

Desarrollo de vacunas antipertúsicas *via* genómica-proteómica

Celso Pérez-Bolaños, Lourdes Lisbet Proenza-Alfonzo y Rafael Fando-Calzada.

Área de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Bioquímica, Centro Nacional Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Playa, La Habana. celso.perez@cnic.edu.cu

Recibido: 28 de junio de 2012.

Aceptado: 4 de octubre de 2012.

Palabras clave: *Bordetella pertussis*, pertussis, tosferina, vacunología, proteómica.

Key words: *Bordetella pertussis*, pertussis, Whooping cough, vaccinology, proteomics.

RESUMEN. Las vacunas convencionales se basan en la aplicación de diversos métodos bioquímicos, microbiológicos e inmunológicos sobre los agentes causales de las enfermedades. A pesar del éxito alcanzado en el control y prevención vacunal de muchas patologías infecciosas, en otros casos los resultados no han sido fructíferos, de modo que se impone explorar nuevos enfoques y posibilidades. El desarrollo y auge de la biología molecular representa una revolución en el diseño de nuevas vacunas contra una gran variedad de microorganismos patógenos, causantes de enfermedades que afectan al hombre y a los animales. A partir del conocimiento de las secuencias genómicas completas de esos microorganismos, en combinación con nuevas tecnologías avanzadas tales como la bioinformática, los micromatrices de ADN y la proteómica, ha sido posible identificar nuevos antígenos importantes para el desarrollo de nuevos preparados vacunales. La combinación genómica-proteómica ha reportado grandes avances en el descubrimiento de sitios “diana” de vacunas contra bacterias patógenas. La vacuna ideal debe ser patógeno – específica y portadora de antígenos conservados en todas las cepas, de modo que posea una cobertura universal, con el mínimo número de antígenos. Apoyándose en estos conocimientos es posible predecir *a priori* todos los antígenos *in silico*, sin necesidad de crecer el microorganismo *in vitro*. Este nuevo enfoque ha sido aplicado con éxito en la identificación de nuevos antígenos que pueden ser evaluados de manera perspectiva para fines vacunales en *Bordetella pertussis*, lo que evidentemente representa un serio esfuerzo a escala global para enfrentar la resurgencia de la tosferina o pertussis.

ABSTRACT. Conventional vaccines are based on the application of diverse biochemical, microbiological and immunological methods over causal agents of diseases. Despite of success reached in vaccines for controlling and preventing a lot of infectious pathologies, in some other instances the results have not been rather fruitful, so that exploring new approaches and possibilities is imposed. The development and increase of the molecular biology means a revolution for designing new vaccines against a great variety of pathogenic microorganisms causing diseases that affect mankind and animals. From knowledge on whole genome sequences of these microorganisms in combination with new advanced technologies such as bioinformatics, DNA microarrays and proteomics it has been possible to identify new important antigens for the development of new vaccine candidates. The combination genomics – proteomics has rendered great advances in discovering “target” sites of vaccines against pathogenic bacteria. The ideal vaccine must be pathogen – specific, harboring conserved antigens in each strain, therefore having a universal cover, with the minimal number of antigens. Based on that knowledge, all antigens *in silico* may be predicted *a priori*, without growing the microorganism *in vitro*. This new approach has been successfully applied to identifying new antigens in *Bordetella pertussis* as well, which may be evaluated further for vaccine purposes, therefore representing a serious global effort, just to face whooping-cough or pertussis reemergence.

INTRODUCCIÓN

La concepción “clásica” de la vacunación comprende, de manera general, la utilización de microorganismos vivos atenuados o inactivados por diferentes métodos, por ejemplo, mediante agentes químicos como el formaldehído o el timerosal, este último compuesto usado como preservativo por su acción antimicrobiana.^{1,2} Aunque las vacunas atenuadas inducen una fuerte respuesta inmune, existe la posibilidad de que los microorganismos

vivos que las componen puedan revertir eventualmente a su forma virulenta, lo que de cierta forma limita su empleo.³ Por otra parte, las vacunas no vivas, formadas por componentes acelulares tales como cápsulas, toxinas parcialmente purificadas o polisacáridos, etc., son igualmente seguras y eficaces.⁴ La aplicación de vacunas de células atenuadas o inactivadas ha permitido el control y erradicación, en algunos casos, de enfermedades infecciosas consideradas como flagelos de la humanidad, tales como la viruela o la poliomielitis. Esta última se espera que sea erradicada en unos pocos años.⁵ Existen otras enfermedades infecciosas que no han podido ser controladas hasta el momento mediante la tecnología de vacunación, digamos “clásica”. De ahí, la necesidad de aplicar y desarrollar nuevas tecnologías que contribuyan a vencer esta limitación. Además, las autoridades correspondientes exigen actualmente elevados estándares de seguridad y caracterización físico-química en las vacunas.¹

Las técnicas de ADN recombinante han brindado nuevas posibilidades. Antígenos específicos, seleccionados a partir de los datos inmunológicos de los pacientes, purificados a partir del patógeno o de sistemas heterólogos han originado vacunas recombinantes eficientes, por ejemplo, la vacuna anti-HBV y la anti-*Bordetella pertussis*.⁶⁻⁸ Sin embargo, diversos factores pueden limitar este enfoque. Por ejemplo: las proteínas inmunogénicas pueden no ser necesariamente antígenos protectores o bien si lo son, no pueden ser utilizados en formulaciones vacunales debido a variabilidad de secuencia, dificultad en la expresión y/o purificación, grandes costos de producción, etc.¹ Lógicamente, los microorganismos implicados deben ser cultivados *in vitro*, de modo que este enfoque excluye aquellos no cultivables en tales condiciones. En muchos casos, los antígenos expresados durante la infección no es posible producirlos en condiciones de laboratorio. Adicionalmente, mediante estos métodos solo pueden ser analizadas simultáneamente unas pocas moléculas con propiedades inmunogénicas, de modo que el camino hacia la vacuna se hace engorroso y complejo, sobre todo, cuando los antígenos implicados no son obviamente inmunodominantes, como lo son, por ejemplo, las toxinas o cápsulas.^{1,3}

