

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y  
FARMACÉUTICAS**



“Proteína Inmunogénica de Superficie de *Streptococcus  
agalactiae*: Estudio del mecanismo de su capacidad adyuvante  
inmunológico”

Tesis para optar al grado académico de  
Magíster en Bioquímica.

Ricardo Augusto Manzo Paredes

Director de Tesis:  
Dr. Abel Vásquez Veloso  
Instituto de Salud Pública de Chile

Co-director  
Dr. Christian A.M. Wilson  
Universidad de Chile

Santiago de Chile 2019

## INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

### **RICARDO AUGUSTO MANZO PAREDES**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, rendido el día: \_\_\_\_\_

Director de Tesis:

Dr. Abel E. Vásquez V. \_\_\_\_\_

Co-director de Tesis:

Dr. Christian A.M. Wilson M. \_\_\_\_\_

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela P. \_\_\_\_\_

Dr. Dante Miranda W. \_\_\_\_\_

Dr. Mauricio Farfán. \_\_\_\_\_

*Dedicada a mi familia y amigos*

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradezco a Sandra Oyarzo e Ida Torres y familia por acompañarme y guiarme en este largo camino.

Al Dr. Abel Vásquez, Jefe de la Sección de Biotecnología del Instituto de Salud Pública por integrarme a su nuevo equipo de trabajo, recibirme, guiarme y apoyarme en este nuevo desafío en la formación profesional. Agradezco también a su equipo, conformado por, Daniel Soto, Diego Díaz Dinamarca, Daniel Escobar, Diego Bastias, María José Avendaño, América Abarca.

A la comisión de tesis, y especialmente al Dr. Christian A.M. Wilson por su incondicional apoyo y colaboración.

De manera muy especial, quiero agradecer a mi familia y a mis amigos por creer siempre en mí.

## **Presentaciones a congresos**

Los resultados de esta tesis dieron origen total o parcialmente a las siguientes presentaciones a congresos y publicación.

Diego A. Díaz-Dinamarca, **Ricardo Manzo**, Daniel A. Soto, Jorge A. Soto, María José Avendaño, Diego Bastidas, Daniel Escobar, América Abarca, Christian A.M. Wilson, Alexis M Kalergis, Abel E. Vázquez. “Surface Immunologic Protein from *Streptococcus agalactiae* is a potential vaccine adjuvant “XIV **Jornadas Científicas** del Instituto de Salud Pública de Chile 14, 15 y 16 mayo 2019.

## **Publicación**

Diego A. Díaz-Dinamarca, **Ricardo A. Manzo**, Daniel A. Soto, María José Avendaño, Diego Bastias, Paulina I. Soto, Christian A.M. Wilson, Alexis M. Kalergis, Abel E. Vázquez. “The Surface Immunogenic Protein of *Streptococcus* Group B Is a Toll-Like Receptor 2 and 4 agonists and is a potential immune adjuvant”.**2020.Vaccines, 8(1), 29.**

## **Financiamiento**

Fondos aportados por la Sección de Biotecnología del Instituto de Salud Pública de Chile y Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile

## **Realización**

Este trabajo de tesis se realizó en la Sección de Biotecnología del Instituto de Salud Pública de Chile y en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile

## Índice

Presentaciones a congresos	i
Congresos Nacionales	i
Financiamiento	ii
Índice	iii
Índice de figuras y tablas	vi
Abreviaturas	vii
Resumen	x
Abstract	xii
<b>I Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Proteína inmunogénica de superficie de <i>Streptococcus agalactiae</i>	2
1.2 Proteínas con capacidad de adyuvante de vacunas	2
1.3 Estructura secundaria de la proteína rSIP	5
<b>II Hipótesis</b>	<b>7</b>
<b>III Objetivos</b>	<b>8</b>
3.1 Objetivo general	8
3.2 Objetivo específico	8
<b>IV Materiales</b>	<b>9</b>
4.1 Equipos	9
4.2 Reactivos	9
4.3 Animales de experimentación	10
4.4 Cepa bacteriana y genotipo	10
4.5 Vector plasmidial	11
<b>V Método</b>	
<b>5.1 Obtención de la proteína rSIP desde <i>E. coli</i> Bl21 (DE3)</b>	<b>12</b>
5.1.2 Cultivo de cepas bacterianas	12
5.1.3 Preparación de células electrocompetente	12
5.1.4 Transformación de células electrocompetente	12

5.1.5 Preparacion de un inóculo para la obtencion de la proteína rSIP desde <i>E. coli</i> B121(DE3)	13
<b>5.2 Obtención y caracterización de la proteína SIP recombinante</b>	<b>13</b>
5.2.1 Purificación de la proteína rSIP de <i>E.coli</i> B121(DE3) mediante cromatografía de afinidad baja presión	13
5.2.2.Purificación de la proteína rSIP desde extractos <i>E. coli</i> B121(DE3) mediante cromatografía de exclusión molecula en HPLC	14
5.2.3 Determinación de la concentración de proteína	15
5.2.4Análisis de pureza de rSIP	15
5.2.5 Electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado para determinar la identidad de la proteína rSIP	16
<b>5.3 Análisis preliminar estructural de la proteína rSIP por Dicroísmo circular</b>	<b>16</b>
<b>5.4 Estudio de la respuesta inmune humoral contra OVA</b>	<b>17</b>
5.4.1Protocolo de inmunización	17
5.4.2 Obtención de suero	17
5.4.3Detección de anticuerpos especificos contra OVA por ELISA	18
<b>5.5Análisis de la capacidad adyuvante de rSIP</b>	<b>18</b>
5.5.1Cultivo de células dendríticas desde médula ósea	18
5.5.2Cultivo de células HEK-Blue TLR	19
5.5.3 Análisis de las DCs mediante citometría de flujo	19
5.5.4 Determinación de citoquinas IL-10 and IL12 en sobrenadante de DCs	19
5.5.5Análisis de ligandos de TLR	20
5.5.6 Análisis estadístico	20
<b>VI Resultados</b>	
<b>6.1 Obtener la proteína recombinante SIP</b>	<b>21</b>
6.1.1 Obtención de la proteína recombinante rSIP en <i>E.coli BL21</i> (DE3) codón plus	21
6.1.2 Purificación de la proteína rSIP de <i>E.coli</i> B121(DE3) mediante Cromatografía por exclusión molecular en HPLC	21
<b>6.2. Identificación de la proteína recombinante purificada</b>	<b>23</b>



