligands recognized by pertussis toxin via a glycan microarray and surface plasmon resonance. *Biochemistry* 49(28): 5954-5967.
187. - Millen, S.H., Watanabe, M., Komatsu, E., Yamaguchi, F., Nagasawa, Y., Suzuki, E., Monaco, H. y Weiss, A.A. **(2015)**. Single Amino Acid Polymorphisms of Pertussis Toxin Subunit S2 (PtxB) Affect Protein Function. *PLoS One* 10(9): e0137379.
188. - Mills, K.H., Ryan, M., Ryan, E. y Mahon, B.P. **(1998)**. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 66(2): 594-602.
189. - Mills, K.H. **(2001)**. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect* 3(8): 655-677.
190. - MINSAP **(2015)**. Anuario Estadístico de Salud 2014. <http://files.sld.cu/bvscuba/files/2015/04/anuario-estadistico-de-salud-2014.pdf>.
191. - Miyaji, Y., Otsuka, N., Toyozumi-Ajisaka, H., Shibayama, K. y Kamachi, K. **(2013)**. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS One* 8(10): e77165.
192. - Mobberley-Schuman, P.S. y Weiss, A.A. **(2005)**. Influence of CR3 (CD11b/CD18) expression on phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun* 73(11): 7317-7323.
193. - Monack, D., Munoz, J.J., Peacock, M.G., Black, W.J. y Falkow, S. **(1989)**. Expression of pertussis toxin correlates with pathogenesis in *Bordetella* species. *J Infect Dis* 159(2): 205-210.
194. - Monroy-Vaca, E.X., de Armas, Y., Illnait-Zaragozi, M.T., Torano, G., Diaz, R., Vega, D., Alvarez-Lam, I., Calderon, E.J. y Stensvold, C.R. **(2014)**. Prevalence and genotype distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban infants and toddlers with whooping cough. *J Clin Microbiol* 52(1): 45-51.
195. - Mooi, F.R., ter Avest, A. y van der Heide, H.G. **(1990)**. Structure of the *Bordetella pertussis* gene coding for the serotype 3 fimbrial subunit. *FEMS Microbiol Lett* 54(1-3): 327-331.

196. - Mooi, F.R., van Oirschot, H., Heuvelman, K., van der Heide, H.G., Gaastra, W. y Willems, R.J. **(1998)**. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 66(2): 670-675.
197. - Mooi, F.R., He, Q., van Oirschot, H. y Mertsola, J. **(1999)**. Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun* 67(6): 3133-3134.
198. - Mooi, F.R., van Loo, I.H., van Gent, M., He, Q., Bart, M.J., Heuvelman, K.J., de Greeff, S.C., Diavatopoulos, D., Teunis, P., Nagelkerke, N. y Mertsola, J. **(2009)**. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* 15(8): 1206-1213.
199. - Mooi, F.R. **(2010)**. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 10(1): 36-49.
200. - Mooi, F.R., Van Der Maas, N.A. y De Melker, H.E. **(2014)**. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol Infect* 142(4): 685-694.
201. - Mooi, F.R., Zeddeman, A. y van Gent, M. **(2015)**. The pertussis problem: classical epidemiology and strain characterization should go hand in hand. *J Pediatr (Rio J)* 91(4): 315-317.
202. - Mooi FR, He Q y N., G. **(2007)**. Phylogeny, evolution, and epidemiology of *Bordetellae*. In: Loch C, editor. *Bordetella: Molecular Microbiology*. Wymondham, UK: Horizon Bioscience; 17-45.
203. - Moss, J., Stanley, S.J., Burns, D.L., Hsia, J.A., Yost, D.A., Myers, G.A. y Hewlett, E.L. **(1983)**. Activation by thiol of the latent NAD glycohydrolase and ADP-ribosyltransferase activities of *Bordetella pertussis* toxin (islet-activating protein). *J Biol Chem* 258(19): 11879-11882.
204. - Munoz, F.M., Bond, N.H., Maccato, M., Pinell, P., Hammill, H.A., Swamy, G.K., Walter, E.B., Jackson, L.A., Englund, J.A., Edwards, M.S., Healy, C.M., Petrie, C.R., Ferreira, J., Goll, J.B. y Baker, C.J. **(2014)**. Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: a randomized clinical trial. *Jama* 311(17): 1760-1769.
205. - Munoz, J.J., Arai, H. y Cole, R.L. **(1981)**. Mouse-protecting and histamine-sensitizing activities of pertussigen and fimbrial hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 32(1): 243-250.
206. - Nasso, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Costantino, P., Rappuoli, R. y Ausiello, C.M. **(2009)**. Genetically detoxified pertussis toxin induces Th1/Th17 immune response through MAPKs and IL-10-dependent mechanisms. *J Immunol* 183(3): 1892-1899.
207. - Nencioni, L., Pizza, M., Bugnoli, M., De Magistris, T., Di Tommaso, A., Giovannoni, F., Manetti, R., Marsili, I., Matteucci, G., Nucci, D. y et al. **(1990)**. Characterization of genetically inactivated pertussis toxin mutants: candidates for a new vaccine against whooping cough. *Infect Immun* 58(5): 1308-1315.
208. - Nishida, M., Suda, R., Nagamatsu, Y., Tanabe, S., Onohara, N., Nakaya, M., Kanaho, Y., Shibata, T., Uchida, K., Sumimoto, H., Sato, Y. y Kurose, H. **(2010)**. Pertussis toxin up-regulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *J Biol Chem* 285(20): 15268-15277.
209. - Octavia, S., Sintchenko, V., Gilbert, G.L., Lawrence, A., Keil, A.D., Hogg, G. y Lan, R. **(2012)**. Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying prn2 and ptxP3 alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008-2010. *J Infect Dis* 205(8): 1220-1224.

210. - Olin, P., Gustafsson, L., Barreto, L., Hessel, L., Mast, T.C., Rie, A.V., Bogaerts, H. y Storsaeter, J. **(2003)**. Declining pertussis incidence in Sweden following the introduction of acellular pertussis vaccine. *Vaccine* 21(17-18): 2015-2021.
211. - Oliver, D.C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S. y Fernandez, R.C. **(2003)**. A conserved region within the Bordetella pertussis autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* 47(5): 1367-1383.
212. - Onorato, I.M., Wassilak, S.G. y Meade, B. **(1992)**. Efficacy of whole-cell pertussis vaccine in preschool children in the United States. *Jama* 267(20): 2745-2749.
213. - Ormazabal, M., Bartel, E., Gaillard, M.E., Bottero, D., Errea, A., Zurita, M.E., Moreno, G., Rumbo, M., Castuma, C., Flores, D., Martin, M.J. y Hozbor, D. **(2014)**. Characterization of the key antigenic components of pertussis vaccine based on outer membrane vesicles. *Vaccine* 32(46): 6084-6090.
214. - Otsuka, N., Han, H.J., Toyozumi-Ajisaka, H., Nakamura, Y., Arakawa, Y., Shibayama, K. y Kamachi, K. **(2012)**. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient Bordetella pertussis in Japan. *PLoS One* 7(2): e31985.
215. - Ozcengiz, E., Kilinc, K., Buyuktanir, O. y Gunalp, A. **(2004)**. Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography. *Vaccine* 22(11-12): 1570-1575.
216. - Paoletti, L.C., Pinel, J., Kennedy, R.C. y Kasper, D.L. **(2000)**. Maternal antibody transfer in baboons and mice vaccinated with a group B streptococcal polysaccharide conjugate. *J Infect Dis* 181(2): 653-658.
217. - Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., Cerdeno-Tarraga, A.M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M.A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B.G. y Maskell, D.J. **(2003)**. Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. *Nat Genet* 35(1): 32-40.
218. - Parkinson, J.S. y Kofoed, E.C. **(1992)**. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* 26: 71-112.
219. - Pawloski, L.C., Queenan, A.M., Cassiday, P.K., Lynch, A.S., Harrison, M.J., Shang, W., Williams, M.M., Bowden, K.E., Burgos-Rivera, B., Qin, X., Messonnier, N. y Tondella, M.L. **(2014)**. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient Bordetella pertussis in the United States. *Clin Vaccine Immunol* 21(2): 119-125.
220. - Phillips, R. y Ager, A. **(2002)**. Activation of pertussis toxin-sensitive CXCL12 (SDF-1) receptors mediates transendothelial migration of T lymphocytes across lymph node high endothelial cells. *Eur J Immunol* 32(3): 837-847.
221. - Pittman, M., Furman, B.L. y Wardlaw, A.C. **(1980)**. Bordetella pertussis respiratory tract infection in the mouse: pathophysiological responses. *J Infect Dis* 142(1): 56-66.
222. - Pizza, M., Covacci, A., Bartoloni, A., Perugini, M., Nencioni, L., De Magistris, M.T., Villa, L., Nucci, D., Manetti, R., Bugnoli, M. y et al. **(1989)**. Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* 246(4929): 497-500.

223. - Plotkin, S.A. **(2014)**. The pertussis problem. *Clin Infect Dis* 58(6): 830-833.
224. - Poolman, J.T. y Hallander, H.O. **(2007)**. Acellular pertussis vaccines and the role of pertactin and fimbriae. *Expert Rev Vaccines* 6(1): 47-56.
225. - Preston, A. **(2005)**. Bordetella pertussis: the intersection of genomics and pathobiology. *Cmaj* 173(1): 55-62.
226. - Prevention., C.f.D.C.a. **(2013)**. Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women--Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 62(7): 131-135.
227. - Prevention., C.f.D.C.a. **(2015)**. In: Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S, editors. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 13th ed. Washington D.C: Public Health Foundation.
228. - Proenza-Alfonzo, L., Karen Marrero-Domínguez, K. y Fando-Calzada, R. **(2013)**. PCR alelo-específica para identificar los alelos ptxA K9/G129 vs. R9/E129 y prn1 vs. prn2 en *Bordetella pertussis*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 44(1).
229. - Quinn, H.E., Snelling, T.L., Macartney, K.K. y McIntyre, P.B. **(2014)**. Duration of protection after first dose of acellular pertussis vaccine in infants. *Pediatrics* 133(3): e513-519.
230. - Raeven, R.H., van der Maas, L., Tilstra, W., Uittenbogaard, J.P., Bindels, T.H., Kuipers, B., van der Ark, A., Pennings, J.L., van Riet, E., Jiskoot, W., Kersten, G.F. y Metz, B. **(2015)**. Immunoproteomic Profiling of Bordetella pertussis Outer Membrane Vesicle Vaccine Reveals Broad and Balanced Humoral Immunogenicity. *J Proteome Res* 14(7): 2929-2942.
231. - Rambow, A.A., Fernandez, R.C. y Weiss, A.A. **(1998)**. Characterization of BrkA expression in Bordetella bronchiseptica. *Infect Immun* 66(8): 3978-3980.
232. - Redd, S.C., Rumschlag, H.S., Biellik, R.J., Sanden, G.N., Reimer, C.B. y Cohen, M.L. **(1988)**. Immunoblot analysis of humoral immune responses following infection with Bordetella pertussis or immunization with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. *J Clin Microbiol* 26(7): 1373-1377.
233. - Relyveld, E., Oato, N.H., Guerin, N., Coursaget, P., Huet, M. y Gupta, R.K. **(1991)**. Determination of circulating antibodies directed to pertussis toxin and of agglutinogens in children vaccinated with either the whole cell or component pertussis vaccine in France, Japan and Senegal. *Vaccine* 9(11): 843-850.
234. - Renn, J.P., Junker, M., Besingi, R.N., Braselmann, E. y Clark, P.L. **(2012)**. ATP-independent control of autotransporter virulence protein transport via the folding properties of the secreted protein. *Chem Biol* 19(2): 287-296.
235. - Robbins, J.B., Schneerson, R., Trollfors, B., Sato, H., Sato, Y., Rappuoli, R. y Keith, J.M. **(2005)**. The diphtheria and pertussis components of diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine should be genetically inactivated mutant toxins. *J Infect Dis* 191(1): 81-88.
236. - Robbins, J.B., Schneerson, R., Kubler-Kielb, J., Keith, J.M., Trollfors, B., Vinogradov, E. y Shiloach, J. **(2014)**. Toward a new vaccine for pertussis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(9): 3213-3216.
237. - Roberts, M., Bacon, A., Rappuoli, R., Pizza, M., Cropley, I., Douce, G., Dougan, G., Marinaro, M., McGhee, J. y Chatfield, S. **(1995)**. A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP-ribosyltransferase activity, PT-9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins. *Infect Immun* 63(6): 2100-2108.

238. - Rodriguez, M.E., Samo, A.L., Hozbor, D.F. y Yantorno, O.M. **(1993)**. Effect of hydromechanical forces on the production of filamentous haemagglutinin and pertussis toxin of *Bordetella pertussis*. *J Ind Microbiol* 12(2): 103-108.
239. - Romanos, M.A., Clare, J.J., Beesley, K.M., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Makoff, A.J., Dougan, G., Fairweather, N.F. y Charles, I.G. **(1991)**. Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine* 9(12): 901-906.
240. - Ross, P.J., Sutton, C.E., Higgins, S., Allen, A.C., Walsh, K., Misiak, A., Lavelle, E.C., McLoughlin, R.M. y Mills, K.H. **(2013)**. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog* 9(4): e1003264.
241. - Roy, C.R. y Falkow, S. **(1991)**. Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. *J Bacteriol* 173(7): 2385-2392.
242. - Rozdzinski, E., Sandros, J., van der Flier, M., Young, A., Spellerberg, B., Bhattacharyya, C., Straub, J., Musso, G., Putney, S., Starzyk, R. y et al. **(1995a)**. Inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions and inflammation by peptides from a bacterial adhesin which mimic coagulation factor X. *J Clin Invest* 95(3): 1078-1085.
243. - Rozdzinski, E., Spellerberg, B., van der Flier, M., Bhattacharyya, C., Hoepelman, A.I., Moran, M.A., Jarpe, A., Putney, S.D., Starzyk, R.M. y Tuomanen, E. **(1995b)**. Peptide from a prokaryotic adhesin blocks leukocyte migration in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 172(3): 785-793.
244. - Ryan, M., McCarthy, L., Rappuoli, R., Mahon, B.P. y Mills, K.H. **(1998)**. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol* 10(5): 651-662.
245. - Salcedo-Rivillas, C., Debie, A.S., Miyaji, E.N., Ferreira, J.M., Jr., Raw, I., Locht, C., Ho, P.L., Mielcarek, N. y Oliveira, M.L. **(2014)**. Pertussis toxin improves immune responses to a combined pneumococcal antigen and leads to enhanced protection against *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Vaccine Immunol* 21(7): 972-981.
246. - Salim, A.M., Liang, Y. y Kilgore, P.E. **(2015)**. Protecting Newborns Against Pertussis: Treatment and Prevention Strategies. *Paediatr Drugs* 17(6): 425-441.
247. - Salmaso, S., Mastrantonio, P., Wassilak, S.G., Giuliano, M., Anemona, A., Giammanco, A., Tozzi, A.E., Ciofi degli Atti, M.L. y Greco, D. **(1998)**. Persistence of protection through 33 months of age provided by immunization in infancy with two three-component acellular pertussis vaccines. Stage II Working Group. *Vaccine* 16(13): 1270-1275.
248. - Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. **(1989)**. Molecular cloning: a laboratory manual.
249. - Sato, H. y Sato, Y. **(1984)**. *Bordetella pertussis* infection in mice: correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an intracerebral or aerosol challenge system. *Infect Immun* 46(2): 415-421.
250. - Sawal, M., Cohen, M., Irazuzta, J.E., Kumar, R., Kirton, C., Brundler, M.A., Evans, C.A., Wilson, J.A., Raffeeq, P., Azaz, A., Rotta, A.T., Vora, A., Vohra, A., Abboud, P., Mirkin, L.D., Cooper, M., Dishop, M.K., Graf, J.M., Petros, A. y Klonin, H. **(2009)**. Fulminant pertussis: a multi-center study with new insights into the clinico-pathological mechanisms. *Pediatr Pulmonol* 44(10): 970-980.
251. - Scheller, E.V. y Cotter, P.A. **(2015)**. *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog Dis* 73(8): ftv079.