La era de la genómica – proteómica cambió el panorama en el diseño de nuevas vacunas. De hecho, el conocimiento del genoma completo de un patógeno dado brinda la posibilidad de seleccionar los genes de interés, clonar, purificar y expresar los genes seleccionados, así como purificar las proteínas recombinantes y finalmente, identificar *in vitro* e *in vivo* los posibles candidatos vacunales que generen nuevas vacunas, más eficientes y seguras.^{1,3,9} La combinación genómica-proteómica ha significado, en muchos casos, grandes avances en el descubrimiento de sitios “diana” de vacunas contra bacterias patógenas. La vacuna ideal debe ser patógeno – específica y portadora de antígenos conservados en todas las cepas, de modo que posea una cobertura universal, con el mínimo número de antígenos. La genómica permite “marcar” las proteínas que se conservan en las diferentes cepas, en tanto que la proteómica revela la expresión proteica que es accesible a los anticuerpos. Ejemplos exitosos, en principio, se han reportado en *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*.¹⁰

Algunos autores han reportado enfoques alternativos a las vacunas tradicionales. Por ejemplo, vacunas basadas en péptidos,⁷ vacunas basadas en anticuerpos anti-idiotípicos y vacunas de ADN.^{11,12} Es notable destacar que ninguna de estas vacunas ha llegado todavía al mercado, a pesar de que han sido validadas todas las pruebas previas correspondientes, tales como eficacia en modelos animales y pruebas clínicas en humanos para diferentes enfermedades infecciosas.⁹

Con este trabajo se pretende divulgar y discutir las ideas básicas con relación al enfoque genómico-proteómico en la generación de nuevas vacunas contra *Bordetella pertussis*,

el agente causal de la tosferina o pertussis, en el contexto actual de re-emergencia de la enfermedad a escala universal.

PRINCIPIOS BÁSICOS: GENÓMICA – TRANSCRIPTÓMICA – PROTEÓMICA

En sentido general, el sistema inmune es capaz de reconocer unos pocos componentes en el patógeno (generalmente antígenos secretados o asociados a superficie del patógeno y factores de virulencia), y responder de forma específica contra ellos, neutralizando de esta manera al agente infeccioso. Por tal razón, la clave para el desarrollo de vacunas efectivas reside en la identificación de aquellos componentes del patógeno, capaces de generar una respuesta inmune.¹ Puesto que muchos de estos antígenos son proteínas, el conocimiento de todos los componentes proteicos de un patógeno dado debe simplificar enormemente la identificación de nuevos candidatos vacunales.^{1,3}

La esencia en el diseño de nuevas vacunas bajo este enfoque consiste en lograr mediante la aplicación de las tecnologías: genómica, transcriptómica y proteómica, denominadas en conjunto “nómicas” por algunos autores,⁹ una elevada expresión de nuevos antígenos de interés vacunal. Para tales fines, se toma como punto de partida el conocimiento de la secuencia del genoma del patógeno en cuestión y mediante la aplicación de herramientas bioinformáticas, micromatrices o microarreglos de ADN y la proteómica, teóricamente es posible seleccionar candidatos vacunales con una gran especificidad y eficiencia y de una manera racional.

Actualmente, se puede conocer la secuencia genómica completa de una bacteria patogénica en unos pocos meses y a muy bajo costo.³ La secuencia del genoma completo de un microorganismo fue reportada por primera vez para *Haemophilus influenzae* en 1995 por The Institute of Genomic Research, USA.¹³ Desde entonces, han sido secuenciados los genomas de numerosos microorganismos, patógenos y no patógenos, en laboratorios en todo el mundo y se encuentran disponibles.¹⁴ Ello ha permitido comparar genomas de bacterias relacionadas, de patógenos *versus* comensales de la misma especie o especies relacionadas y aun entre bacterias con perfiles patogénicos similares o diferentes, lo que ha revolucionado conceptos en la patogénesis bacteriana. De hecho, las secuencias del genoma representan un “catálogo virtual” de todos los candidatos vacunales potenciales, a partir del cual es posible seleccionar las moléculas que probablemente sean las más efectivas, independientemente de su abundancia relativa, o si son expresadas en condiciones *in vivo* o *in vitro*.³

De forma general, se han utilizado tres estrategias o tecnologías diferentes para la búsqueda e identificación de nuevos antígenos con fines vacunales, que se complementan entre sí: 1) el análisis *in silico*; 2) las tecnologías de expresión *in vivo* (IVET en el idioma inglés), mutagenesis marcada (STM en el idioma inglés) y los micromatrices o microarreglos de ADN 3. la proteómica (Fig.1).¹ Las tres estrategias comparten cuatro aspectos básicos: 1) Selección de genes de interés a partir del genoma. 2) Alta eficiencia de clonaje y expresión de los genes seleccionados. 3) Purificación de las proteínas recombinantes. 4) Ensayos *in vitro* e *in vivo* para la identificación de candidatos vacunales.

El análisis *in silico* utiliza algoritmos que pueden predecir genes (secuencias ORF, marcos abiertos de lectura, *Open Reading Frames*, en el idioma inglés) que potencialmente codifiquen para antígenos secretados o asociados a superficie celular y a otros factores de virulencia. El enfoque más común consiste en comparar secuencias pronosticadas como codificadoras de genes de virulencia con secuencias para esa función existentes en bases de datos, utilizando programas computacionales tales como

BLAST, que identifica homologías a genes conocidos para una función conocida en otros organismos.^{15,16} La función es asignada a secuencias ORF y es registrada en las bases de datos. Alternativamente, se han utilizado otros programas para buscar proteínas secretadas o asociadas a superficie bacteriana. Por ejemplo, PSORT es utilizado para la predicción de señales en las proteínas y localización de determinados sitios en las secuencias de aminoácidos;¹⁷ Signal P predice la presencia y localización de señales de sitios de corte en péptidos en secuencias de aminoácidos de diferentes organismos, procariotas y eucariotas.¹⁸



Fig. 1. Enfoque global para la identificación de nuevos candidatos vacunales.¹

A pesar de su elevado valor predictivo, el análisis *in silico* requiere en última instancia del experimento, que establezca de forma inequívoca el papel de los productos génicos en el microorganismo vivo en cuestión. Este nuevo enfoque se ha dado en llamar “Vacunología reversa”, puesto que el diseño de las vacunas parte del análisis *in silico* de la secuencia genómica, y no del tradicional, que parte de la bacteria viva.^{19,20}

El uso de modelos experimentales *in vivo* ha sido una herramienta valiosa en la identificación y aislamiento de los genes que son inducidos específicamente durante la infección.²¹⁻²³ Estos incluyen: la STM o mutagénesis de marcaje, la tecnología de expresión *in vivo* (IVET, en el idioma inglés) y la tecnología de micromatrices o microarreglos de ADN.