6.2.1 El Test rápido STREP	23
6.2.2 Electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado	24
<b>6.3 Analizar preliminarmente la estructura de la proteína rSIP</b>	<b>25</b>
<b>6.4 Evaluar la capacidad de adyuvante de rSIP</b>	<b>26</b>
6.4.1 Efecto de la rSIP como adyuvante en la respuesta inmune	26
6.4.2 Efecto de la proteína rSIP sobre los niveles de citoquinas IL-12 e IL-10 en células dendríticas (DCs)	27
6.4.3 Evaluación fenotípica en las células dendríticas de ratones C57/BL6 estimuladas con la proteína rSIP de <i>Streptococcus agalactiae</i> .	28
6.4.4 Evaluación de la proteína rSIP como ligando de TLR	29
<b>VII Discusión</b>	<b>31</b>
<b>VIII Conclusiones</b>	<b>35</b>
<b>IX Referencias</b>	<b>36</b>

## **Listas de figuras**

- Fig.1. Grupo experimental de inmunización para analizar el efecto de SIP sobre la inducción de anticuerpos del tipo IgG anti OVA.
- Fig.2. Superposición de cromatogramas obtenidos para las proteínas calibradoras de masa molecular usados en la determinación del tiempo de retención de la proteína rSIP.
- Fig .3 Perfil cromatográfico de rSIP purificado en condición basal.
- Fig.4 Perfil cromatográfico de rSIP purificado optimizado.
- Fig.5 Test rápido para detección *de S. agalactiae*
- Fig.6. Fig. 6. Análisis de expresión rSIP por SDS-PAGE al 12,5%.
- Fig.7 Electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado usando anticuerpo policlonal contra rSIP.
- Fig.8. Espectro de dicroísmo circular (DC) de la proteína rSIP.
- Fig. 9 Inducción de anticuerpos específicos anti-OVA del tipo IgG.
- Fig.10 Expresión de citoquinas IL-12 e IL-10 por SIP.
- Fig .11Proteína SIP promueve la maduración de las DCs.
- Fig.12 La proteína SIP estimula la Hek-Blue TLR2 and TLR4

## **ABREVIATURAS**

ACK	Tampón para lisado con amoníaco-cloruro-potasio
Amp	Ampicilina
ALUM	Hidróxido de aluminio
APC	Célula presentadora de antígenos
BCA	ácido bicinconínico
BCIP/NTB	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato / nitro azul tetrazolio.
BSA	Seroalbumina de bovino
BBB	Barrera hematoencefálica
BMDC	Células dendríticas de médula ósea
cfu	Unidad formadora de colonias
CICUAL	Comité Institucional de cuidado y uso de animales de laboratorio
DCs	Células dendríticas
DMEM	Medio mínimo esencial Dulbecco
D.O <sub>600</sub>	Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm
FACS	Células activadas por fluorescencia
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
GdnHCl	Cloruro de guanidinio
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito/macrófago
kDa	kilo Dalton
HEK BLUE	Cultivo celular que permite la detección de SEAP ( <i>secreted embryonic alkaline phosphatase</i> ), fosfatasa alcalina embrionaria secretada
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactópiranosido
LB	Medio de cultivo Luria Bertani

LPS	Lipopolisacárido
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
Mabs	Anticuerpos monoclonales
NI-NTA	ácido níquel-nitrilotriacético
OVA	ovo-albúmina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
SBG	<i>Streptococcus</i> grupo B
SIP	Proteína de inmunogénica de superficie (del Inglés <i>surface immunogenic protein</i> )
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
pb	Pares de bases
PBS 1X	Amortiguador Fosfato Salino.
PSA	Persulfato de amonio
PBS-BSA	Amortiguador salino albumina
PBS-Tween	Amortiguador con detergente
Pam3CSK4	Peptidoglicano
PE	Ficoeritrina
PerCP-Cy5.5	Peridinína-clorofila /Ficoeritrina-Cianina5.5
RPM	Revoluciones por minuto
Temed	N, N, N, N,-Tetrametiletilendiamina
T <sub>R</sub>	Tiempo de retención
Th1	Células T “Helper” 1 (subpoblación de linfocitos T)
Th2	Células T “Helper” 2(subpoblación de linfocitos T)
TLR	Receptor tipo Toll ( <i>Toll Like Receptor</i> )

Y-PER

Reactivo de extracción de proteína de levadura

**RESUMEN**

*Streptococcus agalactiae* también conocida como *Streptococcus* Grupo B (SGB), es una cocaccea Gram positiva, anaeróbica, facultativa y  $\beta$ -hemolítica capaz de colonizar el tracto genitourinario de un 15% a un 40% de mujeres embarazadas. Se asocia a la muerte fetal y parto prematuro. Así como es la principal causa de sepsis neonatal. El desarrollo de una vacuna contra SGB es prioritario según la OMS, hay vacunas de polisacáridos conjugadas que están en fase clínica II y existen otras vacunas en base a proteínas purificadas que se encuentran en fase clínica I y a nivel preclínico.