252. - Scheller, E.V., Melvin, J.A., Sheets, A.J. y Cotter, P.A. **(2015)**. Cooperative roles for fimbria and filamentous hemagglutinin in *Bordetella* adherence and immune modulation. *MBio* 6(3).
253. - Schure, R.M., Hendrikx, L.H., de Rond, L.G., Ozturk, K., Sanders, E.A., Berbers, G.A. y Buisman, A.M. **(2012)**. T-cell responses before and after the fifth consecutive acellular pertussis vaccination in 4-year-old Dutch children. *Clin Vaccine Immunol* 19(11): 1879-1886.
254. - Schure, R.M., Hendrikx, L.H., de Rond, L.G., Ozturk, K., Sanders, E.A., Berbers, G.A. y Buisman, A.M. **(2013)**. Differential T- and B-cell responses to pertussis in acellular vaccine-primed versus whole-cell vaccine-primed children 2 years after preschool acellular booster vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 20(9): 1388-1395.
255. - Scott, S.J., Olson, C.V. y Lad, P.M. **(1988)**. Peptide mapping studies of the pertussis toxin substrate in human neutrophils, platelets and erythrocytes. *Mol Immunol* 25(3): 305-311.
256. - Sebo, P., Osicka, R. y Masin, J. **(2014)**. Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13(10): 1215-1227.
257. - Sekura, R.D., Fish, F., Manclark, C.R., Meade, B. y Zhang, Y.L. **(1983)**. Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 258(23): 14647-14651.
258. - Seubert, A., D'Oro, U., Scarselli, M. y Pizza, M. **(2014)**. Genetically detoxified pertussis toxin (PT-9K/129G): implications for immunization and vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13(10): 1191-1204.
259. - Sheridan, S.L., Frith, K., Snelling, T.L., Grimwood, K., McIntyre, P.B. y Lambert, S.B. **(2014)**. Waning vaccine immunity in teenagers primed with whole cell and acellular pertussis vaccine: recent epidemiology. *Expert Rev Vaccines* 13(9): 1081-1106.
260. - Sheridan, S.L., Ware, R.S., Grimwood, K. y Lambert, S.B. **(2015)**. Reduced risk of pertussis in whole-cell compared to acellular vaccine recipients is not confounded by age or receipt of booster-doses. *Vaccine* 33(39): 5027-5030.
261. - Shorvon, S. y Berg, A. **(2008)**. Pertussis vaccination and epilepsy--an erratic history, new research and the mismatch between science and social policy. *Epilepsia* 49(2): 219-225.
262. - Shuel, M., Jamieson, F.B., Tang, P., Brown, S., Farrell, D., Martin, I., Stoltz, J. y Tsang, R.S. **(2013)**. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone. *Int J Infect Dis* 17(6): e413-417.
263. - Skelton, S.K. y Wong, K.H. **(1990)**. Simple, efficient purification of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from *Bordetella pertussis* by hydrophobic and affinity interaction. *J Clin Microbiol* 28(5): 1062-1065.
264. - Skerry, C.M. y Mahon, B.P. **(2011)**. A live, attenuated *Bordetella pertussis* vaccine provides long-term protection against virulent challenge in a murine model. *Clin Vaccine Immunol* 18(2): 187-193.
265. - Skibinski, D.A., Baudner, B.C., Singh, M. y O'Hagan, D.T. **(2011)**. Combination vaccines. *J Glob Infect Dis* 3(1): 63-72.
266. - Smith, A.M., Guzman, C.A. y Walker, M.J. **(2001)**. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* 25(3): 309-333.
267. - Snapper, C.M. y Paul, W.E. **(1987)**. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236(4804): 944-947.

268. - Spangrude, G.J., Sacchi, F., Hill, H.R., Van Epps, D.E. y Daynes, R.A. **(1985)**. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol* 135(6): 4135-4143.
269. - Stainer, D.W. y Scholte, M.J. **(1970)**. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 63(2): 211-220.
270. - Standfast, A.F. **(1958)**. The comparison between field trials and mouse protection tests against intranasal and intracerebral challenges with *Bordetella pertussis*. *Immunology* 1(2): 135-143.
271. - Stefanelli, P., Fazio, C., Fedele, G., Spensieri, F., Ausiello, C.M. y Mastrantonio, P. **(2009)**. A natural pertactin deficient strain of *Bordetella pertussis* shows improved entry in human monocyte-derived dendritic cells. *New Microbiol* 32(2): 159-166.
272. - Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Cockle, S.A., Klein, M.H. y Read, R.J. **(1994)**. The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* 2(1): 45-57.
273. - Steinhoff, M.C., Reed, G.F., Decker, M.D., Edwards, K.M., Englund, J.A., Pichichero, M.E., Rennels, M.B., Anderson, E.L., Deloria, M.A. y Meade, B.D. **(1995)**. A randomized comparison of reactogenicity and immunogenicity of two whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics* 96(3 Pt 2): 567-570.
274. - Stenger, R.M., Poelen, M.C., Moret, E.E., Kuipers, B., Bruijns, S.C., Hoogerhout, P., Hijnen, M., King, A.J., Mooi, F.R., Boog, C.J. y van Els, C.A. **(2009)**. Immunodominance in mouse and human CD4+ T-cell responses specific for the *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Infect Immun* 77(2): 896-903.
275. - Storsaeter, J., Hallander, H.O., Gustafsson, L. y Olin, P. **(1998)**. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 16(20): 1907-1916.
276. - Storsaeter, J., Hallander, H.O., Gustafsson, L. y Olin, P. **(2003)**. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 21(25-26): 3542-3549.
277. - Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M. y Ishii, S. **(1982)**. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 21(22): 5516-5522.
278. - Teepe, J., Broekhuizen, B.D., Ieven, M., Loens, K., Huygen, K., Kretzschmar, M., de Melker, H., Butler, C.C., Little, P., Stuart, B., Coenen, S., Goossens, H. y Verheij, T.J. **(2015)**. Prevalence, diagnosis, and disease course of pertussis in adults with acute cough: a prospective, observational study in primary care. *Br J Gen Pract* 65(639): e662-667.
279. - Thalen, M., van den, I.J., Jiskoot, W., Zomer, B., Roholl, P., de Gooijer, C., Beuvery, C. y Tramper, J. **(1999)**. Rational medium design for *Bordetella pertussis*: basic metabolism. *J Biotechnol* 75(2-3): 147-159.
280. - Thalen, M., Venema, M., van den, I.J., Berwald, L., Beuvery, C., Martens, D. y Tramper, J. **(2006a)**. Effect of relevant culture parameters on Pertussis Toxin expression by *Bordetella pertussis*. *Biologicals* 34(3): 213-220.
281. - Thalen, M., Venema, M., Dekker, A., Berwald, L., van den, I.J., Zomer, B., Beuvery, C., Martens, D. y Tramper, J. **(2006b)**. Fed-batch cultivation of *Bordetella pertussis*: metabolism and Pertussis Toxin production. *Biologicals* 34(4): 289-297.
282. - Thalen, M., van der Ark, A., van den Ijssel, J., van Straaten, I., Jansen, D., Beuvery, C., Martens, D. y Tramper, J. **(2008)**. Improving the cellular pertussis vaccine: increased potency and consistency. *Vaccine* 26(5): 653-663.

283. - Thomas, M.G., Redhead, K. y Lambert, H.P. **(1989)**. Human serum antibody responses to Bordetella pertussis infection and pertussis vaccination. *J Infect Dis* 159(2): 211-218.
284. - Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. **(1997)**. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25(24): 4876-4882.
285. - Towbin, H. y Gordon, J. **(1984)**. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J Immunol Methods* 72(2): 313-340.
286. - Tozzi, A.E., Celentano, L.P., Ciofi degli Atti, M.L. y Salmaso, S. **(2005)**. Diagnosis and management of pertussis. *Cmaj* 172(4): 509-515.
287. - Trollfors, B., Taranger, J., Lagergard, T., Lind, L., Sundh, V., Zackrisson, G., Lowe, C.U., Blackwelder, W. y Robbins, J.B. **(1995)**. A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine. *N Engl J Med* 333(16): 1045-1050.
288. - Trollfors, B., Taranger, J., Lagergard, T., Lind, L., Sundh, V., Zackrisson, G., Bryla, D.A. y Robbins, J.B. **(1997)**. Efficacy of a monocomponent pertussis toxoid vaccine after household exposure to pertussis. *J Pediatr* 130(4): 532-536.
289. - Tsang, R.S., Shuel, M., Jamieson, F.B., Drews, S., Hoang, L., Horsman, G., Lefebvre, B., Desai, S. y St-Laurent, M. **(2014)**. Pertactin-negative Bordetella pertussis strains in Canada: characterization of a dozen isolates based on a survey of 224 samples collected in different parts of the country over the last 20 years. *J Korean Med Sci* 28: 65-69.
290. - Ui, M., Katada, T., Nogimori, K., Tamura, M. y Yajima, M. **(1986)**. [Pertussis toxin--islet-activating protein (IAP)]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 31(4 Suppl): 300-323.
291. - van den Biggelaar, A.H. y Poolman, J.T. **(2016)**. Predicting future trends in the burden of pertussis in the 21st century: implications for infant pertussis and the success of maternal immunization. *Expert Rev Vaccines* 15(1): 69-80.
292. - van der Ark, A.A., Hozbor, D.F., Boog, C.J., Metz, B., van den Dobbelsteen, G.P. y van Els, C.A. **(2012)**. Resurgence of pertussis calls for re-evaluation of pertussis animal models. *Expert Rev Vaccines* 11(9): 1121-1137.
293. - van Gent, M., van Loo, I.H., Heuvelman, K.J., de Neeling, A.J., Teunis, P. y Mooi, F.R. **(2011)**. Studies on Prn variation in the mouse model and comparison with epidemiological data. *PLoS One* 6(3): e18014.
294. - van Gent, M., Heuvelman, C.J., van der Heide, H.G., Hallander, H.O., Advani, A., Guiso, N., Wirsing von Konig, C.H., Vestrheim, D.F., Dalby, T., Fry, N.K., Pierard, D., Detemmerman, L., Zavadilova, J., Fabianova, K., Logan, C., Habington, A., Byrne, M., Lutynska, A., Mosiej, E., Pelaz, C., Grondahl-Yli-Hannuksela, K., Barkoff, A.M., Mertsola, J., Economopoulou, A., He, Q. y Mooi, F.R. **(2015)**. Analysis of Bordetella pertussis clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(4): 821-830.
295. - Walls, T., Graham, P., Petousis-Harris, H., Hill, L. y Austin, N. **(2016)**. Infant outcomes after exposure to Tdap vaccine in pregnancy: an observational study. *BMJ Open* 6(1): e009536.
296. - Warfel, J.M., Beren, J. y Merkel, T.J. **(2012a)**. Airborne transmission of Bordetella pertussis. *J Infect Dis* 206(6): 902-906.
297. - Warfel, J.M., Beren, J., Kelly, V.K., Lee, G. y Merkel, T.J. **(2012b)**. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect Immun* 80(4): 1530-1536.

298. - Warfel, J.M., Zimmerman, L.I. y Merkel, T.J. **(2014)**. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(2): 787-792.
299. - Warfel, J.M. y Merkel, T.J. **(2014)**. The baboon model of pertussis: effective use and lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13(10): 1241-1252.
300. - Warfel, J.M., Zimmerman, L.I. y Merkel, T.J. **(2015)**. Comparison of Three Whole-cell Pertussis Vaccines in the Baboon Model of Pertussis. *Clin Vaccine Immunol*.
301. - Watanabe, M., Komatsu, E., Abe, K., Iyama, S., Sato, T. y Nagai, M. **(2002)**. Efficacy of pertussis components in an acellular vaccine, as assessed in a murine model of respiratory infection and a murine intracerebral challenge model. *Vaccine* 20(9-10): 1429-1434.
302. - Weiner, M., Anderson, C., Jernpeth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B. y Vaillancourt, C. **(1994)**. Studier pET system vectors and hosts. *Strategies Molecular Biology* 7: 41-43.
303. - Weiss, A.A. y Falkow, S. **(1984)**. Genetic analysis of phase change in Bordetella pertussis. *Infect Immun* 43(1): 263-269.
304. - Wendelboe, A.M., Van Rie, A., Salmaso, S. y Englund, J.A. **(2005)**. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 24(5 Suppl): S58-61.
305. - Weyrich, L.S., Feaga, H.A., Park, J., Muse, S.J., Safi, C.Y., Rolin, O.Y., Young, S.E. y Harvill, E.T. **(2014)**. Resident microbiota affect Bordetella pertussis infectious dose and host specificity. *J Infect Dis* 209(6): 913-921.
306. - WHO **(2010)**. Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 85(40): 385-400.
307. - WHO **(2012)**. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines. Annex 4: Disponible en http://who.int/biologicals/vaccines/TRS_979_Annex_974.pdf.
308. - WHO **(2015)**. Pertussis vaccines: WHO position paper - September 2015. *Wkly Epidemiol Rec* 90(35): 433-458.
309. - WHO **(2016)**. Pertussis vaccines: WHO position paper, August 2015-Recommendations. *Vaccine* 34(12): 1423-1425.
310. - Wiggers, J.B., Leis, J.A. y Gold, W.L. **(2015)**. The resurgence of pertussis. *Cmaj* 187(10): 755.
311. - Willems, R., Paul, A., van der Heide, H.G., ter Avest, A.R. y Mooi, F.R. **(1990)**. Fimbrial phase variation in Bordetella pertussis: a novel mechanism for transcriptional regulation. *Embo j* 9(9): 2803-2809.
312. - Winter, K., Zipprich, J., Harriman, K., Murray, E.L., Gornbein, J., Hammer, S.J., Yeganeh, N., Adachi, K. y Cherry, J.D. **(2015)**. Risk Factors Associated With Infant Deaths From Pertussis: A Case-Control Study. *Clin Infect Dis* 61(7): 1099-1106.
313. - Woolfrey, B.F. y Moody, J.A. **(1991)**. Human infections associated with Bordetella bronchiseptica. *Clin Microbiol Rev* 4(3): 243-255.
314. - Wu, T., Bi, J., Huang, Y., Zhang, Y., Sun, L., Sun, C. y Su, Z. **(2008)**. [Effect of solution environment on the purification of pertussis toxin]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 24(7): 1279-1284.
315. - Xing, D., Das, R.G., O'Neill, T., Corbel, M., Dellepiane, N. y Milstien, J. **(2001)**. Laboratory testing of whole cell pertussis vaccine: a WHO proficiency study using the Kendrick test. *Vaccine* 20(3-4): 342-351.