La STM identifica genes requeridos *in vivo* para la sobrevivencia mediante mutagénesis al azar. Esta técnica generalmente emplea una colección de transposomas modificados con fragmentos de aproximadamente 40 pares de bases. Cada mutante portador de una secuencia de transposoma específico es reconocido por su secuencia. Las cepas

mutantes son colectadas e inoculadas en animales. Luego de la infección, las cepas atenuadas son identificadas mediante comparación, si ellas no son recuperadas a partir de los animales infectados. Estas cepas potencialmente pueden ser utilizadas como candidatos vacunales. Naturalmente, los mutantes atenuados seleccionados no causan infección y por lo tanto, son candidatos vacunales poderosos como vacunas vivas. Por consiguiente, las proteínas identificadas como esenciales en la infección o enfermedad serán útiles en la preparación de vacunas acelulares.³

Por otra parte, IVET identifica fácilmente los genes que son inducidos específicamente durante la infección bacteriana.²⁴ Esta estrategia requiere de una bacteria que porte una mutación en una vía biosintética que limite el crecimiento *in vivo*, por ejemplo, una auxotrofia. La función biosintética esencial es suplida por promotores presentes en fragmentos de ADN cromosomal del patógeno, derivados de una biblioteca genómica preparada al efecto,³ de modo que las bacterias mutantes originan colonias sobre el medio por complementación de las auxotrofías, luego de la transformación con la biblioteca genómica. Posteriormente, los productos de fusión seleccionados a partir de esas colonias son secuenciados para identificar los genes inducidos *in vivo*. Se han desarrollado métodos alternativos, tales como el empleo de genes reporteros que codifican para la resistencia a antibióticos o que codifican para una proteína fluorescente verde (inducción de fluorescencia diferencial).²⁵⁻²⁷

La tecnología de microarreglos de ADN ha sido aplicada igualmente en el pesquizado de nuevos genes para la virulencia. Esta tecnología y sus principios ha sido bien descrita y aplicada por diversos autores²⁸ y es particularmente útil en el análisis del genoma de organismos relativamente simples, como es el caso de las bacterias. A estos efectos, se prepara una matriz con fragmentos de ADN que representan el genoma completo de la bacteria, lo que permite el análisis de su expresión, en el caso en cuestión, para la virulencia. Dicho de otra manera, mediante esta tecnología, teóricamente es posible analizar la compleja interacción y regulación entre huésped y patógeno.^{24,29,30} La expresión temporal de los genes de virulencia puede ser monitoreada mediante crecimiento del patógeno en modelos *in vivo* correspondientes (por ejemplo, cultivo de células o animales), seguido de extracción y marcaje apropiado mediante tinción fluorescente del ARN de las bacterias recuperadas y finalmente, hibridizado *in vitro* a la matriz portadora de los fragmentos de ADN.³¹ Los genes de virulencia activos emiten señales de fluorescencia, que son convenientemente cuantificadas y computarizadas, luego de la excitación con rayos láser. De esta manera, una visión completa del genoma mediante microarreglos constituye una herramienta promisoría para la identificación de nuevos candidatos vacunales.

Con el conocimiento de la secuencia genómica, las técnicas de separación mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas ha sido posible separar, identificar y catalogar proteínas diversas, expresadas bajo condiciones celulares diferentes. En el caso del desarrollo de nuevas vacunas, los métodos de separación y caracterización de proteínas de membrana y de proteínas asociadas a la superficie bacteriana son particularmente importantes.³²

El "set" de proteínas, codificadas por el genoma de un organismo se designa como "proteoma".^{1,33} En principio, el análisis proteómico parte de la separación de una mezcla de proteínas (lisados celulares o de membrana externa, por ej.), en sus componentes individuales mediante diversos procedimientos. Una vez separadas, cada proteína es digerida con proteasas específicas para generar péptidos discretos, cuyas masas moleculares se determinan por espectrometría de masas. El resultado experimental es comparado con el resultado teórico *in silico* esperado para la misma degradación específica de todas las proteínas predichas a partir de la secuencia

genómica. Como resultado, la proteína puede ser identificada inequívocamente como el producto de un gen específico.

LOS TRABAJOS PIONEROS EN *NEISSERIA MENINGITIDIS*

La bacteria *Neisseria meningitidis* es el agente causal fundamental de la meningitis y sepsis en niños y adolescentes. Se han desarrollado vacunas conjugadas polisacáridicas, basadas en antígenos contra los polisacáridos capsulares de la bacteria, correspondientes a los serogrupos A, C, Y y W135. Tal es el caso de Menomune[®] – A/C/Y/W-135 combinada, de aplicación subcutánea.³⁴ No ha sido posible desarrollar una vacuna capsular efectiva contra el serogrupo B (MenB), debido a que la cápsula de la bacteria es químicamente idéntica al ácido (2-8) polisialico ligado, presente en el tejido humano. Este hecho lo hace pobremente inmunogénico y causa potencial de autoinmunidad.^{3,35}

La aplicación de vacunas de vesículas de membrana externa (OMV, en el idioma inglés) ha sido exitosa en el control de epidemias del serogrupo B en Noruega, Cuba, Chile, Brasil y Nueva Zelanda.^{35,36} Este tipo de vacuna solo es efectiva contra cepas homólogas, de un tipo clonal definido, debido a que la respuesta inmune provocada por las vacunas OMV está dirigida casi exclusivamente a ciertas proteínas inmunodominantes, particularmente la porina PorA, por demás, bastante variable en las diferentes cepas.³⁶ Un gran número de cepas de meningococos del serogrupo B en circulación son genéticamente diversas, lo que limita la efectividad de la vacuna.