Una de las proteínas que ha demostrado ser atractiva desde el punto de vista inmunológico como una alternativa para el desarrollo de una vacuna contra SGB, es la proteína inmunogénica de superficie conocida por sus siglas en inglés de SIP (*surface immunogenic protein*). En los 10 serotipos descritos a la fecha para SGB, esta proteína es altamente conservada en su secuencia aminoacídica y se ha ensayado como potencial inmunógeno para el desarrollo de una vacuna. La función biológica de esta proteína aún no ha sido descrita.

En la Sección de Biotecnología del Instituto de Salud Pública de Chile se obtuvo la proteína SIP recombinante desde una cepa de SGB proveniente de un cuadro invasivo de sepsis y meningitis. Esta proteína se ha evaluado como prototipo de vacuna a nivel preclínico mediante inmunización oral y subcutánea, mostrándose que al ser inmunizada por la vía oral es capaz de conferir inmunidad protectora en un modelo murino. Además, esta proteína al ser inmunizada por la vía subcutánea sin la presencia de adyuvantes, confiere inmunidad protectora, que permite disminuir la colonización intravaginal por SGB, lo que nos hace suponer que esta proteína podría tener propiedades de adyuvante inmunológico para el desarrollo de vacunas.

En esta tesis se obtuvo la proteína recombinante SIP desde *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus mediante cromatografía de afinidad baja presión y su pureza se confirmó mediante cromatografía de exclusión molecular en HPLC. Se evaluó su capacidad de potenciar la respuesta inmune contra ova-albúmina (OVA) al inmunizar ratones de la cepa C57BL/6 con una mezcla de proteínas. La proteína rSIP formulada como adyuvante indujo mayor cantidad de anticuerpos anti-OVA que la formulación con OVA sola y con OVA más adyuvante ALUM.

El estudio realizado en células dendríticas (DCs) permitió observar que rSIP indujo un cambio fenotípico en dichas células aumentando el marcador de superficie CD86/80 y DC 40 y MHCII. Respecto a los parámetros inmunológicos se observó que el sobrenadante de las DCs estimuladas con rSIP indujo un aumento de las citoquinas IL-10 y IL-12. La evaluación de la proteína rSIP como ligando de TLR muestra que es un agonista de TLR2 y TL4.

Estudios preliminares de la estructura de la proteína rSIP permiten concluir que la estructura secundaria es mayoritariamente beta en su estado plegado, mientras que con 3,9 M de GdHCl está principalmente desplegada.

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo de tesis nos permiten concluir que la proteína rSIP tiene el potencial adyuvante inmune.

## ABSTRACT

*Streptococcus agalactiae* also known as Streptococcus Group B (GBS) is a Gram positive, anaerobic, facultative and  $\beta$ -hemolytic cocaccea capable of colonizing the genitourinary tract from 15% to 40% of pregnant women. It is associated with fetal death and premature delivery, and also is the main cause of neonatal sepsis. Vaccine development against GBS is a priority according to the WHO. Conjugate polysaccharide vaccines are in clinical phase II and also there are vaccines based on purified proteins that are in clinical phase I and at the preclinical level.

One of the proteins that has proven to be an immunologically attractive alternative to the development of a vaccine against GBS is the surface immunogenic protein known by its acronym SIP. In the 10 serotypes described to date for GBS this protein is highly conserved in the amino acid sequence and it has been tested as an immunogenic potential for the development of a vaccine. The biological function of this protein remains undescribed.

The Biotechnology Section of the Public Health Institute of Chile has obtained the recombinant SIP protein from a strain of SGB from an invasive sepsis and meningitis. This protein has been evaluated as a prototype vaccine at the preclinical level by oral and subcutaneous immunization: The immunized by the oral route has shown to be able of conferring protective immunity in a murine model. In addition, when this protein was immunized by the subcutaneous route without the presence of adjuvants also confers protective immunity, which allows reducing intravaginal colonization by GBS. This makes us to assume that this protein could have immunological adjuvant properties for vaccine development.

In this thesis, the SIP recombinant protein was obtained from *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus by low pressure affinity chromatography and its purity was confirmed by HPLC molecule exclusion chromatography. The ability to enhance the immune response against ova was evaluated. Albumine (OVA) by immunizing mice of strain C57BL / 6 with a mixture of proteins. The rSIP protein formulated as an adjuvant induced a greater amount of anti-OVA antibodies than the formulation with OVA alone and with OVA plus adjuvant ALUM.



The study carried out in dendritic cells (DCs) allowed us to observe that rSIP induced a phenotypic change in DCs, increasing the surface marker CD86 / 80 and DC 40 and MHC II. Respect to the immunological parameters it was observed that the supernatant of rSIP stimulated DCs induced an increase in the cytokines IL-10 and IL-12 secretion. The evaluation of the rSIP protein as a TLR ligand showed that it is an agonist of TLR2 and TL4.

Preliminary structural evaluation of the rSIP protein allows to conclude a predominant beta structure in its folded state and that with 3.9 M of GdHCl it is mainly unfolded.