316. - Xing, D., Gaines Das, R., Douglas-Bardsley, A., Asokanathan, C. y Corbel, M. **(2014a)**. An international collaborative study of the effect of active pertussis toxin on the modified Kendrick test for acellular pertussis vaccines. *Biologicals* 42(2): 101-108.
317. - Xing, D., Asokanathan, C., Xu, Y.H., Bolgiano, B., Douglas-Bardsley, A., Zhang, S., Wang, J. y Corbel, M. **(2014b)**. Relationship of immunogenicity to protective potency in acellular pertussis vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 10(7): 2066-2073.
318. - Xing, D., Markey, K., Das, R.G. y Feavers, I. **(2014c)**. Whole-cell pertussis vaccine potency assays: the Kendrick test and alternative assays. *Expert Rev Vaccines* 13(10): 1175-1182.
319. - Xing, D.K., Canthaboo, C. y Corbel, M.J. **(1998)**. Nitric oxide induction in murine macrophages and spleen cells by whole-cell Bordetella pertussis vaccine. *Vaccine* 16(1): 16-23.
320. - Xu, Y., Wang, Y., Tan, Y., Zhang, H., Wu, L., Wang, L., Hou, Q. y Zhang, S. **(2009)**. Production and characterization of recombinant pertactin, fimbriae 2 and fimbriae 3 from Bordetella pertussis. *BMC Microbiol* 9: 274.
321. - Xu, Y., Zhang, S., Bolgiano, B., Tan, Y., Asokanathan, C., Zhang, H., Xing, D. y Wang, J. **(2011)**. Comparison of recombinant and native pertactin of Bordetella pertussis. *Vaccine* 29(10): 1974-1980.
322. - Zachariadis, O., Cassidy, J.P., Brady, J. y Mahon, B.P. **(2006)**. gammadelta T cells regulate the early inflammatory response to bordetella pertussis infection in the murine respiratory tract. *Infect Immun* 74(3): 1837-1845.
323. - Zeddeman, A., van Gent, M., Heuvelman, C.J., van der Heide, H.G., Bart, M.J., Advani, A., Hallander, H.O., Wirsing von Konig, C.H., Riffelman, M., Storsaeter, J., Vestrheim, D.F., Dalby, T., Krogfelt, K.A., Fry, N.K., Barkoff, A.M., Mertsola, J., He, Q. y Mooi, F. **(2014)**. Investigations into the emergence of pertactin-deficient Bordetella pertussis isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill* 19(33).
324. - Zepp, F., Heininger, U., Mertsola, J., Bernatowska, E., Guiso, N., Roord, J., Tozzi, A.E. y Van Damme, P. **(2011)**. Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe. *Lancet Infect Dis* 11(7): 557-570.
325. - Zhang, L., Xu, Y., Zhao, J., Kallonen, T., Cui, S., Xu, Y., Hou, Q., Li, F., Wang, J., He, Q. y Zhang, S. **(2010)**. Effect of vaccination on Bordetella pertussis strains, China. *Emerg Infect Dis* 16(11): 1695-1701.
326. - Zhang, Y. **(2009)**. I-TASSER: fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins* 77 Suppl 9: 100-113.
327. - Zhao, Z., Wang, C., Xue, Y., Ding, K., Zhang, C., Cheng, X., Li, Y., Liu, Y. y Wu, T. **(2010)**. [Immunogenicity and protective efficacy of pertactin recombinants against Bordetella bronchiseptica challenge]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 50(9): 1239-1245.
328. - Zlamy, M. **(2016)**. Rediscovering Pertussis. *Front Pediatr* 4: 52.

9 AUTOBIBLIOGRAFÍA RELACIONADA CON LA TESIS

9.1 Publicaciones relacionadas con el tema de la tesis:

1. Assessment of the *B. pertussis* BPCNIC0311 strain as a producing strain of genetically detoxified toxoid (PTg), filamentous hemagglutinin (FHA) and type 2 pertactin (Prn2). *Journal of Infectious Diseases and Therapeutics*, 2015, 3, 1-13. **(Primer AUTOR)**
2. Recombinant hybrid proteins from pertactin type 1 and 2 of *B. pertussis* are more immunogenic in mice than the original molecules. *Biotecnología Aplicada* 2014; Vol.31, No.1. **(Primer AUTOR)**

9.2 Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba relacionado con el tema de la tesis:

El trabajo obtuvo el Premio Nacional del año 2016 al resultado de la investigación científica: *Obtención de los antígenos de B. pertussis PTg, FHA, Prn2 y la variante híbrida de pertactina PRH2-1: evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora en ratones como formulaciones de tres componentes.*

9.3 Presentaciones en eventos científicos relacionados con el tema de la tesis:

Biotechnología Habana 2009 Conferencia y Cartel, La Habana, Cuba

Séptimo Congreso de la Sociedad Cubana de Inmunología, 2011 Conferencia La Habana, Cuba

First International Convention IMMUNOPHARMACOLOGY VACCIPHARMA 2015, Conferencia, Varadero Cuba

11th International *Bordetella* Symposium 2016, Carteles, Buenos Aires, Argentina

10 OTRAS PUBLICACIONES DEL AUTOR

10.1 Artículos

3. *Development of sandwich ELISA-based methods for screening B. pertussis antigens expressed in the bacterial cell culture*” *Biotecnología Aplicada* 2015;Vol. 32, No. 3, 3311-3317. **(Tercer AUTOR)**
4. Scale-up of the polyacrylamide gel electrophoresis-reverse staining-extrusion-passive elution technique for the straightforward recovery of milligrams of recombinant proteins. *Biotecnología Aplicada* 2015;32:2301-5. **(Segundo AUTOR)**
5. Preparation of plasmid DNA-containing liposomes using a high-pressure homogenization--extrusion technique. *J Control Release*. 2005 May 18;104(2):379-96. Epub 2005 Apr 2. **(Quinto AUTOR)**
6. A vaccination strategy consisting of Semliki-Forest-virus (SFV) DNA prime and fowlpox-virus boost significantly protects mice from a recombinant (HIV-1) vaccinia-virus infection. *Biotechnol Appl Biochem*. 2005 Feb;41(Pt 1):59-66. **(Primer AUTOR)**
7. Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) priming and Fowlpox Virus booster elicit stronger CD8+ T cell response in mice against an HIV-1 epitope than DNA-Poxvirus prime-booster approach. *Biotechnol Appl Biochem*. 2003 Oct 23. **(Segundo AUTOR)**
8. Study of different coupling agents in the conjugation of a V3-based synthetic MAP to carrier proteins. *J Pept Sci*. 2001 Sep;7(9):511-8. Study of different coupling agents in the conjugation of a V3-based synthetic MAP to carrier proteins. *J Pept Sci*. 2001 Sep;7(9):511-8. **(Cuarto AUTOR)**
9. Antibody response in rabbits against two HIV-1 Multi-Epitope Polypeptides bearing different copies of V3 epitopes fused to the N terminal fragment of N. meningitidis P64K protein. *Journal Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics* 2001. **(Primer AUTOR)**
10. Multivalent DNA-based immunization against hepatitis B virus with plasmids encoding surface and core antigens. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Mar 30;282(2):442-6. **(Cuarto AUTOR)**
11. Plasmid DNA-recombinant Opc protein complexes for nasal DNA immunization. *Vaccine*. 2001 Jun 14;19(27):3692-9. **(Segundo AUTOR)**
12. Immunogenicity comparison of a multi-antigenic peptide bearing V3 sequences of the human immunodeficiency virus type 1 with TAB9 protein in mice. *J Pept Sci*. 2000 May;6(5):217-24. **(Segundo AUTOR)**

13. A prime-boost regime that combines Montanide ISA720 and Alhydrogel to induce antibodies against the HIV-1 derived multiepitope polypeptide TAB9. Vaccine. 1999 Jun 4;17(20-21):2646-50. **(Segundo AUTOR)**
14. Effect of different adjuvants and immunomodulators on the humoral immune response of rabbits and mice against HIV-1 derived Multi-Epitope Polypeptides. 1999, Biotecnología Aplicada, 16:103-108. **(Quinto AUTOR)**
15. Broadly reactive antibodies against a gp120 V3 loop multi-epitope polypeptide neutralize different isolates of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1).Vaccine. 1997 Aug;15(11):1200-8. **(Sexto AUTOR)**

10.2 Patentes

1. System for the expression of heterologous antigens as fusion proteins. WO 97/26359, PCT 1997. **(Quinto AUTOR)**
2. Proceso de purificación de polipéptidos multiepitópicos (MEPS) OCPI No 48/98. **(Segundo AUTOR)**
3. Formulación de Ácidos Nucleicos y Acemanano. A61K39/00, A61K39/39. **(Segundo AUTOR)**
4. Variantes ingenierizadas de pertactina para uso vacunal. CU-2007-0240 **(Primer AUTOR)**.

11 ANEXOS

ANEXO 1. Método utilizado en la fusión virtual de los fragmentos A y B para generación de PRH1-2.

1. La proteína Prn2 se modeló por comparación con el molde 1DAB (Prn1) y de manera automática mediante el servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).
2. La vuelta de la hélice beta de Prn1 definida por las hebras beta ₈₅KLVD₈₉, ₉₂TLA₉₄, ₇₉VTV₈₁ correspondientes a las láminas beta B, C y A, se superpuso a la vuelta de la hélice beta de Prn2 definida por las hebras beta ₂₆₄VDV₂₆₆, ₂₇₀SVELA₂₇₄ y ₂₇₇IVE₂₇₉, correspondientes a las láminas beta B, C y A. La superposición estructural se realizó con la opción SUPPOS del programa WHATIF. Se determinó la matrix de superposición a las coordenadas de 1DAB.pdb (Prn1) y se le aplicó a las coordenadas del modelo Prn2 obtenido mediante el servidor I-TASSER.
3. Se eliminaron las coordenadas de los residuos S₂₆₇-P₅₃₉ de 1DAB.pdb (Prn1) y las coordenadas correspondientes a los residuos D₁-T₈₀ de Prn2.
4. Se optimizaron de manera automáticamente la estructura de los residuos de la interface entre los fragmentos y su entorno con el método roseta backrub (<https://kortemmelab.ucsf.edu/backrub/cgi-bin/rosettaweb.py?query=index>). El modelo obtenido se denominó moldePRH1-2.pdb
5. La proteína híbrida PRH1-2 se modeló por comparación utilizando el servidor I-TASSER, el modelo moldePRH1-2.pdb y el alineamiento siguiente (el resto de la secuencia es idéntico):

```
MoldePRH1-2.pdb ...264VDVK---AGKLVAD277....  
PRH1-2           ...264VDVSGSKAGKLVAD280....
```

6. Los impedimentos estéricos se eliminaron mediante una minimización de energía con programa MOE (corrida corta).
7. La calidad del modelo PRH1-2 se evaluó con el servidor Prosess (www.prosess.ca).

Un procedimiento similar se utilizó para modelar y evaluar la factibilidad del modelo de la proteína PRH2-1

ANEXO 2. Oligonucleótidos utilizados en la síntesis de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y en la caracterización molecular por secuenciación automática (SAUT).

Nombre	Secuencia 5'→3'	Descripción y Referencia	Técnica
pET-A0-new-L	5'ACACATATGGACTGGAACAACCA GTCCATCGTCAAGACCGGTG 3'	Hibrida en la región 5' del gen <i>prnA</i> . Contiene el sitio <u>Nde I</u> . <i>Hijnen y cols (2005) Protein Expr Purif 41(1): 106-112.</i>	PCR
pET-D-new	5'ATTGGATCCTTAGCCGCCGCGTC GCCGGTGAA 3'	Hibrida en la región 3' del gen <i>prnA</i> . Contiene el sitio <u>BamH I</u> y el codón TAA como señal de terminación de la traducción. <i>Hijnen y cols (2005) Protein Expr Purif 41(1): 106-112.</i>	PCR
1	5'TCGCTGTAAAAGGACAATTACAA ACAGGAATCGAATGCAACCGGCGC AGGAACACTG 3'	ONC anti sentido. Hibrida en la región 6369-6426 o 6384-6441 de pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2 respectivamente, en el gen que confiere resistencia a Kanamicina.	PCR
2	5'GGAGCCCGATACGTCCACGCCAT ACCAGCC 3'	ONC sentido. Hibrida en la región 1431-1460 de pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2, en los genes <i>prnA(1)</i> o <i>prnA(2)</i> , respectivamente.	PCR
3	5'GTTGTCCGTCATGACCCAGGTGG CGTTGTCGATGGAGCCCGATACGTC CACGCCATACCAGCC 3'	ONC sentido 2, fusionado a <u>secuencia codificante para IDNATWVMTDN</u>	PCR
4	5'GTTGTCCGTCATGACCCAGGTGG CGTTGTCGATGTTGTCCGTCATGAC CCAGGTGGCGTTGTCGATGGAGCCC GATACGTCCACGCCATACCAGCC 3'	ONC sentido 2, fusionado a <u>secuencia codificante para IDNATWVMTDNIDNATWVMTDN</u>	PCR
5	5' P - CGCGTATTCGTCTCGCTCAGGCGC AATC 3'	ONC sentido. Fosforilado en su extremo 5' . Hibrida en la región 6428-6456 o 6443-6471 de pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2, respectivamente; en el gen que confiere resistencia a Kanamicina.	PCR
6	5' P -	ONC anti sentido. Fosforilado en su	PCR