Para la identificación de candidatos vacunales potenciales en *Neisseria meningitidis* serogrupo B (MenB) fue aplicada exitosamente la tecnología genómica.^{37,38} Los autores determinaron la secuencia genómica de la cepa virulenta MC58, determinando además secuencias ORF en fragmentos de ADN durante el proceso. Mediante la aplicación de programas computacionales adecuados, los autores fueron teóricamente capaces de predecir e identificar 600 antígenos secretados o expuestos. De ellos, 350 fueron expresados en *E. coli* y utilizados para inmunizar ratones. Los antisueros correspondientes fueron evaluados por la técnica de fluorescencia específica (FACS) y ELISA para la localización de los antígenos de superficie en MenB y anticuerpos bactericidas. Como resultado de este estudio, los autores detectaron 91 nuevos antígenos de superficie, 28 de ellos fueron capaces de inducir anticuerpos bactericidas.

Las secuencias conservadas de los antígenos MenB detectados por el análisis genómico, presentes en las cepas patógenas ensayadas, que incluyen diferentes serogrupos de *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. cinerea* y *N. lactamica*, fue el criterio seguido en la selección de candidatos vacunales. La formulación final de la vacuna consiste de las proteínas de fusión fHBP-GNA2091, GNA2132-GNA1030, NadA y PorA-OMV.³⁸

El enfoque convencional, sin embargo, muestra una gran variabilidad en los antígenos entre las cepas y son expresados solamente en algunas de ellas, siendo solamente efectivos en cepas homólogas.³⁷ Las características generales de estos antígenos incluyen proteínas expuestas en la superficie celular o lipoproteínas de estructura globular, sin dominios asociados a membrana y en general, no abundantes en la superficie bacteriana.

En este caso, la aplicación de la vacunología reversa ha identificado una mayor cantidad de candidatos vacunales potenciales, con relación a los enfoques tradicionales.

El esquema general aplicado por los autores para obtener posibles candidatos vacunales para *N. meningitidis* serogrupo B se ilustra en la Fig. 2.^{3,38}

El enfoque genómico-proteómico ha permitido la caracterización de candidatos vacunales a partir de vesículas de membrana externa (OMV) contra cepas de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (MenB).³⁹⁻⁴¹ En el caso de la vacuna OMV producida por el

Instituto Finlay, de Cuba, VA-MENGOC-BC®, los autores fueron capaces de generar un mapa proteómico de vesículas OMV, mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas MS.

De esta manera, lograron identificar diferentes proteínas, algunas de ellas novedosas e inmunogénicas, que forman parte de la formulación vacunal actual.⁴¹ Los antígenos de superficie recombinantes seleccionados fueron dos proteínas de fusión (factor de enlace a proteína-H (fHbp) y NadA) y la proteína aislada GNA2132. La estrategia de la vacunología reversa significa un nuevo campo de investigación para la obtención de una vacuna universal contra meningococos tipo B.⁴²⁻⁴⁴