The experimental results obtained in this thesis work allow us to conclude that the rSIP protein has the immune adjuvant potential

## I. Introducción

*Streptococcus agalactiae* (SGB) es una bacteria encapsulada gram positiva, identificado en la microbiota intestinal humana y del tracto vaginal [1]. Se han identificado 10 serotipos diferentes de SGB (Ia, Ib, II-IX) [2], de los cuales los serotipos (Ia, III and V) [3] son los principales en causar sepsis bacteriana y meningitis en neonatos a nivel mundial [4]. El desarrollo de meningitis en neonatos comienza con la colonización de SGB en el epitelio vaginal de las mujeres embarazadas y la infección del neonato por su paso a través del canal de parto y su paso de SGB desde el torrente sanguíneo al sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica de sus siglas en inglés BBB (Brain Blood Barrier), provocando una respuesta inflamatoria por parte del hospedador [5]. Además, se ha observado que SGB, al igual que otros patógenos, inducen el proceso de autofagia mediado por las células endoteliales cerebrales [6]. Se ha demostrado que diversos factores de virulencia de SGB contribuyen a la adherencia e invasión de BBB, los cuales poseen una ubicación diferencial en SGB. [7]

SGB es uno de los microorganismos de interés en Salud Pública por el ser el principal agente etiológico de sepsis neonatal. En el 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó SGB como una prioridad en el desarrollo de una vacuna para inmunización maternal [8]. Las vacunas constituidas por microorganismos vivos atenuados o muertos generan efectos adversos no deseados y los de polisacáridos bacterianos son poco inmunogénico. En la actualidad, existen diversos candidatos para el desarrollo de vacunas contra SGB en el mundo, como las vacunas que utilizan un antígeno de polisacárido capsular (CPS) de SGB, glicoconjugadas con una proteína transportadora. Sin embargo, recientemente, se han comenzado a desarrollar vacunas de proteínas conservadas entre todos los serotipos de SGB, las cuales tienen el atractivo de dar una cobertura más amplia contra las distintas cepas de SGB circulantes que causan enfermedades. [9]

La proteína SIP de SGB ha sido una de las proteínas que ha generado gran interés por ser conservada y, la cual en particular se ha descrito con una proteína con alta capacidad inmunogénica.

### **1.1 Proteína inmunogénica de superficie de *Streptococcus agalactiae***

La proteína inmunogénica de superficie (SIP), se ha identificado en distintas cepas de SGB, y al comparar sus secuencias aminoacídicas se ha demostrado que está altamente conservada, ya que existe un 98% de identidad entre todas las secuencias nucleotídicas analizadas[10]. Además ensayos inmunológicos con anticuerpos monoclonales específicos para SIP, indicaron que una proteína de aproximadamente 53kDa compuesta por 434residuos de aminoácidos codificados por un marco abierto de 1305nucleótidos que estaba presente en todas las cepas de SGB estudiadas [10,11]. Se ha demostrado que SIP está expuesta en algunas regiones de la superficie bacteriana, la cual fue se confirmó por anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para SIP [11].

Se demostró mediante un modelo animal que los anticuerpos específicos contra SIP pueden atravesar la placenta para conferir protección a los recién nacidos contra las enfermedades causadas por SGB [11]. Igualmente, se ha demostrado que la proteína SIP al ser formulada como vacuna subcutánea induce una respuesta inmune humoral que permite disminuir la colonización intravaginal por SGB en modelo murino [12]. Una observación similar se obtuvo al inmunizar ratones vía oral, generando anticuerpos funcionales con capacidad opsonofagocítica, y una respuesta humoral [13]. Esto es algo muy novedoso, lo cual ya se ha probado para generar protección frente a enfermedades como el Cólera y el Polio [14]

### **1.2 Proteínas con capacidad de adyuvante.**

Los adyuvantes son sustancias o preparados químicos que incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune específica [15]. Los adyuvantes ayudan a inducir una respuesta inmune temprana, elevada y de larga duración contra el antígeno, siendo necesario incluso menores concentraciones del mismo antígeno y una reducción en el número de dosis de inmunizaciones. Además, una razón importante para utilizar adyuvantes es la necesidad de dirigir la respuesta inmune con la finalidad de lograr mecanismos más efectivos contra determinadas enfermedades; por ejemplo, la respuesta Th1 en vacunas terapéuticas contra la alergia.

En los últimos años muchas clases de nuevos y potenciales adyuvantes se han

descubiertos, entre estos, proteínas provenientes de patógenos. Las proteínas porinas de los patógenos *Neisseria lactamica* y *Fusobacterium* tales como PorB y FomA, respectivamente se encuentran entre los varios productos bacterianos con actividad de adyuvante inmune [16]. Ambas proteínas nativas como recombinantes y purificadas han demostrado propiedades de estimulante inmune dependiente de la vía TLR2 en modelo murino, utilizando ovo-albumina (OVA) como antígeno prototipo. La formulación OVA-PorB demostró inducir títulos mayores de IgG específica que OVA sola. Además, mostró la inducción de títulos mayores de IgG1 e IgG2b, así como la producción de citoquinas IL-4, IL-10, IL-12 e INF- $\gamma$  [17]. FomA por su parte demostró, que al ser formulada con OVA ésta, generó mayores títulos de IgG1 e IgG2b que OVA sola. Además, se observó un aumento de la secreción de citoquinas IL-10 e IL-6 [18].

Además, ambas proteínas tanto nativa como recombinantes para PorB ha demostrado inducir una respuesta inmune similar [19, 20, 21] en la generación de anticuerpos y actividad bactericida, sin embargo, si su estructura nativa se altera se pierde su actividad [20]. Por tanto, se sigue que la estructura nativa de PorB se mantiene después de la purificación debido a la presencia de bandas peso molecular en SDS-PAGE no denaturante. [22]

Para el caso del replegamiento de FomA recombinante y sus características estructurales y funcionales han sido ampliamente descritos, incluyendo la formación de trímeros, la inserción en bicapas lipídicas, y las funciones de formación de poros [23, 24, 25,26]

Una característica importante de los adyuvantes es su capacidad de inducir inmunidad humoral, y en este contexto el suministro eficiente del antígeno blanco a las células dendríticas (DCs) presentadoras de antígeno profesionales y su potencia para activar estas células. [27]. En general, la maduración de la DC aumenta su capacidad de presentación de antígenos y su capacidad para activar las células T y es un requisito previo para la inducción de una respuesta inmune. Uno de los estímulos de maduración de DCs mejor estudiados son los ligandos de TLR, que incluyen poli (I: C), LPS, CpG, R848 y Pam3CSK4, que pueden activar a las DCs para aumentar la regulación de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD86 y MHC [28].