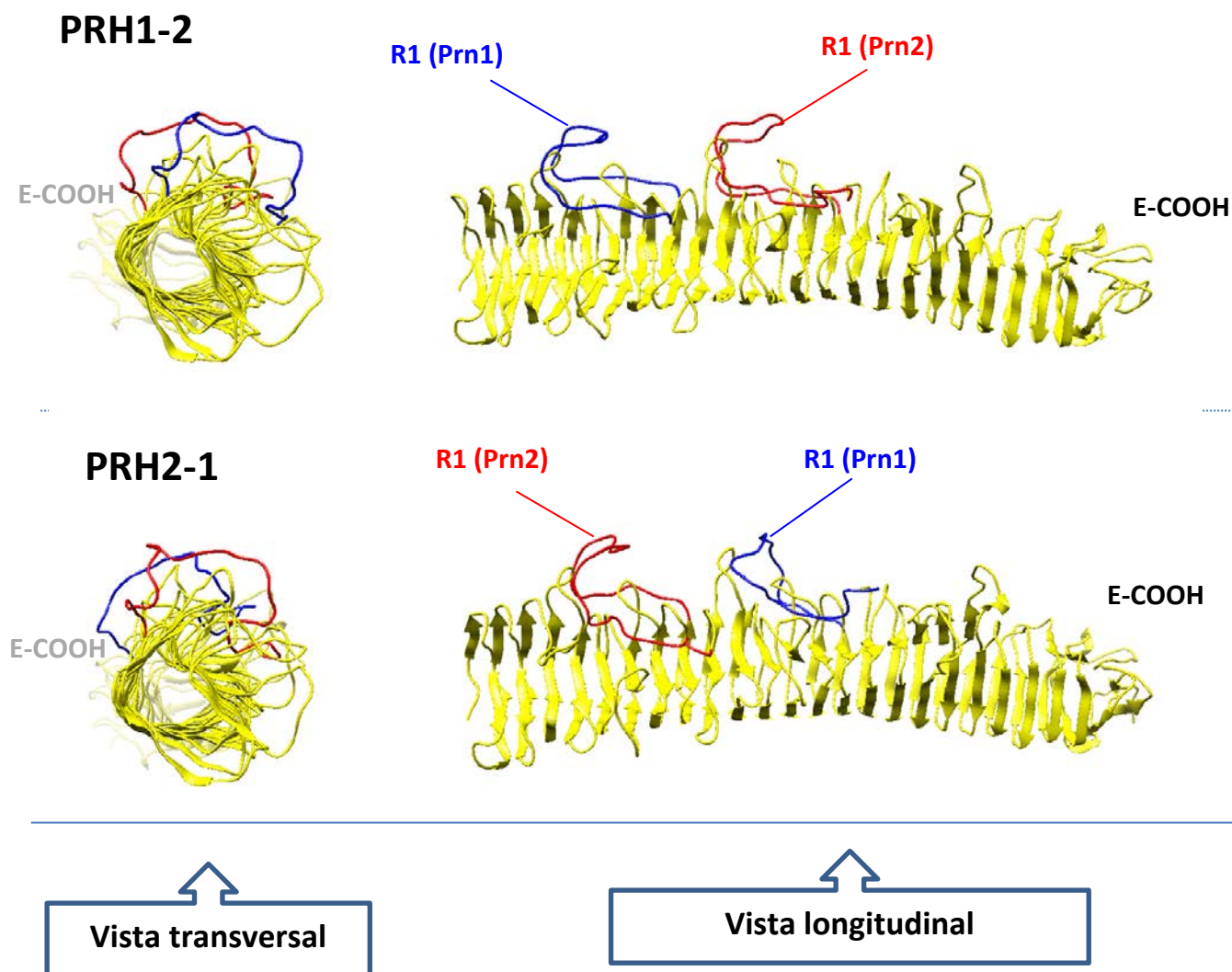
	GTCAAGGCCGGCAAGCTGGTCGC 3'	extremo 5'. Hibrida en la región 1975-1997 o 1990-2012 de pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2, en los genes <i>prnA(1)</i> o <i>prnA(2)</i> , respectivamente.	
AC1	5'CGCGCTCTATGTGGC 3'	Hibrida en la región 1909-1923 o 1924-1938 (cadena complementaria) del vector pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2, respectivamente.	SAUT
AC2	5'GCCACATAGAGCGCG 3'	Hibrida en la región 1909-1923 o 1924-1938 (cadena directa) del vector pET28a-Prn1.	SAUT
BC1	5'GGGCTCCAGCGTGG 3'	Hibrida en la región 1424-1437 (cadena complementaria) del vector pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2, respectivamente.	SAUT
BC2	5'CCACGCTGGAGCCC 3'	Hibrida en la región 1424-1437 (cadena directa) del vector pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2.	SAUT
CC1	5'GAACGTCGGTGCGC 3'	Hibrida en la región 989-1002 (cadena complementaria) del vector pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2.	SAUT
CC2	5'GCGCACCGACGTTC 3'	Hibrida en la región 989-1002 (cadena directa) del vector pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2.	SAUT
DC1	5'GGGAGTTGTCCGCC 3'	Hibrida en la región 516-529 (cadena complementaria) del vector pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2.	SAUT
DC2	5'GGCGGACAACTCCC 3'	Hibrida en la región 516-529 (cadena directa) del vector pET28a-Prn1 o pET28a-Prn2.	SAUT

ANEXO 3. Vector comercial y construcciones genéticas utilizadas en el presente trabajo.

Plásmido	Descripción y Referencia
Vector comercial pET28a(+)	Vector de 5369 pb y origen de replicación ColE1. Contiene un gen codificador para una enzima que confiere la resistencia a kanamicina. La región de clonaje y expresión está configurada por los siguientes elementos: promotor T7, operador lac, sitio de unión al ribosoma, secuencia de 6 His consecutivas para fusionar al amino terminal, señal de corte para trombina, secuencia T7, multiligador, secuencia de 6 His consecutivas para fusionar al carboxilo terminal y terminador T7. Boletín técnico TB074 12/98, Novagen, EE.UU.
pET28a- <i>prn1</i>	Vector de 7370 pb. Contiene el gen <i>prn(A)1</i> (2037 pb). Vector para la expresión del gen codificante para la proteína Prn1.
pET28a- <i>prn2</i>	Vector de 7385 pb. Contiene el gen <i>prn(A)2</i> (2052 pb). Vector para la expresión del gen codificante para la proteína Prn2.
pET28a- <i>prh1-2</i>	Vector de 7952 pb. Contiene el gen híbrido <i>prh1-2</i> (2619 pb). Vector para la expresión del gen codificante para la proteína híbrida PRH1-2.
pET28a- <i>prh1-cc-2</i>	Vector de 7979 pb. Contiene el gen híbrido <i>prh1-cc-2</i> (2646 pb). Vector para la expresión del gen codificante para la proteína híbrida PRH1-CC-2.
pET28a- <i>prh1-cl-2</i>	Vector de 8012 pb. Contiene el gen híbrido <i>prh1-cl-2</i> (2679 pb). Vector para la expresión del gen codificante para la proteína híbrida PRH1-CL-2.
pET28a- <i>prh2-1</i>	Vector de 7946 pb. Contiene el gen híbrido <i>prh2-1</i> (2613 pb). Vector para la expresión del gen codificante para la proteína híbrida PRH2-1.
pET28a- <i>prh2-cc-1</i>	Vector de 7979 pb. Contiene el gen híbrido <i>prh2-cc-1</i> (2646 pb). Vector para la expresión del gen codificante para la proteína híbrida PRH2-CC-1.
pET28a- <i>prh2-cl-1</i>	Vector de 8012 pb. Contiene el gen híbrido <i>prh2-cl-1</i> (2679 pb). Vector para la expresión del gen codificante para la proteína híbrida PRH2-CL-1.

Anexo 4. Modelos obtenidos para las proteínas híbridas PRH1-2 y PRH2-1 y su evaluación según el servidor Prossess.

Representación tridimensional de los modelos de las pertactinas híbridas PRH1-2 y PRH2-1.

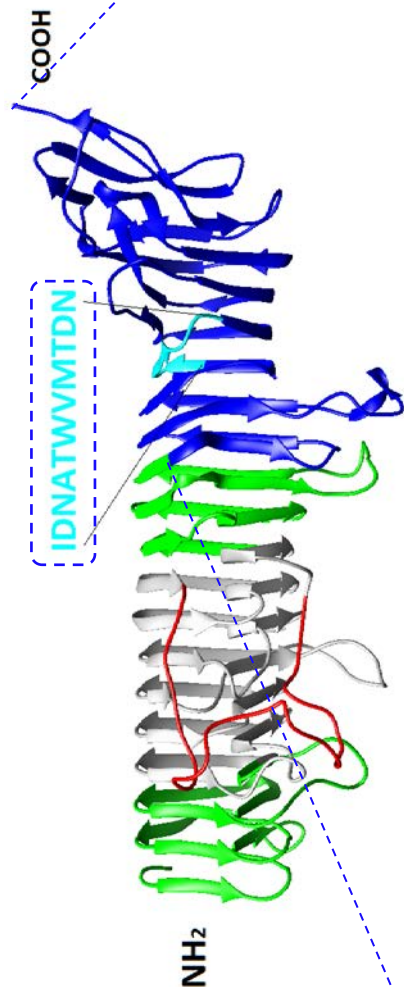


Evaluación de los modelos de PRH1-2 y PRH2-1 en comparación con el modelo cristalográfico 1DAB.pdb.

Parámetros de calidad	Prn1 (1DAB.pdb)	PRH1-2	PRH2-1
Enlaces covalentes	7.5	7.5	7.5
Enlaces no covalentes y empaque	6.5	5.5	5.5
Ángulos de torsión	2.5	1.5	1.5
Total	4.5	3.5	3.5

La puntuación 10 es la de mayor confianza y cero la de menor.

ANEXO 5. Secuencia conservada IDNATWVMTDN presente en la región con funciones en el plegamiento de pertactina.

[illegible]

A) Representación de la estructura tridimensional de pertactina en sección longitudinal. Con azul oscuro se destaca la región involucrada en el plegamiento de P_{rn}, próxima al extremo COOH. Con azul claro se destaca la ubicación de la secuencia conservada IDNATWVMTDN. **B)** Resultado del alineamiento múltiple (Clustal W) realizado a las 13 variantes de la proteína P_{rn} de *Bordetella pertussis* y la pertactina B_{pp} de *Bordetella parapertussis*. Se representa solamente el segmento de la secuencia de la región involucrada en el plegamiento de P_{rn}. Con azul y amarillo se destacan las mutaciones y las regiones conservadas, respectivamente. La secuencia conservada IDNATWVMTDN se enmarca con línea discontinua.

Anexo 6. Secuencia de aminoácidos de las proteínas Prn y PRH deducida a partir de la secuencia nucleotídica obtenida por SAUT.

Prn1

HHHHHHSSGLVPRGSHMDWNNQSIIVKTGERQHGIHIQGS DPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSDDGIR
RFLGTVTVKAGKLVADHATLANVGD TWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSAIVDGG L HIGALQSLQPEDLP
PSRVLRDNTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGG
FGPVL D GWYGV D VSGSSVELAQSI VEAPELGAAIRVGRGARVTVSGGSL SAPHGNVIETGGARRFAPQAAPLSITLQAGAHAQ GKALLYR
VLPEPVKLTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVD SLSIDNATWVMTDNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEA
GRFKVLT VNTLAGSGLFRMNVFADLGLSDKLVVMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTLLLVQTPLGSAATFTLANKDGKVDIGTYRYRLA
ANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAAANA AVNTGGVGLASTLWYAESNALSKRLGELRLNPDAG
GAWGRGFAQRQQLDNRAGRFRDQKVAGFELGADHAVAVAGGRWHLGGLAGYTRGDRGFTGDGGG

Prn2

HHHHHHSSGLVPRGSHMDWNNQSIIVKTGERQHGIHIQGS DPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSDDGIR
RFLGTVTVKAGKLVADHATLANVGD TWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSAIVDGG L HIGALQSLQPEDLP
PSRVLRDNTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGG
FGPGGFGPVL D GWYGV D VSGSSVELAQSI VEAPELGAAIRVGRGARVTVSGGSL SAPHGNVIETGGARRFAPQAAPLSITLQAGAHAQ GK
ALLYRVLPEPVKLTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVD SLSIDNATWVMTDNSNVGALRLASDGSVDFQ
QPAEAGRFKVLT VNTLAGSGLFRMNVFADLGLSDKLVVMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTLLLVQTPLGSAATFTLANKDGKVDIGTY
RYRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAAANA AVNTGGVGLASTLWYAESNALSKRLGELRL
NPDAGGAWGRGFAQRQQLDNRAGRFRDQKVAGFELGADHAVAVAGGRWHLGGLAGYTRGDRGFTGDGGG

PRH1-2

HHHHHHSSGLVPRGSHMDWNNQSIIVKTGERQHGIHIQGS DPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSDDGIR
RFLGTVTVKAGKLVADHATLANVGD TWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSAIVDGG L HIGALQSLQPEDLP
PSRVLRDNTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGG
FGPVL D GWYGV D VSGSVKAGKLVADHATLANVGD TWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSAIVDGG L HIGAL
QSLQPEDLP PSRVLRDNTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGFG
GPGFGPGGFGPVG D GWYGV D VSGSSVELAQSI VEAPELGAAIRVGRGARVTVSGGSL SAPHGNVIETGGARRFAPQAAPLSITL
QAGAHAQ GKALLYRVLPEPVKLTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVD SLSIDNATWVMTDNSNVGALRL
ASDGSVDFQQPAEAGRFKVLT VNTLAGSGLFRMNVFADLGLSDKLVVMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTLLLVQTPLGSAATFTLANK
DGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAAANA AVNTGGVGLASTLWYAESNAL
SKRLGELRLNPDAGGAWGRGFAQRQQLDNRAGRFRDQKVAGFELGADHAVAVAGGRWHLGGLAGYTRGDRGFTGDGGG

PRH1-CC-2

HHHHHHSSGLVPRGSHMDWNNQSIIVKTGERQHGIHIQGS DPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSDDGIR
RFLGTVTVKAGKLVADHATLANVGD TWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSAIVDGG L HIGALQSLQPEDLP
PSRVLRDNTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGG
FGPVL D GWYGV D VSGSIDNATWVMTDNV KAGKLVADHATLANVGD TWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSA
IVDGG L HIGALQSLQPEDLP PSRVLRDNTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGG
AVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVG D GWYGV D VSGSSVELAQSI VEAPELGAAIRVGRGARVTVSGGSL SAPHGNVIETGGARRF
APQAAPLSITLQAGAHAQ GKALLYRVLPEPVKLTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVD SLSIDNATWV
MTDNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEAGRFKVLT VNTLAGSGLFRMNVFADLGLSDKLVVMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTLLLVQTPL
GSAATFTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAAANA AVNTGGVGLA
STLWYAESNALSKRLGELRLNPDAGGAWGRGFAQRQQLDNRAGRFRDQKVAGFELGADHAVAVAGGRWHLGGLAGYTRGDRGFTGDGGG

PRH1-CL-2

HHHHHHSSGLVPRGSHMDWNNQSIIVKTGERQHGIHIQGS DPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSDDGIR
RFLGTVTVKAGKLVADHATLANVGD TWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSAIVDGG L HIGALQSLQPEDLP
PSRVLRDNTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGG
FGPVL D GWYGV D VSGSIDNATWVMTDNI DNATWVMTDNV KAGKLVADHATLANVGD TWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIE
RGANVTVQRSAIVDGG L HIGALQSLQPEDLP PSRVLRDNTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRA
TIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVG D GWYGV D VSGSSVELAQSI VEAPELGAAIRVGRGARVTVSGGSL SAPHG
NVIETGGARRFAPQAAPLSITLQAGAHAQ GKALLYRVLPEPVKLTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVD
SLSIDNATWVMTDNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEAGRFKVLT VNTLAGSGLFRMNVFADLGLSDKLVVMQDASGQHRLWVRNSGSEPAS
ANTLLLVQTPLGSAATFTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAAAN

AAVNTGGVGLASTLWYAESNALSKRLGELRLNPDAGGAWGRGFAQRQQLDNRAGRFRDQKVAGFELGADHAVAVAGGRWHLGGLAGYTRG
DRGFTGDGGG

PRH2-1

HHHHHHSSGLVPRGSHMDWNNQSIVKTGERQHGIHIQGS DPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSDDGIR
RFLGTVTVKAGKLVADHATLANVGDTWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSAIVDGGHLGALQSLQPEDLP
PSRVVLRDTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGG
FGPGGFGPVLGDWYGV DVS SVKAGKLVADHATLANVGDTWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSAIVDGGHL
HIGALQSLQPEDLPPSRVLRDTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGA
VPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGV DVS GSSVELAQ SIVEAPELGAAIRVGRGARVTVSGGSLSAPHGNVIETGGARRFAPQAAPLSITL
QAGAHAQ GKALLYRVLPEPVKLTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVDLSIDNATWVMTDNSNVGALRL
ASDGSVDFQQPAEAGRKFVLT VNTLAGSGLFRMNVFADLGLSDKL VVMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTLLLVQTPLGSAATFTTLANK
DGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAAANA VNTGGVGLASTLWYAESNAL
SKRLGELRLNPDAGGAWGRGFAQRQQLDNRAGRFRDQKVAGFELGADHAVAVAGGRWHLGGLAGYTRGDRGFTGDGGG