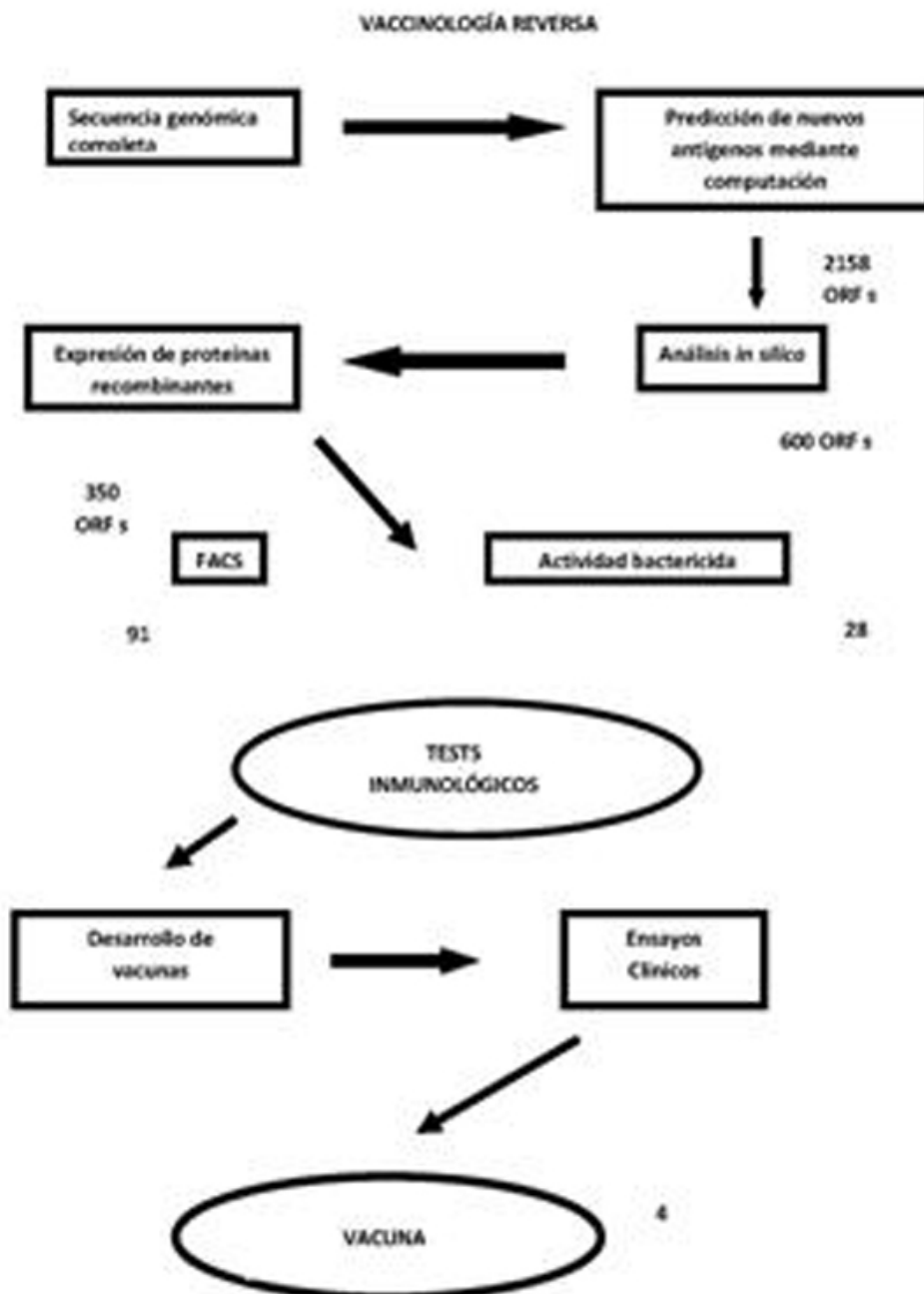


Fig. 2. Vacunología reversa aplicada a *N. meningitidis* serogrupo B.³

LA ERA POST-GENÓMICA EN LAS VACUNAS ANTIPERTÚSICAS

Durante las últimas dos décadas se ha observado un resurgimiento significativo de la tosferina o pertussis a escala mundial, a pesar de la amplia disponibilidad de vacunas efectivas y los altos niveles de vacunación alcanzados.^{45,46} Ha sido reconocido que los niños no inmunizados, adultos y adolescentes con baja inmunidad pueden servir como reservorio para la infección: ocasionalmente, tales individuos pueden transmitir *B. pertussis* a niños pequeños no inmunizados.⁴⁷ Actualmente, la enfermedad ha sido reportada en adolescentes y adultos en los que frecuentemente se manifiesta de forma atípica.⁴⁷ Por otra parte, es bien conocido que el uso de vacunas de células completas en individuos de más de siete años de edad está contraindicado, así como la corta duración de la inmunidad alcanzada.⁴⁸

Hasta el presente, se ha identificado como inmunogénico un cierto número de factores de virulencia en *B. pertussis*, que incluye las adhesinas, la hemoaglutinina filamentosa (FHA) y las fimbrias (FIM), los autotransportadores pertactina (PRN), la proteína de resistencia a suero (Brk A) y el factor de colonización traqueal (Tcf A), tres toxinas: la pertúsica (PT), la adenilato ciclasa (CyaA) y la toxina dermonecrótica (DNF), así como el lipopolisacárido (LPS) y la proteína de shock térmico 60 (Hsp60). Estas proteínas son, en principio, potencialmente protectoras y algunas de ellas han sido usadas como componentes de vacunas acelulares.^{47,49}

Las formulaciones licenciadas para adultos y adolescentes de vacunas acelulares contra pertussis, combinadas con toxoides contra la difteria y el tétanos (Tdap) son seguras, inmunogénicas y bien toleradas.^{50,51} Sin embargo, se ha observado una pérdida gradual de la efectividad de las vacunas actuales, basadas fundamentalmente en la pertactina y la toxina pertúsica, a consecuencia de los cambios moderados y operados en sus secuencias genómicas,⁵² así como la aparición de nuevas cepas en circulación, contra las que las vacunas actuales son inefectivas o poco eficientes. Como resultado, se ha observado en los últimos tiempos una re-emergencia de la enfermedad a escala universal.

Una forma lógica de abordar el problema sería la búsqueda de nuevas proteínas inmunogénicas, capaces de generar nuevos candidatos vacunales y con una mayor capacidad protectora contra *B. pertussis*. Paralelamente, estos esfuerzos pudieran ser enfocados hacia la obtención de vacunas atenuadas de aplicación nasal, de modo que simule la infección natural y que sea capaz de inducir una inmunidad a más largo plazo.⁵³

Como ya ha sido mencionado, la aplicación de las tecnologías post-genómicas ha significado una revolución en el diseño de nuevas vacunas.⁵³ En particular, una gran información acerca de los componentes inmunogénicos se derivan de la proteómica, acoplados al *Western-blotting* (Inmunoproteómica). Este enfoque ha sido aplicado exitosamente en el descubrimiento de nuevos antígenos en diversas bacterias patógenas, tales como *Helicobacter pylori*,^{54,55} *Staphylococcus aureus*,⁵⁶ *Bacillus anthracis*,⁵⁷ *Shigella flexneri*,⁵⁸ *Francisella tularensis*,⁵⁹ *Corynebacterium diphtheriae*,⁶⁰ *Streptococcus pyogenes*,⁶¹ *Chlamydia pneumoniae*,⁶² y *Neisseria meningitidis*.⁶³

Naturalmente, el enfoque proteómico aplicado a *Bordetella pertussis* tiene como premisa el conocimiento de la secuencia genómica de las especies patógenas más importantes que componen el Género: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*.⁶⁴

Las técnicas de inmunoproteómica han sido aplicadas en *B. pertussis* para el pesquizaje de proteínas inmunogénicas de membrana y extracelulares. Por ejemplo, uno de estos trabajos reporta un total de 38 proteínas inmunogénicas únicas (11 proteínas extracelulares y 27 de membrana), detectadas mediante *Western blotting*, utilizando

sueros procedentes de niños vacunados. La espectrometría de masas MADLI-TOF/MS permitió la identificación final de las proteínas inmunogénicas, algunas de ellas descritas por primera vez.⁶⁴ Los autores de este trabajo citaron, entre otras proteínas, las siguientes: una proteína de membrana externa opcional, importante para la regulación del operón de virulencia Bvg; el factor de elongación Tu/Ts de la glicerol-3-fosfato dehidrogenasa y la chaperona GroEL, presentes igualmente en *H. pneumoniae*, *Streptococcus* Grupo A y *Candida albicans*. Además del análisis inmunoproteómico, los resultados preliminares del análisis *in silico*, hibridación genómica comparativa y la caracterización transcripcional e interacción proteína-proteína permitieron identificar 191 nuevos candidatos vacunales potenciales de *B. pertussis* contra *B. pertussis* y *B. parapertussis*.⁶⁵