Varios agonistas del receptor tipo Toll (TLR) son componentes de formulaciones de vacunas autorizadas o están en desarrollo como adyuvantes candidatos. Sin embargo, el tipo y la magnitud de las respuestas inmunes a los TLR pueden variar por la activación de los TLR [29]

TLR2 y TLR4 han adquirido una importancia debido a su capacidad para identificar distintos patrones moleculares de patógenos invasores [30]. Estos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) no solo actúan como un sensor innato, sino que también dan forma y unen las respuestas inmunitarias adaptativas e innatas. Además, también desempeñan un papel fundamental en la regulación del equilibrio entre el tipo de respuesta Th1 y Th2, que es esencial para la supervivencia del huésped [31]

La célula dendrítica es la célula presentadora de antígenos (APC) “profesional” con capacidad única de presentar antígenos a linfocitos T vírgenes iniciando así la inmunidad celular contra patógenos [32]. Las DCs al ser enfrentadas a las señales de peligro, se encuentran en un estado inmaduro con una alta capacidad fagocítica y un bajo potencial de activación de linfocitos T. Sin embargo, el encuentro con componentes microbianos tales como LPS, DNA, CpG, RNA y proteínas impulsa el proceso de maduración de las DCs [33]. Lo que produce un cambio fenotípico y funcional, como disminución en la capacidad de fagocitar antígenos junto con una inducción de la migración desde la periferia hacia los ganglios linfáticos donde se encuentran los linfocitos T [33], y el aumento de señales moleculares en la superficie de las DCs.

Las APCs entregan tres tipos de señales a los linfocitos vírgenes, las cuales corresponden a: (1) péptidos derivados de proteínas bacterianas, virales o endógenas unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los que funcionan como ligandos para el receptor del linfocito T (TCR). (2) moléculas co-estimuladoras antígeno-inespecíficas, tales como B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) que son reconocidas por el linfocito T mediante el receptor CD28. El evento de activación y maduración de estas señales moleculares en la superficie de las DCs. por el linfocito T es conocido como sinapsis inmunológica. Esta interacción entre linfocito T y DC con ambas señales (p-MHC/TCR y moléculas co-estimuladoras), permite la activación del linfocito T confiriendo inmunidad al organismo, mientras que cuando se presenta solo la primera señal (p-

MHC/TCR, en ausencia de moléculas co-estimuladoras), otorga un estado anérgico al linfocito T, lo que induce tolerancia específica para este antígeno.

La expresión de moléculas co-estimuladoras en la superficie de la DC es fundamental para una adecuada activación de linfocitos T [33] y podría ser clave en mantener el equilibrio adecuado entre inmunidad y tolerancia y finalmente una tercer señal que consiste en la (3) producción de citoquinas y quemokinas que juegan un rol importante en la polarización de la respuesta inmune (Th1/Th2). [34,35].

Además se ha descrito tanto en ratones como en seres humanos dos subgrupos de linfocitos T helper (colaboradores o Th) atendiendo al patrón de citoquinas que producían, y se les denominó T helper1 (Th1) y T helper2 (Th2) [36]. En respuesta a la estimulación antigénica, los linfocitos Th1 producen interleuquina IL-2 e interferón- $\gamma$  (IFN-gamma) y estimulan la inmunidad mediada por las células. Los linfocitos Th2 segregan IL-4, IL-5 e IL-10, favoreciendo la inmunidad humoral, e inducen la producción de anticuerpos.

Las respuestas extremas de este espectro son capaces de inhibir el desarrollo de la contraria, y así el IFN-producido por las células Th1 puede inhibir la proliferación de las células Th2. Contrariamente, la IL-4 y la IL-10 producidas por las células Th2 pueden inhibir la proliferación de las células Th1. La IL-12 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) producido por los macrófagos presentadores de antígenos son fuertes promotores de las respuestas Th1 [37]. La IL-4 es, por el contrario, es la citoquina encargada de promover la aparición de un fenotipo Th2 [38]. Además, la respuesta Th1 se caracteriza por inducir la producción de las subclases de IgG.

### **1.3 Estructura secundaria de la proteína rSIP**

Existe muy poca evidencia donde se describa una similitud estructural ni funcional con otras proteínas, de igual manera un análisis *in silico* (PSI-BLAST) [39] indicó la presencia de un motivo Lisina (LysM) constituido por 45 aminoácidos aproximadamente, el cual está presente también en una amplia variedad de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de bacterias.

Este motivo tiene una estructura secundaria del tipo “beta-alfa-alfa-beta ”donde las 2 hélices se ubican juntas a un costado de una estructura “hoja beta antiparalela” Además, se observó una alta similitud entre el dominio Lys de SGB y el de *S. pyogenes* el

cual forma parte de los genes que codifican para antígenos de superficie [39]. Todos los estudios están enfocados a la composición de la estructura secundaria de la proteína FbsA de *Streptococcus agalactiae* que muestra patrones de alfa hélice y en menor medida *random coil* y la predicción de la estructura secundaria mediante programas informáticos.

Sobre la base de las observaciones anteriores, se propone que la proteína FbsA podría adoptar alguna forma helicoidal de repetición, la estructura y la conformación global de la molécula podría cambiar en función del número de repeticiones y de igual manera se dispone de varias estructuras cristalográficas para proteínas filamentosas de adhesión como pili tipo 1 y 2b. [40]. Se intentó obtener una estructura tridimensional por medio del programa SWISS-MODEL y no se encontró una proteína con estructura, que tuviese alta identidad de secuencia con la SIP.