PRH2-CC-1

HHHHHHSSGLVPRGSHMDWNNQSIVKTGERQHGIHIQGS DPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSDDGIR
RFLGTVTVKAGKLVADHATLANVGDTWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSAIVDGGHLGALQSLQPEDLP
PSRVVLRDTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGG
FGPGGFGPVLGDWYGV DVS SIDNATWVMTDNV KAGKLVADHATLANVGDTWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVT
VQRSAIVDGGHLGALQSLQPEDLPPSRVLRDTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGD
APAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGV DVS GSSVELAQ SIVEAPELGAAIRVGRGARVTVSGGSLSAPHGNVIETGGARRF
APQAAPLSITLQAGAHAQ GKALLYRVLPEPVKLTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVDLSIDNATWVMT
DNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEAGRKFVLT VNTLAGSGLFRMNVFADLGLSDKL VVMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTLLLVQTPL
GSAATFTTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAAANA VNTGGVGLA
STLWYAESNALSKRLGELRLNPDAGGAWGRGFAQRQQLDNRAGRFRDQKVAGFELGADHAVAVAGGRWHLGGLAGYTRGDRGFTGDGGG

PRH2-CL-1

HHHHHHSSGLVPRGSHMDWNNQSIVKTGERQHGIHIQGS DPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSDDGIR
RFLGTVTVKAGKLVADHATLANVGDTWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGANVTVQRSAIVDGGHLGALQSLQPEDLP
PSRVVLRDTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDDGGHITGGRAAGVAAMQGA VVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGG
FGPGGFGPVLGDWYGV DVS SIDNATWVMTDNIDNATWVMTDNV KAGKLVADHATLANVGDTWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAG
GVQIERGANVTVQRSAIVDGGHLGALQSLQPEDLPPSRVLRDTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDDGGHITGGRAAGVAAMQGA VV
HLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGV DVS GSSVELAQ SIVEAPELGAAIRVGRGARVTVSGGSLSAPHG
NVIETGGARRFAPQAAPLSITLQAGAHAQ GKALLYRVLPEPVKLTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVD
SLSIDNATWVMTDNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEAGRKFVLT VNTLAGSGLFRMNVFADLGLSDKL VVMQDASGQHRLWVRNSGSEPAS
ANTLLLVQTPLGSAATFTTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAAAN
AAVNTGGVGLASTLWYAESNALSKRLGELRLNPDAGGAWGRGFAQRQQLDNRAGRFRDQKVAGFELGADHAVAVAGGRWHLGGLAGYTRG
DRGFTGDGGG

ANEXO 7. Caracterización de las proteínas Prn y PRH producidas en *Escherichia coli* mediante espectrometría de masas.

Prn	Péptidos secuenciados	m/z exp	m/z teor
Prn1	GSHMDWNNQSIVK extremo amino	1514,72	1514,69
	QHGIHIQGSDPGGVR	1556,81	1556,78
	QAQGILLENPAELQFR	1897,03	1897,01
	NGSVTSSGQLSDDGIR	1592,78	1592,73
	NGSVTSSGQLSDDGIRR	1748,87	1748,83
	FLGTVTVK	863,53	863,51
	SAIVDGGLHIGALQSLQPEDLPPSR	2569,42	2569,35
	DTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTDGGHITGGR	3260,67	3260,66
	AAGVAAMQGAVVHLQR	1577,85	1577,85
	RGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGS SVELAQSSIVEAPELGAAIR	5828,06	5827,92
	VTVSGGSLSAPHGNVIETGGAR	2065,09	2065,06
	FAPQAAPLSITLQAGAHAQGK	2076,15	2076,11
	LTLTGGAQAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQAR	3675,02	3674,94
	AVDSLIDNATWVMTDNSNVGALR	2548,27	2548,22
	LASDGSVDFQQPAEAGR	1746,80	1746,82
	VLTVNTLAGSGLFR	1446,81	1446,82
	MNVFADLGLSDK	1308,65	1308,64
	LVVMQDASGQHR	1339,68	1339,67
	NSGSEPASANTLLLVQTPLGSAATFTLANK	2972,61	2972,55
	LAANGNGQWSLVGAK	1485,76	1485,76
	APPAPKPAPQPGFPQPQPQPQPEAPAPQPPAGR	3389,85	3389,76
	LNPDAGGAWGR	1112,55	1112,54
	VAGFELGADHAVAVAGGR	1695,88	1695,87
	WHLGGLAGYTR	1229,65	1229,63

	GDRGFTGDGGG extremo carboxilo	994,48	994,41
Prn2	GSHMDWNNQSIVK extremo amino	1514,68	1514,69
	QHGIHIQGSDPGGVR	1556,81	1556,78
	QAQGILLENPAAEQFR	1897,02	1897,01
	NGSVTSSGQLSDDGIR	1592,77	1592,73
	NGSVTSSGQLSDDGIRR	1748,87	1748,83
	FLGTVTVK	863,53	863,51
	SAIVDGGLHIGALQSLQPEDLPPSR	2569,42	2569,35
	DTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTDGGHITGGR	3260,71	3260,66
	AAGVAAMQGAVVHLQR	1577,84	1577,85
	RGDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVLGDWYGV DVSGSSVELAQSIVEAPELGAAIR	6277,15	6277,09
	VTVSGGSLSAPHGNVIETGGAR	2065,08	2065,06
	FAPQAAPLSITLQAGAHAQGK	2076,15	2076,11
	LTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQAR	3675,01	3674,94
	AVDSLSDNATWVMTDNSNVGALR	2548,27	2548,22
	LASDGSVDFQQPAEAGR	1746,80	1746,82
	VLTVNTLAGSGLFR	1446,80	1446,82
	MNVFADLGLSDK	1308,65	1308,64
	LVVMQDASGQHR	1339,69	1339,67
	NSGSEPASANTLLLQTPLGSAATFTLANK	2972,61	2972,55
	LAANGNGQWSLVGAK	1485,76	1485,76
	APPAPKPAPQPGPQPPQPPQPEAPAPQPPAGR	3389,85	3389,76
	ELSAAANAAVNTGGVGLASTLWYAESNALS	3035,59	3035,52
	LNPDAGGAWGR	1112,55	1112,54
	VAGFELGADHAVAVAGGR	1695,86	1695,87
	WHLGGLAGYTR	1229,65	1229,63
	GDRGFTGDGGG extremo carboxilo	994,43	994,41

PRH	Péptidos secuenciados	m/z exp	m/z teor
PRH1-2	ALLYR	634,41	634,38
	VDIGTYR	822,46	822,42
	GANVTVQR	843,46	843,46
	FLGTVTVK	863,52	863,51
	LNPDAGGAWGR	1112,57	1112,54
	MNVFADLGLSDK	1308,68	1308,64
	LVVMQDASGQHR	1339,71	1339,67
	VLTVNTLAGSGLFR	1446,86	1446,82
	LAANGNGQWSLVGAK	1485,79	1485,76
	AAGVAAMQGAVVHLQR	1577,88	1577,85
	VAGFELGADHAVAVAGGR	1695,88	1695,87
	LASDGSVDFQQPAEAGR	1746,83	1746,82
	NGSVTSSGQLSDDGIRR	1748,85	1748,83
	QAQGILLENPAELQFR	1896,97	1897,01
	VTVSGGSLSAPHGNVIETGGAR	2065,08	2065,06
	FAPQAAPLSITLQAGAHQK	2076,12	2076,11
	SAIVDGGLHIGALQSLQPEDLPPSR	2569,34	2569,35
	MNVFADLGLSDKLVVMQDASGQHR	2630,28	2630,29
	ELSAAANAAVNTGGVGLASTLWYAESNALS	3035,53	3035,52
	DTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTDGGHITGGR	3260,66	3260,66
	GSHMDWNNQSIVK extremo amino	1514,71	1514,69
	GDRGFTGDGGG extremo carboxilo	994,46	994,41
	GDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDSGS VK (T20)	3965,04	3964,94
PRH1-CC-2	TASGTTIK	777,48	777,42
	VDIGTYR	822,46	822,42
	GANVTVQR	843,47	843,46

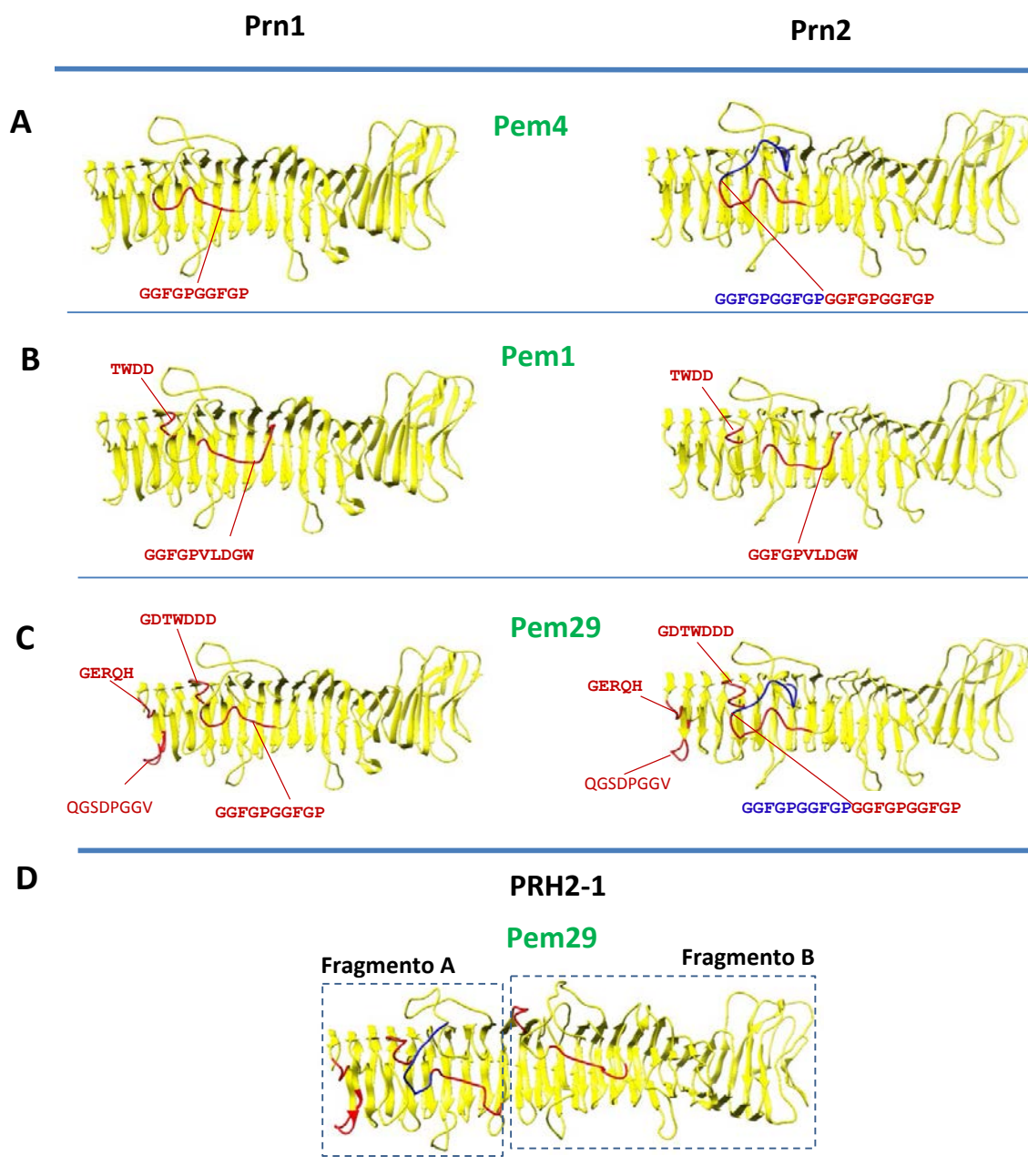
	FLGTVTVK	863,52	863,51
	LNPDAGGAWGR	1112,57	1112,54
	MNVFADLGLSDK	1308,62	1308,64
	LVVMQDASGQHR	1339,67	1339,67
	VLTVNTLAGSGLFR	1446,79	1446,82
	LAANGNGQWSLVGAK	1485,79	1485,76
	AAGVAAMQGAVVHLQR	1577,88	1577,85
	VAGFELGADHAVAVAGGR	1695,88	1695,87
	LASDGSVDFQQPAEAGR	1746,83	1746,82
	NGSVTSSGQLSDDGIRR	1748,85	1748,83
	QAQGILLENPAELQFR	1896,97	1897,01
	VTVSGGSLAPHGNVIETGGAR	2065,08	2065,06
	FAPQAAPLSITLQAGAHAQ GK	2076,12	2076,11
	SAIVDGGGLHIGALQSLQPEDLPPSR	2569,34	2569,35
	DTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTDGGHITGGR	3260,66	3260,66
	LVADHATLANVGDTWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGG VQIER	4881,20	4881,34
	GSHMDWNNQSIVK extremo amino	1514,71	1514,69
	GDRGFTGDGGG extremo carboxilo	994,43	994,41
	GDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDGWYGVDVSGSI DNATWVMTDNVK (T20)	5228,43	5228,75
PRH1-CL-2	VDIGTYR	822,46	822,42
	GANVTVQR	843,46	843,46
	LNPDAGGAWGR	1112,57	1112,54
	LVVMQDASGQHR	1339,74	1339,67
	VLTVNTLAGSGLFR	1446,86	1446,82
	LAANGNGQWSLVGAK	1485,79	1485,76
	AAGVAAMQGAVVHLQR	1577,88	1577,85
	VAGFELGADHAVAVAGGR	1695,88	1695,87
	LASDGSVDFQQPAEAGR	1746,83	1746,82

	NGSVTSSGQLSDDGIRR	1748,85	1748,83
	VTVSGGSLSAPHGNVIETGGAR	2065,08	2065,06
	FAPQAAPLSITLQAGAHAQ GK	2076,14	2076,11
	SAIVDGGLHIGALQSLQPEDLPPSR	2569,34	2569,35
	DTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTDGGHITGGR	3260,66	3260,66
	NSGSEPASANTLLLVQTPLGSAATFTLANKDGK	3272,79	3272,78
	GSHMDWNNQSIVK extremo amino	1514,78	1514,69
	GDRGFTGDGGG extremo carboxilo	994,43	994,41
	GDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDSVSGI DNATWVMTDNIDNATWVMTDNVK (T20)	6489,83	6490,12
PRH2-1	VDIGTYR	822,44	822,42
	GANVTVQR	843,45	843,46
	FLGTVTVK	863,50	863,51
	LNPDAGGAWGR	1112,54	1112,54
	LVVMQDASGQHR	1339,69	1339,67
	VLTVNLAGSGLFR	1446,81	1446,82
	LAANGNGQWSLVGAK	1485,81	1485,76
	AAGVAAMQGAVVHLQR	1577,84	1577,85
	VAGFELGADHAVAVAGGR	1695,84	1695,87
	NGSVTSSGQLSDDGIRR	1748,80	1748,83
	QAQGILLENPAEELQFR	1896,98	1897,01
	VTVSGGSLSAPHGNVIETGGAR	2065,02	2065,06
	FAPQAAPLSITLQAGAHAQ GK	2076,16	2076,11
	SAIVDGGLHIGALQSLQPEDLPPSR	2569,37	2569,35
	GSHMDWNNQSIVK extremo amino	1514,72	1514,69
	GDRGFTGDGGG extremo amino	994,43	994,41
	GDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVLGDWYGV DVSGSVK (T20)	4414,09	4414,11
PRH2-CC-1	VDIGTYR	822,45	822,42
	GANVTVQR	843,48	843,46