El análisis proteómico de *B. pertussis* demuestra el carácter diferencial de la expresión de proteínas bajo condiciones limitantes o en exceso de hierro en el medio de cultivo.⁶⁶ La regulación de la expresión genética como respuesta a las concentraciones locales de hierro es comúnmente observada en patógenos bacterianos. Durante la infección, la célula bacteriana sufre limitaciones de este nutriente. Los autores de este trabajo tomaron lisados celulares totales y diferentes fracciones de membrana externa de la bacteria bajo tales condiciones. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis bidimensional. El análisis estadístico reveló que 36 proteínas diferentes mostraron una expresión diferencial: nueve de ellas con una expresión incrementada bajo condiciones de un exceso de hierro y en las 27 restantes, la mayor expresión se observó bajo condiciones limitantes de hierro. Las proteínas fueron sometidas a digestión trípica y espectrometría de masas MALDI-TOF/MS. La identificación posterior de nuevas proteínas, inducidas a bajas concentraciones de hierro, pudiera explicar la virulencia incrementada de este fenotipo. Además, al menos una de esas proteínas que solamente se expresa bajo condiciones limitantes en hierro era muy inmunogénica en individuos infectados. Posteriormente, el mismo grupo de trabajo logró identificar nuevos antígenos mediante inmunoproteómica en *B. pertussis*.⁶⁶ Estos antígenos mostraron su expresión máxima bajo condiciones limitantes de hierro. En particular, uno de ellos, designado como IRP1-3 reaccionó fuertemente frente a IgG humana, purificada a partir de individuos infectados. Según el análisis computacional, IRP1-3 es una proteína de membrana dimerica y está potencialmente involucrada en la incorporación de hierro a la célula. Los datos experimentales revelan que esta proteína se expone a la superficie celular y que su incremento bajo condiciones limitantes de hierro es independiente de la fase de virulencia de la bacteria. Por otra parte, la inmunización de ratones con IRP1-3 recombinante resulta en una fuerte respuesta de anticuerpos, que no solamente reconocen la proteína nativa sobre la superficie bacteriana, sino que promueven una fagocitosis efectiva de las bacterias por polimorfonucleares en humanos. Asimismo, IRP1-3 es efectivo contra la infección de *B. pertussis* en modelo de ratón y su expresión es conservada entre diferentes aislamientos clínicos, siendo positivamente regulado bajo privación de hierro. Estos resultados, tomados en su conjunto, sugieren que las proteínas antigénicas, inducidas bajo condiciones limitantes de hierro, pueden ser potencialmente buenos candidatos vacunales.^{66,67}

Otros autores reportaron un análisis comparativo del proteoma de superficie de una cepa vacunal y de varios aislamientos clínicos por espectrometría de masas. Como resultado de este estudio, se identificaron 54 nuevas proteínas, asociadas al transporte y metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, algunas de las cuales fueron propuestas como nuevos candidatos vacunales.⁶⁸

Por otra parte, Altindis *et al*,⁶⁹ a partir de proteínas solubles extraídas de dos cepas de *B. pertussis*, separadas mediante electroforesis bidimensional y analizadas por *Western-*

blotting por su reactividad frente a sueros específicos, fueron capaces de identificar 25 proteínas inmunogénicas, 12 de las cuales mostraron ser nuevos antígenos para esta especie. Para su estudio, las 25 proteínas inmunogénicas fueron divididas en tres grupos fundamentales: el primer grupo comprendió tres antígenos conocidos de *B. pertussis* [pertactina, proteína de resistencia sérica y Hsp60 (*heat shock protein*, en el idioma Inglés)]. El segundo grupo contenía 10 proteínas conocidas como antigénicas en otras bacterias patógenas y el tercer grupo estaba formado por las 12 proteínas descritas solamente como antigénicas para *B. pertussis* y no para otros patógenos. Sin embargo, los autores de este trabajo no detectaron las proteínas antigénicas FHA y PT, posiblemente debido a su localización extracelular y naturaleza hidrofóbica, lo que condicionaría su eliminación temprana en los procedimientos de extracción.

Posteriormente, se identificaron diferentes proteínas de superficie en las cepas Tohama I y Saadet de *B. pertussis*, luego de una electroforesis bidimensional seguida de análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF-MS/MS y geLC-MS/MS, una herramienta proteómica poderosa que implica electroforesis unidimensional SDS, separación y digestión de bandas específicas y caracterización de péptidos correspondientes.^{70,71}

Como resultado, los autores identificaron 45 proteínas diferentes de Tohama I y 226 de Saadet, respectivamente. El análisis por *Western-blotting* identificó 27 “manchas” inmunogénicas, correspondientes a 11 productos génicos diferentes. De ellas, la proteína periplásmica de enlace mediante glutamina, la proteína de enlace leu/ ile/ val, una proteína exportada opcionalmente y una Fe-superóxido dismutasa (Fe-SOD) se reportaron por primera vez como inmunogénicas en *Bordetella*. De 226 proteínas identificadas, 16 se expresaron diferencialmente en Saadet y Tohama I. Cinco proteínas se expresaron solamente en Saadet (adhesina, la chaperona DnaJ, la de fimbria FimX, la secretada opcional Bsp 22 y la opcional de estrés universal). Finalmente, dos de ellas se expresaron solamente en Tohama I: la proteína transportadora ABC y otra proteína, asociada al transporte periplásmico.⁷⁰

La expresión de los genes de la virulencia en *B. pertussis* está controlada por el regulón BvgA/S y algunos de los genes involucrados son modulados por ácido nicotínico y MgSO₄. La identificación y el estudio fisiológico de la expresión de nuevos genes de virulencia mediante microarreglos de ADN en el regulón BvgA/S puede ser una alternativa para diseñar cepas atenuadas, útiles para ensayos de vacunación intranasal. Tal es el caso de los genes hotA y hotB, cuyos productos génicos muestran una gran similitud a las subunidades de la toxina pertúsica. Los primeros ensayos con preparados vacunales, derivados de cepas atenuadas para estos genes mostraron ser totalmente efectivos, luego de la administración intranasal en ratones.⁵³

CONCLUSIONES

La búsqueda de nuevos antígenos que generen nuevos candidatos vacunales contra *Bordetella pertussis* es una estrategia promisoriosa que puede solucionar los problemas actuales de la resurgencia de la enfermedad a escala mundial. La aplicación del conocimiento básico del genoma y el proteoma de *Bordetella* y de la regulación temporal de los genes involucrados en la virulencia, así como el crecimiento de la cepa vacunal bajo condiciones limitantes de hierro puede contribuir grandemente a alcanzar tales objetivos.