El diroísmo circular (CD) es una buena herramienta y rápida para determinar la estructura secundaria y propiedades de las proteínas plegadas que han sido obtenidos mediante técnicas recombinantes o purificados a partir de tejidos. Las aplicaciones más utilizadas de CD proteína son para determinar si una proteína purificada (rSIP) se pliega, o si alguna mutación afecta su conformación o su estabilidad [41]

## **II. Hipótesis.**

La proteína Immunogénica de Superficie *de S. agalactiae* se ha descrito capaz de inducir anticuerpos protectores frente a una infección en modelo murino, de esta propiedad se debe el nombre que se le dio a esta proteína. Es una proteína altamente conservada en su secuencia aminoacídica en los diferentes serotipos de esta bacteria. En la Sección de Biotecnología del ISP se ha demostrado que esta proteína es capaz de inducir una respuesta inmune y posiblemente adyuvante por lo que se plantea la siguiente Hipótesis:

**«La proteína inmunogénica de superficie *de S. agalactiae* tiene capacidad de adyuvante inmunológico»**



### **III. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad SIP de comportarse como un adyuvante inmunológico.

#### **3.2 Objetivos específicos.**

3.2.1 Obtener la proteína recombinante SIP

3.2.2 Analizar preliminarmente la estructura de la proteína rSIP

3.2.3 Evaluar la capacidad de adyuvante de rSIP

## IV. Materiales

### ➤ 4.1 Equipos

- Citómetro de flujo FacsVerse
- HPLC marca Knauer
- Espectropolarímetro Jasco J-810
- Centrifuga Sorvall modelo RC2-B superspeed, rotor SS-34.
- Centrifuga Sartorius.
- Lector de placas Spectro star nano (BMG labtech)
- Gabinete de bioseguridad II Napflow modelo 12NF
- Digitador de imagen para geles Bio-Imaging Systems
- Baño termoregulado Marca Mermet/WB-14

### ➤ 4.2 Reactivos.

- Applichem GmbH: inhibidor de proteasas de serina
- Becton Dickinson: Fluoresceína-5-isotiocianato, Ficoeritrina, Peridínina-clorofila /Ficoeritrina-Cianina 5.5, anticuerpos marcados anti- CD86/CD86, CD40, MHC II, IL10 y IL12 y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos o GM-CSF.
- BioRad Laboratories Inc. NY,USA: azul de Coomasie R-250, inhibidor de proteasa, anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado a fosfatasa alcalina
- Difco Lab. Ditroit, MI, USA: agar-agar, SS-agar, extracto de levadura, triptona pancreática digerida de caseína, agar soya-triptona, infusión cerebro corazón, agar noble, agar granulado. Gibco BRL, Maryland, USA.: estreptomocina, penicilina, normocina, suero fetal bobino, glutamina estándar de peso molecular, glicina y papel de nitrocelulosa.
- GmbH : Kit de estándares de proteínas PSS Polymer Standards Service
- R &D System , anticuerpo anti ratón IgG conjugado con fosfatasa alcalina
- Invitrogen, BenchMark, USA: estándar de peso molecular de proteínas de rango amplio preteñido, guanidina, BCIP/NTB.
- US-Biological, USA: IPTG.

- J. T.Baker, S.A de C.U: bicarbonato de sodio, fosfato de potasio monobásico, fosfato de sodio dibasico, carbonato de potasio.
- Invitrogen Corporation, Carlsbad, Ca, USA: agarosa de Ni-NTA
- Merck, Darmstadt, Alemania: agarosa, glucosa, etanol, ácido acético glacial, hidróxido de sodio, ácido sulfúrico 37%, cloruro de sodio, metanol, glicerol, sulfato de níquel, cloruro de níquel, hidróxido de sodio, dimetilsulfoxido (DMSO), SDS, carbonato de sodio.
- Nalge Nung, Internacional, Denmark: placas Inmuno-Nunc de superficie plana.
- New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA.: marcador de proteínas preteñido rango amplio.
- Novagen Corporation, Madison, USA: resina Ni-NTA His-Bind.
- Nipro Corp, Osaka, Japan: sonda pediátrica orogástrica 25Gx3/4 T.W. (0,5X19).
- Sigma Chemicals Co., St Louis, USA.: acrilamida, bisacrilamida, kanamicina, anti-IgG de ratón, EDTA, TEMED,, azul de bromofenol, β-mercaptoetanol, cloruro de calcio, Tween-20 ,péptidoglicano Pam3CSK4
- InvivoGen San Diego (USA):LPS
- Thermo Fisher Scientific,ovo-albúmina ,adjuvante ALUM

#### 4.3 Animales de experimentación.

Ratones C57BL/6 hembras de 8 a 12 semanas, procedentes del Bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Todos los experimentos que usaron ratones se realizaron de acuerdo con los estándares éticos internacionales y siguiendo la Ley 20380 de Protección Animal (2009) de Chile. El protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del ISP.

#### 4.4 Cepa bacteriana y genotipo:

<i>BL21 –CodonPlus-RIL strain</i>	<i>E.coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm Tef gal endA The [argU ileY leuW Cam] (1)</i>
-----------------------------------	--

(1)Cepario del Laboratorio de la Sección de Biotecnología del ISP.

#### **4.5 Vector plasmidial**

Se usó el vector plasmidial: pET21-SIP (NOVAGEN) que contiene el gen de la proteína SIP de la cepa bacteriana de *S. agalactiae* KU736792 de un aislado clínico disponible en el Laboratorio de la Sección de Biotecnología del ISP.

## 5.0 MÉTODOS

### 5.1 Obtención de la proteína rSIP desde *E. coli* BL21 (DE3)

#### 5.1.2 Cultivo de cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* BL-21 (DE3) se inocularon en caldo Luria Bertoni (LB) a 37°C con agitación durante toda la noche a 220 rpm, mientras que las cepas transformadas con el vector plasmidial pET21a-SIP se incubaron en caldo Luria a 37°C con agitación durante toda la noche a 220 rpm con Ampicilina (100 µg/mL).