	FLGTVTVK	863,53	863,51
	LNPDAGGAWGR	1112,55	1112,54
	LVVMQDASGQHR	1339,69	1339,67
	VLTVNTLAGSGLFR	1446,84	1446,82
	LAANGNGQWSLVGAK	1485,80	1485,76
	AAGVAAMQGAVVHLQR	1577,87	1577,85
	VAGFELGADHAVAVAGGR	1695,89	1695,87
	NGSVTSSGQLSDDGIRR	1748,89	1748,83
	QAQGILLENPAELQFR	1897,01	1897,01
	VTVSGGSLSAPHGNVIETGGAR	2065,05	2065,06
	FAPQAAPLSITLQAGAHAQ GK	2076,19	2076,11
	SAIVDGGHLHIGALQSLQPEDLPPSR	2569,40	2569,35
	DTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTDGGHITGGR	3260,71	3260,66
	GSHMDWNNQSIVK extremo amino	1514,74	1514,69
	GDRGFTGDGGG extremo carboxilo	994,43	994,41
PRH2-CL-1	GDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVLGDWYGV DVSGSIDNATWVMTDNVK (T20)	5676,85	5678,21
	VDIGTYR	822,43	822,42
	GANVTVQR	843,44	843,46
	FLGTVTVK	863,50	863,51
	LNPDAGGAWGR	1112,56	1112,54
	MNVFADLGLSDK	1308,62	1308,64
	LVVMQDASGQHR	1339,61	1339,67
	VLTVNTLAGSGLFR	1446,80	1446,82
	LAANGNGQWSLVGAK	1485,80	1485,76
	AAGVAAMQGAVVHLQR	1577,86	1577,85
	VAGFELGADHAVAVAGGR	1695,87	1695,87
	LASDGSVDFQQPAEAGR	1746,84	1746,82
	NGSVTSSGQLSDDGIRR	1748,84	1748,83

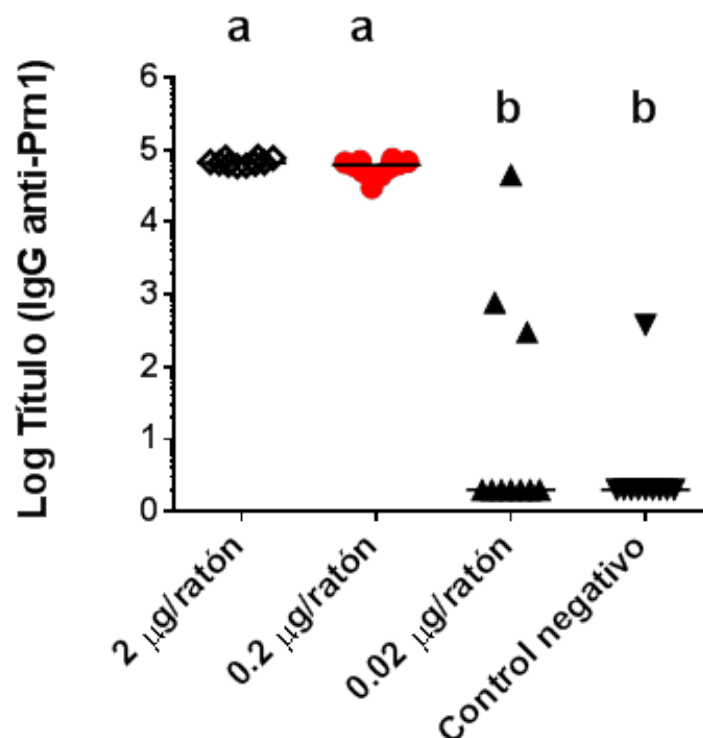
	QAQGILLENPAELQFR	1896,99	1897,01
	VTVSGGSLSAPHGNVIETGGAR	2065,08	2065,06
	FAPQAAPLSITLQAGAHAQGK	2076,13	2076,11
	SAIVDGGHLHIGALQSLQPEDLPPSR	2569,36	2569,35
	MNVFADLGLSDKLVVMQDASGQHR	2630,30	2630,29
	NSGSEPASANTLLLVTPLGSAATFTLANKDGK	3272,69	3272,78
	GSHMDWNNQSIVK extremo amino	1514,72	1514,69
	GDRGFTGDGGG extremo carboxilo	994,42	994,41
	GDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVLGDWYGV DVSGSIDNATWVMTDNIDNATWVMTDNVK (T20)	6939,20	6939,59

ANEXO 8. Motivos de unión de los AcM Pem4, Pem1 y Pem29 presentes en las proteínas Prn1, Prn2 y PRH2-1.



Los motivos de unión de cada uno de los AcM se distinguen en rojo o azul en la representación de la estructura tridimensional de: Prn1, columna izquierda; Prn2, columna derecha; o PRH2-1, abajo en el centro en **D**. **A)** AcM Pem4, reconoce el epitopo lineal **GGFGPGGF** en Prn1, que se duplica en Prn2 **GGFGPGGFPGGFPGGF**. **B)** AcM Pem1, reconoce el epitopo discontinuo, con los motivos de unión **TWDD** y **GGFGPVLGDW** en Prn1 y Prn2. **C)** AcM Pem29, reconoce el epitopo discontinuo, con los motivos de unión **GERQH**, **QGSDPGGV**, **GDTWDDD** y **GGFGPGGF** en Prn1 y en Prn2. **D)** AcM Pem29, reconoce el epitopo discontinuo, con los motivos de unión **GERQH**, **QGSDPGGV**, **GDTWDDD** y **GGFGPGGF** sólo en la región del fragmento A de PRH2-1.

ANEXO 9. Determinación de la dosis mínima inductora de títulos de anticuerpos contra la pertactina natural P.69 (Prn1) purificada de *Bordetella pertussis*.



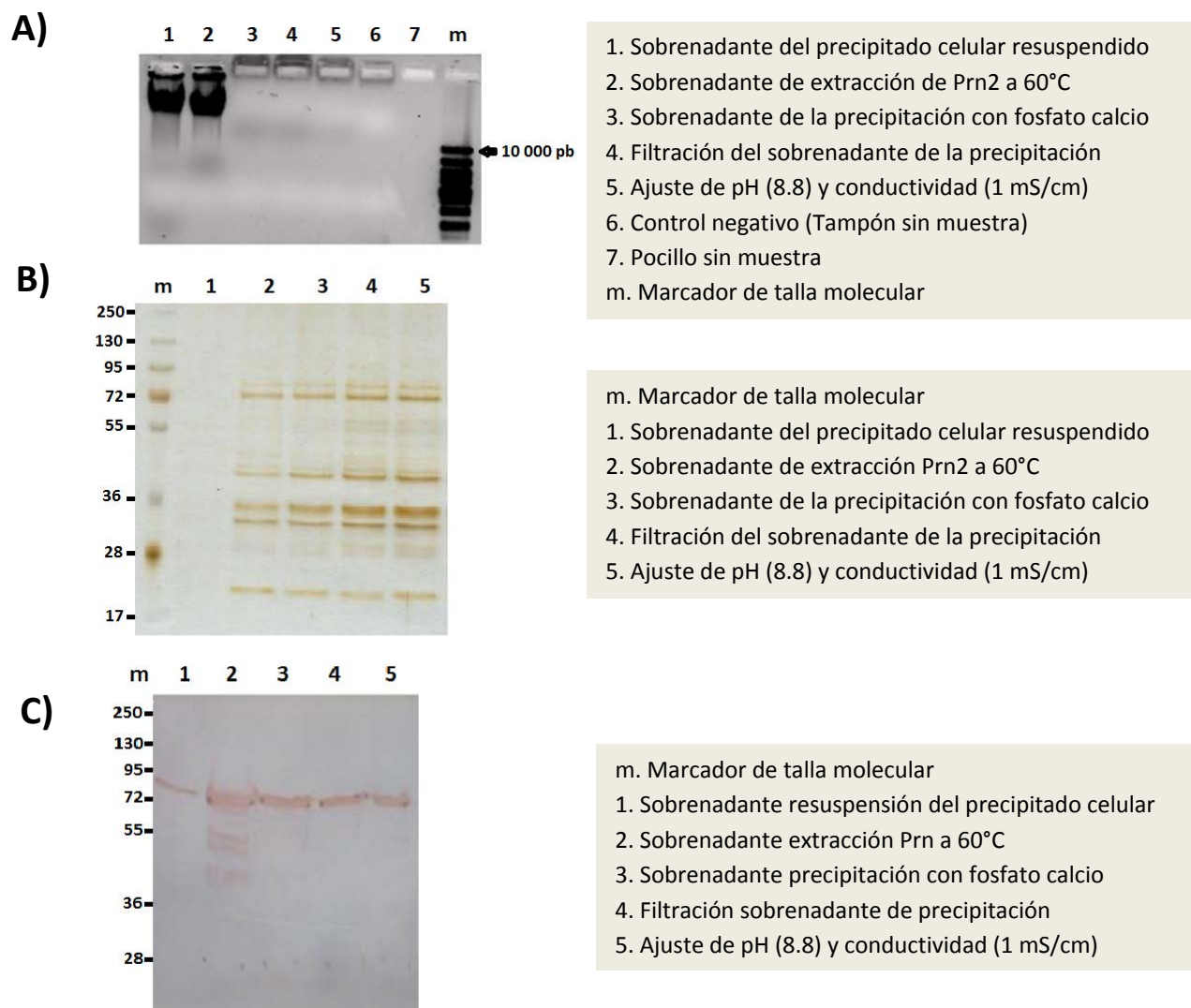
Títulos de anticuerpos contra la variante Prn1 (ELISA). Los sueros evaluados pertenecen al día 42, catorce días posteriores a la tercera administración subcutánea con P.69 (Prn1). Los sueros de cada grupo, N=10, se ensayaron en placas de microtitulación recubiertas con la proteína natural P.69. Se consideró positivo el suero con un título superior a tres veces el valor de título producido por el grupo control negativo. El análisis estadístico entre los grupos de tratamiento se realizó con la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* y las medianas se compararon con la prueba *a posteriori* de *Dunn*. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$), letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,001$). Las líneas continuas representan la mediana de los títulos para un grupo. El ensayo se repitió dos veces. Se muestran los resultados de un experimento típico.

ANEXO 10. Secuencia de ADN del gen *ptxA2* codificante para la subunidad S1 de PTg, deducida a partir de los datos primarios obtenidos por SAUT por ambas cadenas.

En la secuencia, se destacan los tripletes (AAG) y (GGG), introducidos artificialmente, codificadores de los aminoácidos K₉ y G₁₂₉, respectivamente.

ATGCGTTGCACTCGGGCAATTCGCCAAACCGCAAGAACAGGCTGGCTGACGTGGC
TGGCGATTCTTGCCGTCACGGCGCCCGTGACTTCGCCGGCATGGGCCGACGATCC
TCCCGCCACCGTATACAAGTATGACTCCCGCCCGCCGGAGGACGTTTTCCAGAAC
GGATTACGGCGTGGGGAAACAACGACAATGTGCTCGACCATCTGACCGGACGTT
CCTGCCAGGTCGGCAGCAGCAACAGCGCTTTCGTCTCCACCAGCAGCAGCCGGCG
CTATACCGAGGTCTATCTCGAACATCGCATGCAGGAAGCGGTTCGAGGCCGAACGC
GCCGGCAGGGGCACCGGCCACTTCATCGGCTACATCTACGAAGTCCGCGCCGACA
ACAATTTCTACGGCGCCGCCAGCTCGTACTTCGAATACGTCGACACTTATGGCGA
CAATGCCGGCCGTATCCTCGCCGGCGCGCTGGCCACCTACCAGAGCGGGTATCTG
GCACACCGGCGCATTCGCCCCGAAAACATCCGCAGGGTAACGCGGGTCTATCACA
ACGGCATCACCGGCGAGACCACGACCACGGAGTATTCCAACGCTCGCTACGTCAG
CCAGCAGACTCGCGCCAATCCCAACCCCTACACATCGCGAAGGTCCGTAGCGTCG
ATCGTCGGCACATTGGTGCGCATGGCGCCGGTGATAGGCGCTTGTCATGGCGCGGC
AGGCCGAAAGCTCCGAGGCCATGGCAGCCTGGTCCGAACGCGCCGGCGAGGCGAT
GGTTCTCGTGTACTACGAAAGCATCGCGTATTTCGTTCTAG

ANEXO 12. Extracción de Prn2 y eliminación de ácidos nucleicos contaminantes mediante precipitación con fosfato de calcio.

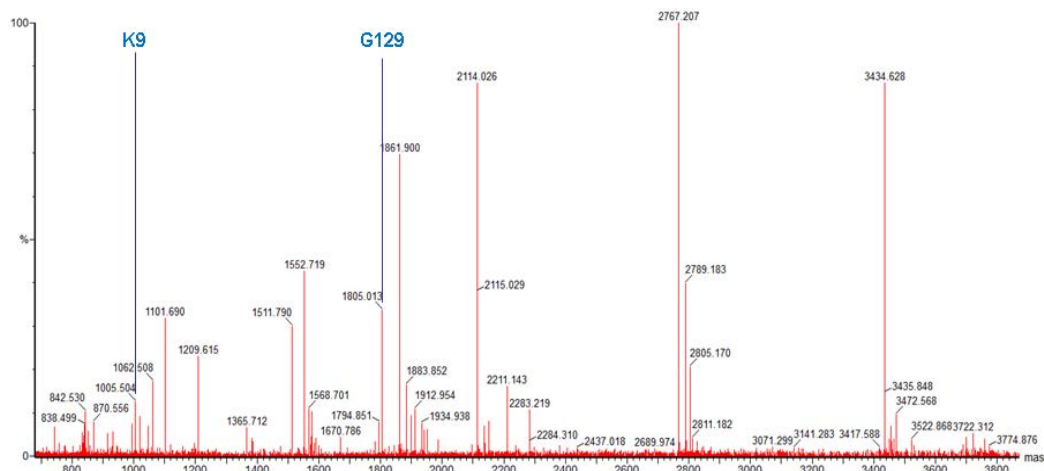


A) El ADN contaminante de alto peso (> 10 kb) se elimina después de añadir fosfato de calcio al sobrenadante de extracción y centrifugar. **B)** En el sobrenadante de extracción se observa una banda reforzada a la altura de 72 kDa, la cual permanece en los pasos de precipitación, filtración y ajuste del pH y la conductividad del sobrenadante para su procesamiento posterior mediante intercambio aniónico (DEAE+). **C)** Reconocimiento específico de Prn2, a la altura de 72 kDa, mediante *Western blotting* con el AcM Pem19 en los diferentes pasos de extracción, precipitación, el ajuste del pH y la conductividad.

ANEXO 13. Verificación de la secuencia de aminoácidos en las proteínas purificadas PTg, Prn2 y FHA mediante espectrometría de masas.

La aplicación de la estrategia de PMF ("Peptide Mass Fingerprint") permitió la identificación de la proteína PTg de *Bordetella pertusis* con un 96 % de cobertura.