Las vacunas actuales contra *B. pertussis* no protegen contra las infecciones de *B. parapertussis*, de modo que sería importante lograr nuevos candidatos vacunales, efectivos contra ambos microorganismos. Por otra parte, el desarrollo de nuevas vacunas acelulares de aplicación nasal pudiera garantizar una inmunidad prolongada, dado que las vacunas actuales solamente aseguran una inmunidad a corto plazo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grandi G. Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. *Trends in Biotechnology*. 2001;19 (5):181-88.
2. Thimerosal in Vaccines. *Vaccines, Blood & Biologics*. Consultado: 23 de agosto de 2012. Disponible en: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/UCM096228>.
3. Capecchi B, Serruto D, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Pizza M. The Genome revolution in vaccine research. *Curr Issues Mol Biol*. 2004;6:17-28.
4. WHO. Acellular pertussis vaccines. *Biologicals*. WHO 2012. Consultado: 14 de junio de 2012. Disponible en: <http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/apertussis/en/index.html>.
5. Global Polio Eradication Initiative. Consultado 10 de abril de 2012. Disponible en: <http://www.polioeradication.org/>.
6. André F F. Overview of a 5-yr clinical experience with a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine*. 1990; 8 (Suppl.), S74-S78.
7. Greco D. *et al.* A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *N Engl J Med*. 1996;334:341-48.
8. BenMohamed L, Wechsler SL, Nesburn AB. Lipopeptide vaccines: yesterday, today and tomorrow. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:425-431.
9. Grandi G. Genomics, Proteomics and Vaccines. Chapter 2. Bioinformatics, DNA microarrays and proteomics in vaccine discovery: competing or complementary techniques? Guido Grandi Ed. John Wiley & Sons, Ltd. Consultado: 15 de junio de 2012. Disponible en: http://media.wiley.com/product_data/excerpt/65/04708561/0470856165.pdf
10. Zagursky RJ, Anderson AS. Application of genomics in bacterial vaccine discovery: a decade in review. *Curr Opinion in Pharmacology*. 2008;8(5):632- 638.
11. Magliani W, Conti S, Salati A, Arseni S, Ravanetti L, Frazzi R *et al.* Biotechnological approaches to the production of idiotypic vaccines and antiidiotypic antibodies. *Curr Pharm Biotechnol*. 2003;4:91-97.
12. Liu M A. DNA vaccines: a review. *J Int Med*. 2003;253:402-410.
13. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 1995;269:496-512.
14. The Gene Index Project. Consultado: 15 de junio de 2012. Disponible en: <http://compbio.dfc.harvard.edu/tgi/>
15. Altschul SF *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25:3389-3402.
16. Altschul SF *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990; 215:403-410.
17. PSORT Prediction. psort.nibb.ac.jp/. Actualizado: 7 de enero de 2007. Consultado: 10 de abril de 2012.
18. SignalP 4.0 Server. Consultado: 10 de abril de 2012. Disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
19. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*. 2000;3:445-450.
20. Vivona S, Gardy JL, Ramachandran S, Brinkman FSL, Raghava GPS *et al.* Computer-aided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology. *Trends in Biotechnology*. 2008;26(4):190-200.

21. Shea JE, Santangelo JD, Feldman RG. Signature-tagged mutagenesis in the identification of virulence genes in pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 2000;3:451-458.
22. Tang C, Holden D. Pathogen virulence genes—implications for vaccines and drug therapy. *Br Med Bull.* 1999;55:387-400.
23. Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science.* 1993;259:686-688.
24. Cummings CA, Relman DA. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6: 513-525.
25. Mahan MJ, Tobias JW, Slauch JM, Hanna PC, Collier RJ, Mekalanos JJ. Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:669-673.
26. Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene.* 1996;173:47-52.
27. Valdivia RH, Falkow S. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science.* 1997;277:2007-2011.
28. Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature.* 2000;405: 827-836.
29. Kato-Maeda M, Gao Q, Small PM. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cell. Microbiol.* 2001;3:713-719.
30. Manger ID, Relman DA. How the host ‘sees’ pathogens: global gene expression responses to infection. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:215-218.
31. Rappuoli R. Pushing the limits of cellular microbiology: microarrays to study bacteria-host cell intimate contacts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:13467-13469.
32. Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: an amour impossible? *Electrophoresis* 2000;21:1054-1070.
33. Washburn MP, Yates JR. Analysis of the microbial proteome. *Curr. Opin. Microbiol.* 2000; 3: 292-297. Chiang SL, Mekalanos JJ, Holden DW. *In vivo* genetic analysis of bacterial virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 1999;53:129-154.
34. Meningococcal Polysaccharide Vaccine, Groups A, C, Y and W-135 Consultado: 27 de agosto de 2012. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM131653.pdf> Publicado: diciembre de 2005. Consultado: 27 de agosto de 2012.
35. Van der Ley P, Van den Dobbelsteen G. Next-generation outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* based on nontoxic LPS mutants. *Hum. Vaccines.* 2011;7(8): 886-890.
36. Holst J, Martin D, Arnold R, Campa Huergo C, Oster P, O’Hallahan J *et al.* Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine.* 2009; 27:3-12.
37. Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M *et al.* Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science.* 2000;287:1816-1820.
38. Rinaudo C D, Telford, J L, Rappuoli R, Kate L S. Vaccinology in the genome era. *J Clin Invest.* 2009;119:2515–2525.
39. Holst J, Feiring B, Naess L M, Norheim G, Kristiansen P, Hoiby E A, *et al.* The concept of “tailor-made”, protein-based, outer membrane vesicle vaccines against meningococcal disease. *Vaccine.* 2005; 23:2202-5.