#### 5.1.3 Preparación de células electrocompetentes

Se cultivaron inóculos de *E. coli* en 3 mL de medio LB toda la noche a 37°C en agitación 220 rpm, que contiene 3 µL cloranfenicol (34 µg/mL) y 4,5 µl estreptomicina (75 µg/mL). Se inocularon 100 mL de medio LB con 3mL de cultivo saturado y se incubó con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub>: 0,5-0,6. A esta OD se encuentra en una fase exponencial lo que se asocia a un estado de mayor desarrollo metabólico de la bacteria, luego se mantuvieron en hielo por 10 min y el sedimento se resuspendió con agua estéril, se repitió este proceso 3 veces. Las células se centrifugaron en tubos estériles por 20 min a 5.000 x g en centrifuga 2-16PK-Sigma a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1,0-1,5 mL de una solución estéril y fría. Finalmente, las células se almacenaron en alícuotas de 200 µL en tubos estériles con glicerol al 15%, y se congelaron a -80°C.

#### 5.1.4 Transformación de células electrocompetentes

La transformación de células electrocompetentes fue llevada a cabo con 100 µL de *E. coli* BL-21(DE3) codon plus a los que se les adicionó 3 µL del DNA plasmidial (pET21-SIP), luego fueron incubadas en hielo durante 30 min y posteriormente sometidas a un pulso eléctrico (Micro-PulserBio-Rad) de 2,4 kV. Esta mezcla se agrega a 1 mL de medio LB y se incuba a 37°C por 1 h con agitación, luego se centrifugó a 1min a 4.000 rpm. El sedimento que contiene el DNA plasmidial en las células *E. coli*BL-21(DE3) se resuspendió, de ese medio de cultivo se sembraron 100 µL en placas con agar Luria el que

contenía como medio de selección el antibiótico ampicilina (100 µg/ml), Estreptomicina (75µg /mL) y Cloranfenicol (34 µg/mL).

#### 5.1.5 Preparación de inóculo para la obtención de la proteína rSIP desde *E. coli* B121 (DE3)

A partir de las placas obtenidas se recolecta una colonia por medio de un asa bacteriológica, esta se adicionó en 3 mL de medio LB con 3,0 µL Cloranfenicol (34 µg/mL), 4,5 µL Estreptomicina (75 µg/mL) y 15 µL Ampicilina (100 µg/mL). Se dejó incubando toda la noche a 37°C a 220 rpm y al día siguiente se tomó una muestra para inocular un matraz en el cual se realiza la expresión a una relación 1:100 del volumen de medio contenido en este.

#### 5.2 Obtención y caracterización de la proteína SIP recombinante

La proteína SIP recombinante se obtuvo de acuerdo a lo descrito ref. [42]. Se depositó 3 mL del pre inóculo en un matraz de 2000 mL con 500 mL de medio LB suplementado con glucosa al 0,4%, se prepararon 2 matraz suplementado con glucosa al 0,4%, uno es inducido y el otro es control negativo ya que no se inducirá. Se incubó a 37°C a 220 rpm hasta que se alcanzó una OD<sub>600nm</sub> entre 0,5-0,6. Se indujo con IPTG 1,5 mM. La temperatura de inducción es 37°C y se indujo por un periodo de 2 horas con agitación de 220 rpm. El contenido del matraz inducido, se depositó en tubos para centrifuga de 500 mL, los que se centrifugaron durante 10 min a 5.000 rpm con un rotor SS-34a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado bacteriano obtenido se almacenó a -20°C.

##### 5.2.1 Purificación de la proteína rSIP de *E.coli* B121(DE3) mediante cromatografía de afinidad baja presión (Ni-NTA)

El sedimento bacteriano contenido en un tubo Falcón de 50 mL el cual se resuspendió en 5 mL de Y-PER Reagent. Se adiciono 0,05 µL de inhibidor de proteasa Halt™ 100X el cual se diluyo en el volumen del Falcon y se obtuvo una concentración final de 1X de Inhibidor de proteasa. Se homogenizó la mezcla por 20 min en un agitador Vórtex. Luego se centrifugó a 5.000 rpm por 10 min a 4°C, se eliminó el sedimento y el sobrenadante es filtrado primero por un filtro de 40 µm (Falcon) seguido por un filtro de 0,45 µm (Nylon). Se preparó 6 mL de la resina Ni-NTA, se homogenizó y se centrifugó

durante 1 min a 800 g, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió la resina en 6 mL de agua bidestilada, se centrifugó durante 1 min a 800 g, y se eliminó el sobrenadante. Para la purificación bajo condiciones nativas, se resuspendió la resina en 6 mL de solución de unión, se centrifugó durante 1 min a 800 g, y se eliminó el sobrenadante. Este paso se repitió una vez más. El filtrado se resuspendió con la resina. Se tomó la mezcla de resina con el filtrado, se depositó en un tubo Falcon de 50mL dejándolo a 4°C toda la noche. Se transfirió el contenido del tubo Falcon a la columna, se dejó decantar y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con 8 mL de solución de lavado, se repitió este paso hasta agotar la solución de lavado. Para eluir la columna se ocupó 20 mL de solución de elución y se recolectó el filtrado. Las muestras de proteína purificada se depositaron en una membrana de diálisis y se dejó dializando en poli-etilenglicol 40% (pH 7,4) por 30 min en hielo y con agitación constante. Luego se traspasó la membrana a PBS 1X por 15 minutos en hielo y con agitación constante. La muestra se intercambió entre polietilenglicol 40% y PBS 1X hasta concentrar la muestra a la mitad del volumen original. Se cuantificó mediante Bradford (Bio-Rad) y se almacenaron a -80°C con inhibidor de proteasa Halt™ (1X).