A)



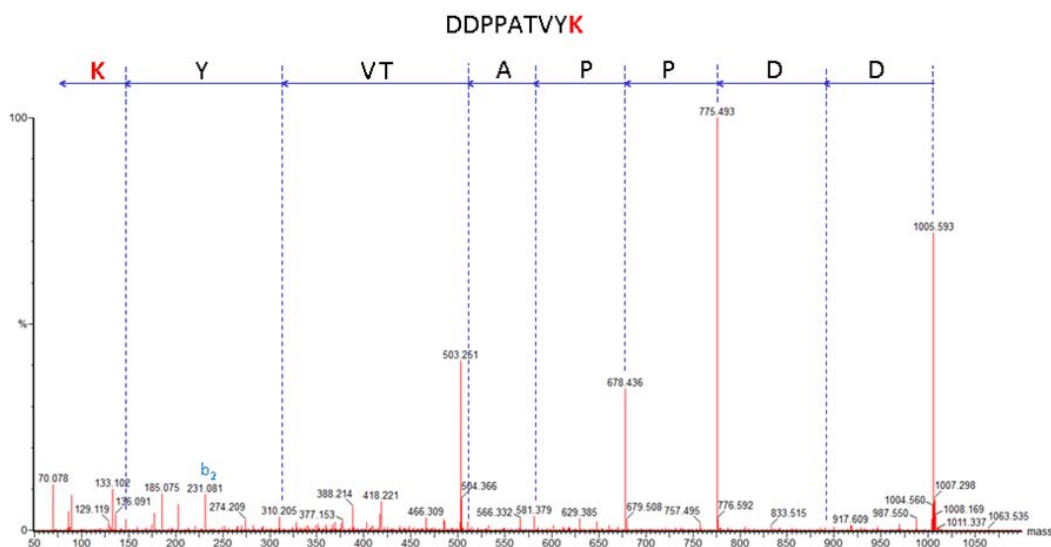
K9: señal correspondiente al péptido: ¹DDPPATVYK⁹

G129: señal correspondiente al péptido: ¹¹⁸ILAGALATVQSGYLAHR¹³⁴

Espectro de masas de la digestión triptica de la banda correspondiente a la subunidad s1 del toxoide PTg de la cepa *Bordetella pertusis* BPCNIC0311. K9 (m/z 1005,504) y G129 (m/z 1805,013) indican las señales correspondientes a los péptidos que contienen las mutaciones K9 y G129, respectivamente.

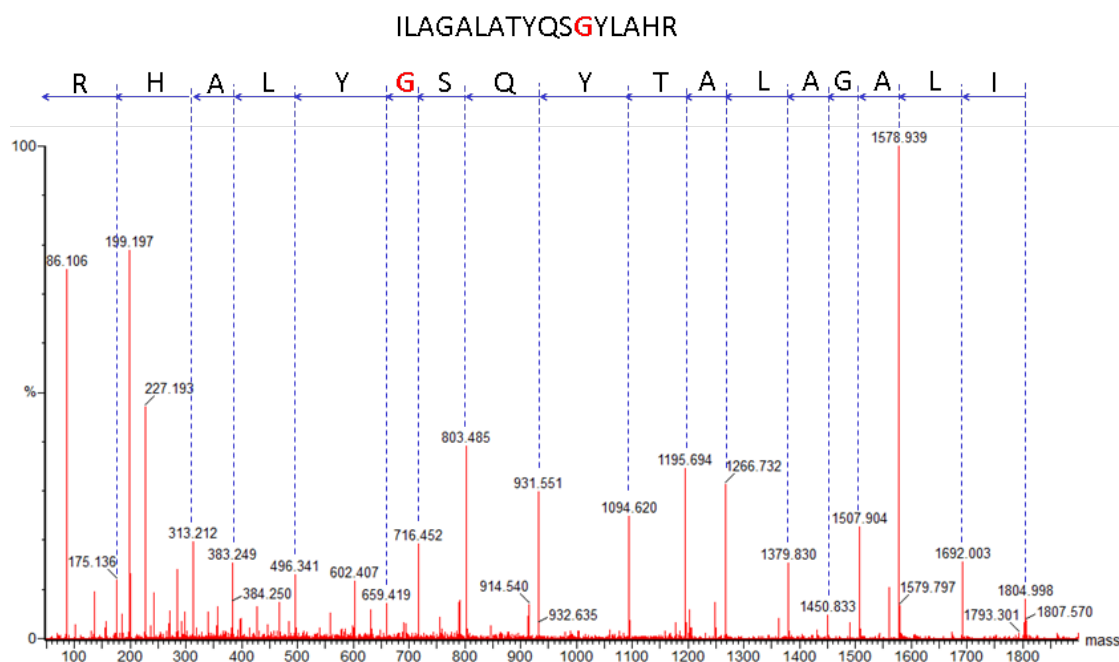
Las señales correspondientes a los péptidos que contienen las mutaciones se fragmentaron para obtener información de secuencia. La figura B y C muestra los espectros MS/MS que permiten la confirmación de ambas mutaciones.

B)



Espectro MS/MS de la señal K9. En rojo el residuo K9 que constituye la mutación.

c)



Espectro MS/MS de la señal G₁₂₉. En rojo el residuo G₁₂₉ que constituye la mutación.

A continuación, en rojo, se muestra la cobertura alcanzada en la secuenciación de subunidad uno de PTg (96 %).

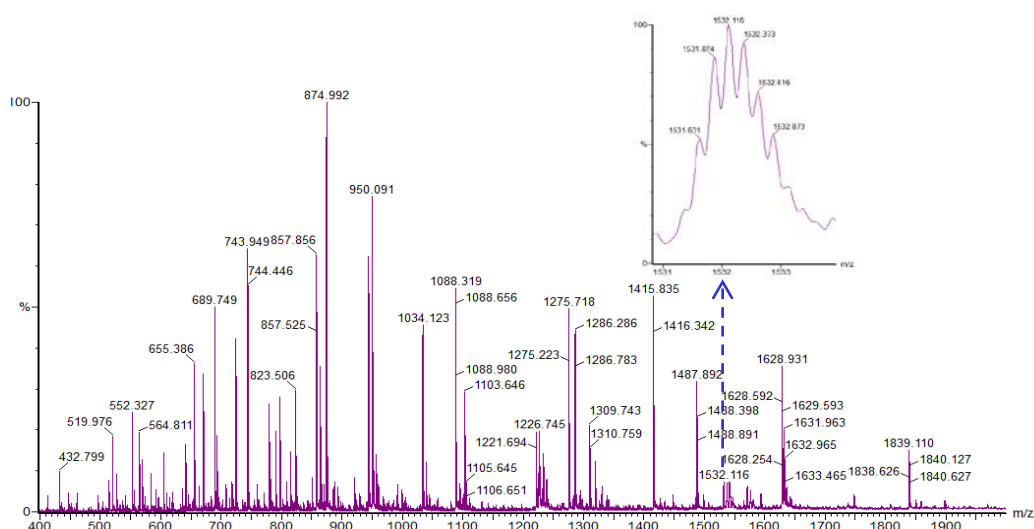
DDPPATVYKYDSRPPEDVFQNGFTAWGNNDNVLDHLTGRSCQVGSSNSAFVSTSSRRYTEVYLEHRM
QEAVEAERAGRGTGHFIGYIYEVNRADNNFYGAASSYFEYVDITYGDNAGRILAGALATYQSGYLAHRRI
PPENIRRVTRVYHNGITGETTTTEYSNARYVSQQTRANPNPYTSRRSVASIVGTLVRMAPVIGACMAR
QAESEAMAASERAGEAMVLVYYESIAYSF

En la siguiente tabla se muestran los péptidos secuenciados pertenecientes a la subunidad S1 de la proteína PTg.

Proteína	Péptidos secuenciados	m/z exp
PTg (S1)	DDPPATVYK	1004,50
	YDSRPPEDVFQNGFTAWGNNDNVLDHLTGR	3433,65
	SCQVGSSNSAFVSTSSSR	1860,87
	RYTEVYLEHR	1374,60
	MQEAVEAER	1061,50
	GTGHFIGYIYEVNR	1510,77
	ADNNFYGAASSYFEYVDITYGDNAGR	2766,21
	ILAGALATYQSGYLAHR	1803,99
	IPPENIRRV	993,58
	VYHNGITGETTTTEYSNAR	2113,01
	YVSQQTR	880,49
	YVSQQTRANPNPYTSR	1881,92
	ANPNPYTSR	1018,50
	SVASIVGTLVR	1100,67
	MAPVIGACMARQAESEAMAASER	2772,46
	QAESEAMAASER	1551,70
	AGEAMVLVYYESIAYSF	1911,94

La aplicación de la estrategia de PMF ("Peptide Mass Fingerprint") permitió la identificación de la proteína Prn2 madura de *Bordetella pertusis* con un 60% de cobertura. La figura D muestra el espectro de masas de la digestión trípica de la banda correspondiente a la proteína Prn2.

D)

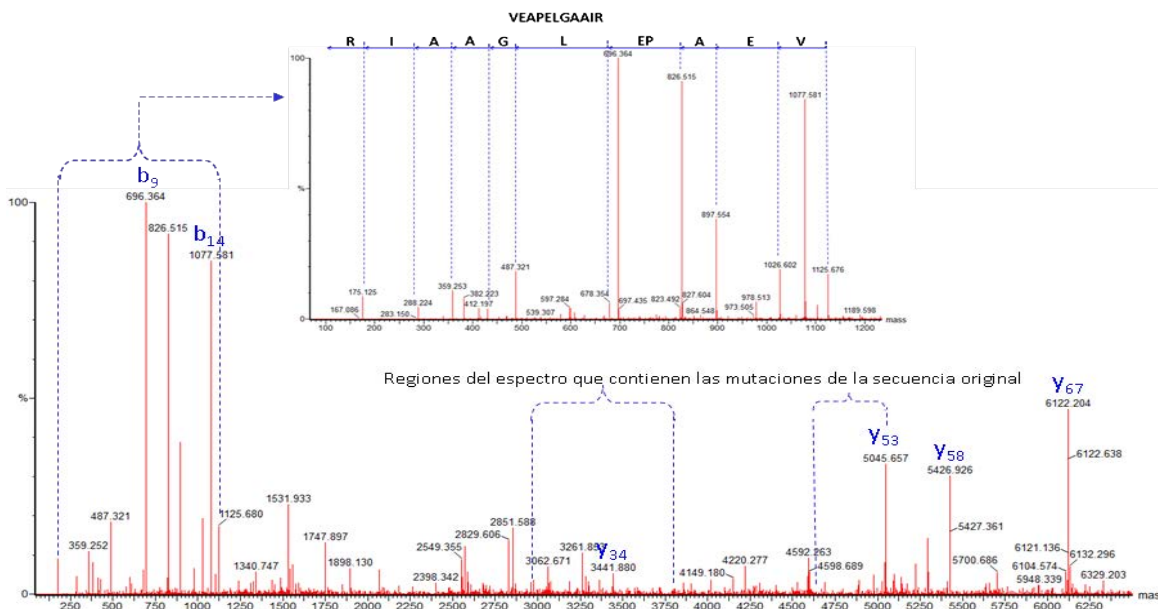


Espectro de masas de la digestión trípica de la banda correspondiente a la proteína Prn2.

La zona ampliada muestra la señal m/z 1532,12, la cual corresponde al péptido
GDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPVLDCGWYGVDVSGSSVELAQSI~~VEAPELGA~~AIR.

La señal m/z 1532,12 correspondiente al péptido de Prn2, que contiene las seis secuencias GGXXP repetidas en tándem, se fragmentó para obtener información de la secuencia. En la figura E se muestra una región ampliada que corrobora la identidad de dicho péptido por secuenciación del extremo C-terminal.

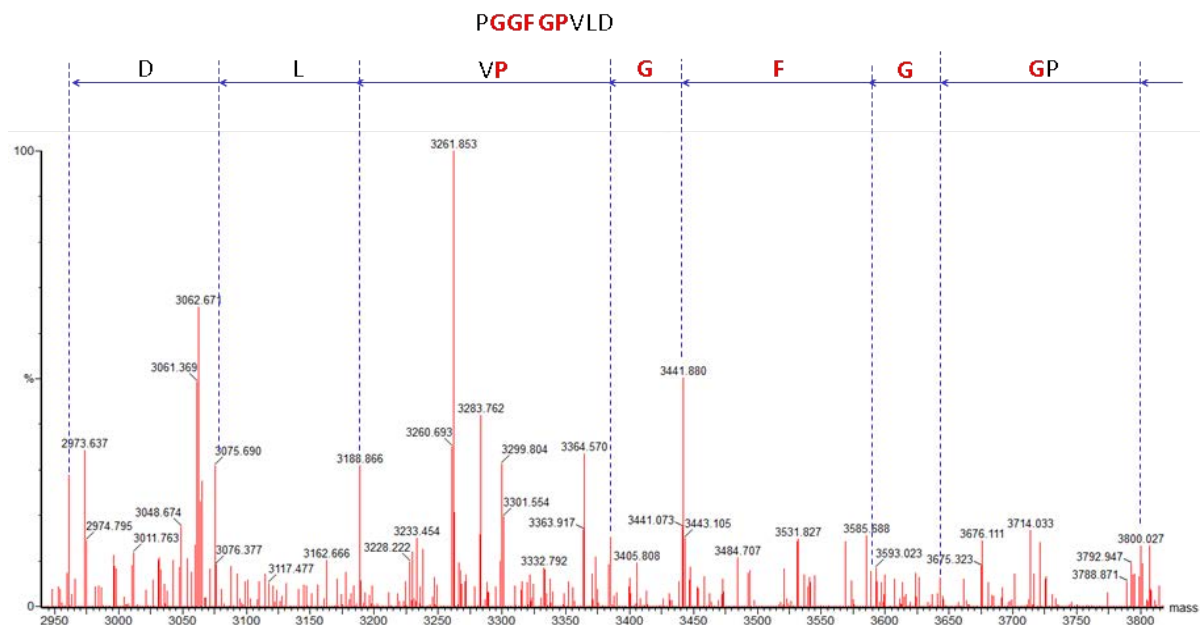
E)



Espectro MS/MS de la señal m/z 1532,12. La región ampliada corrobora la secuencia C-terminal del péptido trípico correspondiente a dicha señal.

Las mutaciones introducidas en la proteína Prn2 en comparación con Prn1 se ubican hacia el extremo amino del péptido correspondiente a la señal m/z 1532,12. Las figuras F y G muestran las zonas ampliadas del espectro MS/MS que permite la confirmación de ambas mutaciones realizadas en la secuencia original.

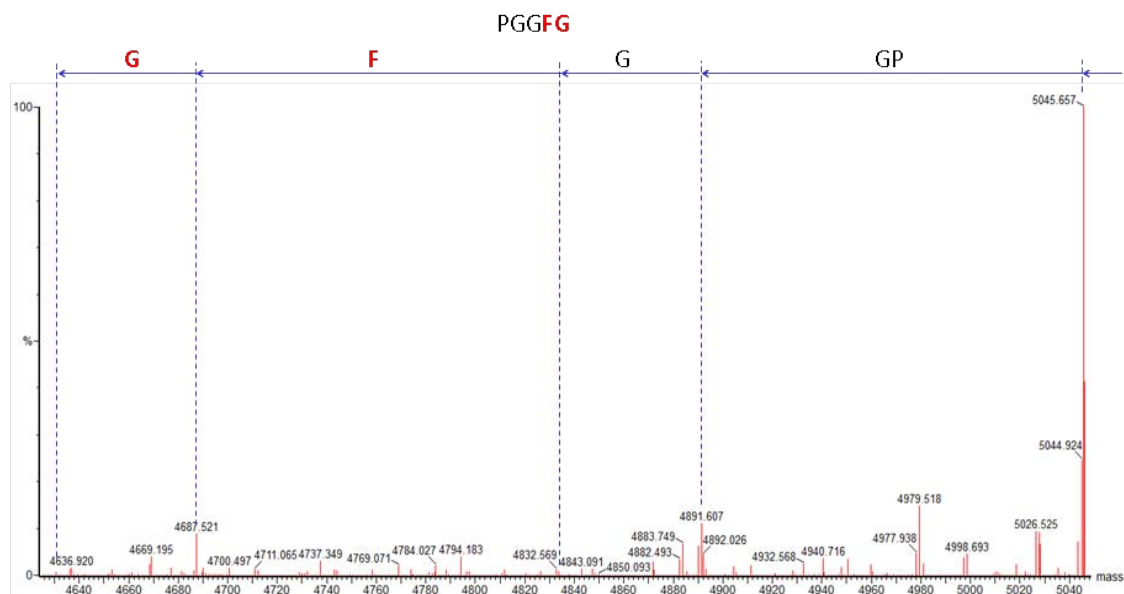
F)



Péptido correspondiente a la señal m/z 1532,12

GDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPGGFGPVLDGWYGVDSGSSVELAQSSIVEAPELGAIR.