40. Collins BS. Gram-negative outer membranes in vaccine development. *Discovery Medicine*. Consultado: 30 de mayo de 2012. Disponible en: <http://www.discoverymedicine.com/Brenda-S-Collins/2011/07/02/gram-negative-outer-membrane-vesicles-in-vaccine-development/>
41. Uli L, Castellanos-Serra L, Betancourt L, Domínguez F, Barberá R, Sotolongo F, Guillén G *et al.* Outer membrane vesicles of the VA-MENGOC-BC[®] vaccine against serogroup B of *Neisseria meningitidis*: Analysis of protein components by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2006; 6(11): 3389-3399.
42. Romeu B, González E, Lastre M, del Campo J, Acevedo R, Zayas C *et al.* *Neisseria Vaccines 2009* as a new route to stimulate research and collaborations *VacciMonitor*. 2010;19 (1):27-28.
43. Gil J, Betancourt, L H, Sardiñas G, Yero D, Niebla O, Delgado M *et al.* Proteomic study via a non-gel based approach of meningococcal outer membrane vesicle vaccine obtained from strain CU385. A road map for discovering new antigens. *Hum Vaccines*. 2009;5 (5):347-356.
44. Sotolongo F, Campa C, Casanueva V, Fajardo EM, Cuevas IE, González N. Cuban Meningococcal BC Vaccine: Experiences & Contributions from 20 Years of Application. *MEDICC Rev*. 2007;9 (1):16-22.
45. De Carvalho AP, Pereira EM. Acellular pertussis vaccine for adolescents. *J Pediatr (Rio J)* 2006;82(3):15-24.
46. Leung AK, Robson WL, Davies HD. Pertussis in adolescents. *Adv Ther*. 2007;24(2):353-61.
47. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):326-82.
48. Marzouqi I, Richmond P, Fry S, Wetherall J, Mukkur T. Development of improved vaccines against whooping cough: current status. *Hum Vaccines*. 2010;6(7):543-553.
49. Del Giudice G, Gervais A, Costantino P, Wyler CA, Tougne C, De Graeff-Meeder ER, *et al.* Priming to heat shock proteins in infants vaccinated against pertussis. *J Immunol*. 1993;150: 2025-32.
50. Halperin SA, Smith B, Russell M, Hasselback P, Guasparini R, Skowronski D, *et al.* An adult formulation of a five-component acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids is safe and immunogenic in adolescents and adults. *Vaccine*. 2000;18(14):1312-9.
51. Pichichero ME, Blatter MM, Kennedy WA, Hedrick J, Descamps D, Friedland LR. Acellular pertussis vaccine booster combined with diphtheria and tetanus toxoids for adolescents. *Pediatrics*. 2006;117(4):1084-93.
52. Pertussis vaccines-WHO position paper. *Weekly Epid Record*. 2005; 80(4):31-9.
53. Locht C, Antoinea R, Razea D, Mielcareka N, Hotb D, Lemoineb Y *et al.* *Bordetella pertussis*: from functional genomics to intranasal vaccination. *Int J Med Microbiol*. 2004; 293(7- 8):583-588.
54. Nilsson CL, Larsson T, Gustafsson E, Karlsson K, Davidson P. Identification of protein vaccine candidates from *Helicobacter pylori* using a preparative two dimensionalelectrophoretic procedure and mass spectrometry. *Anal Chem*. 2000;72: 2148-53.
55. Backert S, Kwok T, Schmid M, Selbach M, Moese S, Peek R, *et al.* Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two

- dimensional gelelectrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2005;5:1331-45.
56. Vytvytska O, Nagy E, Bluggel M, Meyer HE, Kurzbauer R, Huber LA, *et al.* Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. *Proteomics*. 2002;2:580-90.
 57. Ariel N, Zvi A, Makarava KS, Chitlaru T, Elhanany E, Velan B, *et al.* Genome-based bioinformatic selection of chromosomal *Bacillus anthracis* putative vaccine candidates coupled with proteomic identification of surface-associated antigens. *Infect Immun*. 2003;71:4563-79.
 58. Peng X, Ye X, Wang S. Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* 2a by proteomic methodologies. *Vaccine*. 2004;22(21-22):2750-6.
 59. Havlasová J, Hernychová L, Halada P, Pellantová V, Krejsek J, Stulík J, *et al.* Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Proteomics*. 2002;2(7):857-67.
 60. Hansmeier N, Chao T, Kalinowski J, Pühler A, Tauch A. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *Proteomics*. 2006;6:2465-76.
 61. Rodríguez-Ortega MJ, Norais N, Bensi G, Liberatori S, Capo S, Mora M, *et al.* Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nat Biotechnol*. 2006;24(2):191-7.
 62. Bunk S, Susnea I, Rupp J, Summersgill JT, Maass M, Stegmann W, *et al.* Immunoproteomic identification and serological responses to novel *Chlamydia pneumoniae* antigens that are associated with persistent *C. Pneumoniae* infections. *J Immunol*. 2008;180(8):5490-8.
 63. Hsu CA, Lin WR, Li JC, Liu YL, Tseng YT, Chang CM, *et al.* Immunoproteomic identification of the hypothetical protein NMB1468 as a novel lipoprotein ubiquitous in *Neisseria meningitidis* with vaccine potential. *Proteomics*. 2008;8(10):2115-25.
 64. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, *et al.* Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*. 2003;35:32-40.
 65. Immunoproteomics of *Bordetella Pertussis* and *in Silico* Search for Novel Vaccine Candidates and Drug Targets Against Pertussis. Consultado: 10 de mayo de 2012. Disponible en: www.res-medical.com/basic-medical/14839.
 66. Vidakovics ML, Paba J, Lamberti Y, Ricart CA, Sousa MV, Rodriguez ME. Profiling the *Bordetella pertussis* Proteome during Iron Starvation. *J Proteome Res*. 2007;6(7):2518-28.
 67. Alvarez-Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Ayala M, Maschi F, Carbone C *et al.* Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*. *Vaccine*. 2011;29(47):8731-9.
 68. Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, Weltman G, Fernández J, Sisti F, *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(11):1490-8.
 69. Altindis E, Tefona BE, Yıldırma V, Özcengiz E *et al.* Immunoproteomic analysis of *Bordetella pertussis* and identification of new immunogenic proteins. *Vaccine*. 2009;27: 542-548.
 70. Tefon BE, Maass S, Ozcengiz E, Becher D, Hecker M, Ozcengiz G. A comprehensive analysis of *Bordetella pertussis* surface proteome and identification of new immunogenic proteins. *Vaccine*. 2011;29(19):3583-3595.

71. Technology Platforms - NextGen Sciences. Consultado: 15 de junio de 2012.
Disponible en: <http://www.nextgensciences.com/technology-platforms/>