G)



Péptido correspondiente a la señal m/z 1532,12

GDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPGGFGPVLDGWYGVDSGSSVELAQSSIVEAPELGAIR.

A continuación, en rojo, se muestra la cobertura alcanzada en la secuenciación de la proteína Prn2 (60 %).

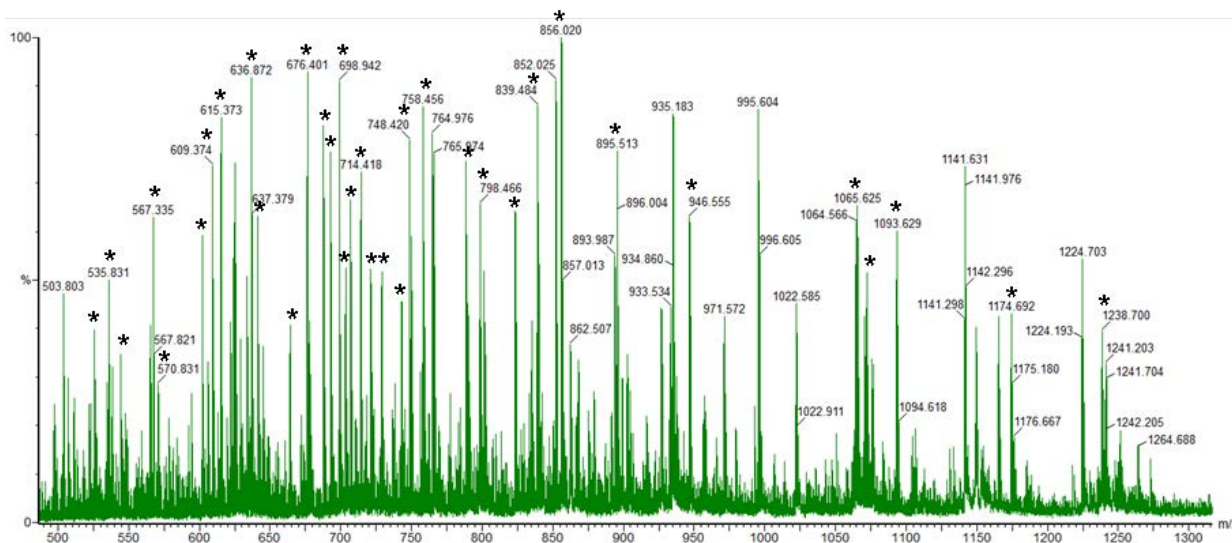
DWNNQSIIVKTGERQHGIHIQGS DPGGVRTASGTTIKVSGRQAQ GILLENPAAELQFRNGSVTSSGQLS
DDGIRRFLGT VTVKAGKLVADHATLANVGDTWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIERGAN
VTVQRS AIVDGG L HIGALQSLQPEDLPPSRV VLRDTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDGGHITGG
RAAGVAAMQGA VVHLQRA TIRRGDAPAGGAVP GGAVP GGFGP GGFGP GGFGP GGFGP VLDGWYGV DVS
GSSVELAQSI VEAPELGAAIRVGRGAR VTVSGGSL SAPHGNVIETGGARRFAPQAAPLSITLQAGAHA
QGKALLYRVLPEPVKLTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVDLSLSIDN
ATWVMTDNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEAGR FKVLT VNTLAGSGLFRMN VFADLGLSDKLVVMQDAS
GQHRLWVRNSGSEPASANTLLL VQTPLGSAATFTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLVGAKAPP
APKPAPQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAAANA AVNTGGVGLASTLWYAESNALS KRLGELR
LNPDAGGAWGRGFAQRQQLDNRAGR RFDQKVAGFELGADHAVAVAGGRWHLGGLAGYTRGDRGFTGDG
GG

En la siguiente tabla se muestran los péptidos secuenciados pertenecientes a la proteína Prn2.

Proteína	Péptidos secuenciados	m/z exp
Prn2	QHGIHIQGS DPGGV	1556,8827
	QAQGILLENPAAELQFR	1897,1327
	NGSVTSSGQLSDDGIR	1591,8527
	NGSVTSSGQLSDDGIRR	1747,9927
	FLGT VTVK	863,5727
	LVADHATLANVGDTWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQGAGGVQIER	4881,5727
	SAIVDGG L HIGALQSLQPEDLPPSR	2569,5127
	DTNVTAVPASGAPAAVSVLGASELTLDGGHITGGR	3260,8427
	AAGVAAMQGA VVHLQRA	1577,9427
	VTVSGGSL SAPHGNVIETGGAR	2065,1827
	FAPQAAPLSITLQAGAHAQGK	2076,2427
	LTLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQAR	3675,1927
	AVDLSLSIDNATWVMTDNSNVGALR	2548,3827
	LASDGSVDFQQPAEAGR	1746,9127
	VLT VNTLAGSGLFR	1446,9127
	MNVFADLGLSDK	1308,7227
	LVVMQDASGQHR	1339,7527
	NSGSEPASANTLLL VQTPLGSAATFTLANK	2972,7327
	VDIGTYR	822,4827
	LAANGNGQWSLVGAK	1484,8827

En la figura H se muestra el espectro de masas de la digestión triptica de la proteína hemaglutinina filamentososa. La aplicación de la estrategia de PMF (“Peptide Mass Fingerprint”) permitió la identificación de la proteína FHA madura de *Bordetella pertussis* con un 68% de cobertura.

H)



Espectro de masas de la digestión triptica de la banda correspondiente a la proteína FHA. Los asteriscos indican las señales m/z de los péptidos fragmentados para obtener información de la secuencia.

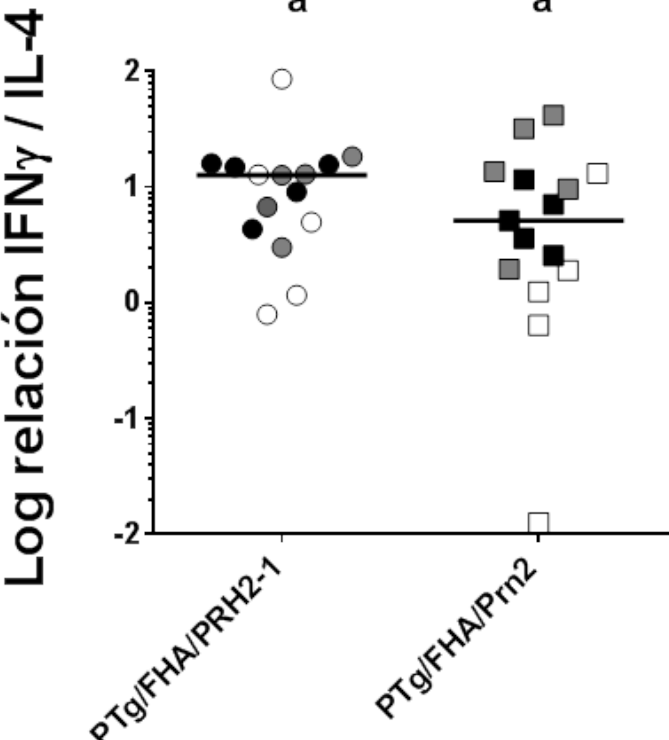
En la siguiente tabla se muestran las secuencias de la proteína FHA obtenidas a partir del análisis de los espectros correspondientes a la fragmentación de las señales más intensas.

Proteína	Péptidos secuenciados	m/z exp
FHA	LAGTLEVY GK	525,83
	QLDLGAVQAR	535,84
	QAVQLGAASSR	544,33
	VSVQSVNSASR	567,33
	ALGHSQLMQR	570,83
	IDTGSGVIGALK	609,38
	QLVSSAQLEVR	615,37
	LVSDAGADLQAGR	636,88
	GQVDLHDLAAR	641,38
	QDFFTPGSVVVR	676,4
	VSSDGQAALGSLAAK	687,91
	LASGGGAVNVAGGGAVK	692,93
	TPLPVSLTALDNR	698,94
	QADQATIDAETDK	703,38
	AAEAIVHDGVMATK	706,91
	HITLVSSDSGLGVR	720,94
	VTAAATSGGGLHVSSGR	728,94
	HDLTVTASGQADNR	742,92
	MAVQAVEAYGEATR	748,42

IASASSVGNLAVQGGGK	758,46
EVDGIIQEFAADLR	788,47
GGVNATGLGYFDVVAR	798,47
QASAILAEVTDTSRPSR	823,48
SMTLGIVDTTGDLQAR	839,49
IGAAQTSADGAAGPALAR	856,02
LSVDVASWDNAGSLDIK	895,52
VPVUNIADPNSSGGVSHNK	602,36
EAATIVAASVSNPGTFTAGK	946,56
DLVVDQDHILPVAEGTLR	664,4
DVAAAADLALQAGDALQAGFLK	1064,61
QIDVVDGRPQITDAVTGEAR	714,42
GAVTVSGGGAVNLGDVQSDGQVR	1072,14
GAIGVQGGAEVSVANANSDAELR	1093,12
QGVLEVGGALTNEFLVGS DGTQR	1174,18
SGIGLEGWGA VGADSLGSDGAISVSGR	1238,21

A continuación, en rojo, se muestra la cobertura alcanzada en la secuenciación de la proteína FHA (68 %), en la cual se incluyen los péptidos secuenciados de la tabla anterior y los identificados por PMF.

QGLVPQGGQTQVLQGGNKVPVUNIADPNSSGGVSHNKFFQFNVANPVGVFNNGLTDGVSRI GGALTKNPNLTRQASAILAEVTDTSRPSRLAGT
LEVYKKGADLI IANPNGISVNGSLTLNASNLTLTTGRPSVNGGRI GLDVQGGT VTI ERGGVNATGLGYFDVVARLVKLQGA VSSKQKGPLA
DIAVVAGANRYDHATRRATPIAAGARGAAAGAY AIDGTAAGAMYKGHITLVSSDSGLGVRQLGSLSSPSAITVSSQGEIALGDATVQRGPL
SLKGAGVVSAGKLASGGGAVNVAGGGAVKIASASSVGNLAVQGGGKVQATLLNAGGTLLVSGRQAVQLGAASSRQALSVNAGGALKADKLS
ATTRVDVDGKQAVALGSASSNALSVRAGGALKAGKLSATGRLDVDGKQAVTLGVSASDGALSVSAGGNLRKQLVSSAQLEVRGQREVALD
DASSARGMTVVAAGALAARNLQSKGAIGVQGGAEVSVANANSDAELRVRRGQVDLHDLAARGADISGEGRVNI GRARSDSDVKVSAHGA
LSIDSMTALGAIGVQAGGSVSAKDMRSRGAVTVSGGGAVNLGDVQSDGQVRATSAGAMTVRDVAAAADLALQAGDALQAGFLKSAGAMTVN
GRDAVRLDGAHAGGQLRVSSDGQAALGSLAAGELTVSAAARAATVAELKSLDNISVTGGERVSVQSVNSASRV AISAHGALDVGKVSASG
IGLEGWGA VGADSLGSDGAISVSGRDAVRVDQARS LADISLGAEGGATLGAVEAAGSIDVRGGSTVAANSLHANRDVRVSGKDAVRVTAAT
SGGGLHVSSGRQLDLGAVQARGALALDGGAGVALQSAKASGTLHVQGGEHLDLGLTAAVGAVDVNGTGDVRVAKLVSDAGADLQAGRSMTL
GIVDTTGDLQARAQQKLELGSVKSDGGLQAAAGGALS LAAAEVAGALELSGQGVTVDRASASRARIDSTGSVGIGALKAGAVEAASPRRAR
RALRQDFFTPGSSVVRAQGNVTVGRGDPHQGVLAQGD IIMDAKGGTLLLRNDALTENGTVTISADSAVLEHSTIESKISQSVLAAKGDKGK
PAVSVKVAKKLFLNGLTLRAVNDNNETMSGRQIDVVDGRPQITDAVTGEARKDES VVSDAALVADGGPIVVEAGELVSHAGGIGNGRNKENG
ASVTVRTTGNLVNKGYISAGKQGVLEVGGALTNEFLVGS DGTQR IEAQRIENRGTFQS QAPAGTAGALVVKAAEAI VHDGVMATKGEMQIA
GKGGGSPTVTAGAKATTSANKLSVDVASWDNAGSLDIKKGGAQVTVAGRYAEHGEVSIQGDYTVSADAI ALAAQVTRQGGAA NLTSRHDTR
FSNKIRLMGPLQVNAGGAVSNTGNLKVREGVTVTAASFNETGA EVMASATLTTS GAARNAGKMVKEAATIVAASVSNPGTFTAGKDIT
VTSRGGFDNEGKMESNKDIVIKTEQFSNGRVLDAKHDLTVTASGQADNRGSLKAGHDFTVQAQRIDNSGTMAAGHDATL KAPHLRNTGQVV
AGHDIHIINS AKLENTGRVDARNDIALDVADFTNTGSLYAEHDATLTLAQGTQRDLVVDQDHILPVAEGTLRVKAKSLTTEIETGNPGSLI
AEVQENIDNKQAI VVGKDLTLSSAHGNVANEANALLWAAGELTVKAQNI TNKRAALIEAGGNARLTA AVALLNKLGRIRAGEDMHLDA PRI
ENTAKLSGEVQRKGQVDVGGGEHGRWSGIGYVNYWLRAGNGKKAGTIAAPWYGGDLTAEQSLIEVGKDLYLNAGARKDEHRHLLNEGVIQA
GGHGHIGGDVDNRSVVRTVSAMEYFKTPLPVSLTALDNRAGLSPATWNFQSTYELLDYLLDQNRYEYIWGLYPTYTEWSVNTLKNLDLGYQ
AKPAPTAPMPKAP ELDLRGHTLES AEGRKIFGEYKKLQGEYKAKMAVQAVEAYGEATRRVHDQLGQRYGKALGMDAETKEVDGI IQEF
AADLRTVYAKQADQATIDAETDKVAQRYKSDIDAVRLQAIQPGRVTLAKALSAALGADWRALGHSQLMQRWKDFKAGKRGA EIAFY PKEQT
V



Los ratones se inmunizaron con las preparaciones vacunales PTg/FHA/PRH2-1 y PTg/FHA/Pn2 adyuvadas con alúmina. Cada punto muestral representa la relación $\text{IFN}\gamma$ / IL-4. Las figuras de color negro, blanco y gris se corresponden con las células estimuladas con PTg, FHA y Pn2 respectivamente. El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica *Mann-Whitney*. Las letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$). Las líneas continuas representan la mediana de cada grupo. La determinación se repitió tres veces. Se muestran los resultados de un experimento típico.