#### 5.2.2. Purificación de la proteína rSIP desde extractos *E. coli* B121(DE3) mediante cromatografía de exclusión molecular en HPLC

Los experimentos de exclusión molecular se desarrollaron utilizando un equipo de HPLC (Knauer, modelo Manager 5000, Binary Pump System), con una columna preparativa BioSep-SEC-s2000 (300 mm x 21,2 mm x 5 µm) (PHENOMENEX). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: flujo 5 mL/min, longitud de onda 210 nm, volumen de inyección 1 mL, temperatura ambiente, fase móvil de tampón fosfato (34 mM) y cloruro de sodio (0,5 M) a pH : 6,6. Previo a la separación de las muestras, se realizó una calibración de la columna, se utilizó el Kit de estándares de proteínas PSS Polymer Standards Service GmbH y la cual fue equilibrada con los siguientes estándares de peso molecular(dalton): citidina (243), vitamina B<sub>12</sub> (1.350), apoproteína (6.500) mioglobina (17.000), citocromo (12.000), mioglobulina (17.000), β-lactoglobulina (35000) ovalbumina (44.000), BSA (67.000), γ- globulina (158.000) y tiroglobulina (670.000). La proteína purificada de la resina Ni-NTA se analizó por HPLC, bajo las mismas condiciones experimentales que la calibración. Se recolectó cada uno de las fracciones de la muestra, y

mediante el inmunoensayo rápido STREP B (FONDEF D10I1202) se verificó que la fracción recolectada en el tiempo de retención de la proteína rSIP correspondiera a la proteína de interés. Una vez determinado el perfil de elución de la proteína rSIP, se procedió a purificar las muestras obtenidas de la columna Ni-NTA. Las fracciones recolectadas, se concentraron utilizando unidades de filtro para centrifuga Amicon Ultra de 30K (Millipore) y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las alícuotas de cada purificado se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser analizadas mediante SDS-PAGE 12,5% y cuantificadas por Kit comercial.

### 5.2.3 Determinación de la concentración de proteína

La cuantificación de proteínas del purificado de la columna de baja presión Ni-NTA y las fracciones de la proteína rSIP recolectadas de la cromatografía de exclusión molecular fue realizada mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) utilizando el Kit comercial antes descrito. Para determinar la concentración de proteínas en la muestra se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) (0; 5; 25; 50; 125; 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a partir de un estándar de 2,0  $\text{mg}/\text{mL}$  de BSA.

El análisis se realizó en placas multipocillo en las que 150  $\mu\text{L}$  de las muestras/estándar se mezclaron con 150  $\mu\text{L}$  de reactivo BCA por pocillo, se mezcló suavemente mediante agitación manual, se cubrió la placa con la cinta selladora para placas de 96 pocillos más papel aluminio y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Terminado el tiempo de incubación la placa se enfrió a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 562 nm utilizando un lector de placas. La concentración de la muestra se determinó a partir de la curva patrón obtenida con el estándar de BSA. Los ensayos se realizarán por duplicado.

### 5.2.4 Análisis de pureza de rSIP

El análisis de la expresión y de purificación se realizó mediante geles de poliacrilamida al 12,5%. Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga 2x durante 5 min a  $100^{\circ}\text{C}$ , cargadas y resueltas en tampón por 1h a 120 V hasta que el indicador alcanzó un centímetro del borde del gel. Finalmente, el gel fue extraído y teñido con una solución colorante azul de coomasie R-250 por 30 min, para ser desteñido mediante una solución decolorante, hasta que las bandas se observen sobre un fondo claro.



### 5.2.5 Electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado para determinar la identidad de la proteína rSIP

Las muestras de proteínas recombinantes fueron sometidas a “western blot” separándose inicialmente por SDS/PAGE y luego electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa a 200 mA durante 1 hora. Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se incubaron en una solución de bloqueo de PBS-leche al 5% a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez bloqueado los sitios libres de la membrana de nitrocelulosa, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación con sueros policlonales de conejo en solución de bloqueo en una dilución 1:1.000 (anticuerpo confeccionado en la Sección de Biotecnología del ISP), los anticuerpos unidos en forma inespecífica se eliminaron lavando 3 veces por 10 min con la solución de lavado.

Los anticuerpos que se unieron a las proteínas presentes en la membrana de nitrocelulosa se visualizaron incubando 1 hora a temperatura ambiente en agitación con anticuerpo anti-IgG de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:5.000 en la solución de bloqueo luego de lavar en las condiciones ya descritas, los anticuerpos unidos inespecíficamente se eliminaron. El conjugado unido se reveló incubando la membrana de nitrocelulosa con 20 mL BCIP/NBT, la reacción se detuvo agregando abundante agua destilada.

### 5.3 Análisis preliminar estructural de la proteína rSIP por Dicroísmo Circular

Los espectros de dicroísmo circular fueron obtenidos desde un espectropolarímetro Jasco J-810 en la región ultravioleta lejana de acuerdo a ref. [43]. La proteína recombinante SIP (10  $\mu$ M) preparada en tampón fosfato (34 mM) y cloruro de sodio (0,5 M) a pH = 6.6, se colocó en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 mm, y los espectros fueron recogidos entre 190 y 260 nm, a intervalos de 1 nm. Se hizo un blanco con el amortiguador apropiado para cada espectro con el fin de obtener el espectro corregido. El espectro que se muestra corresponde a 13 determinaciones. Los datos se representan en términos de la elipticidad observada, en unidades/miligramos.

## 5.4 Estudio de la respuesta inmune humoral contra OVA

### 5.4.1 Protocolo de inmunización

El protocolo de inmunización a utilizar fue modificado de la ref. [44]. Los ratones hembra C57BL/6 de seis a ocho semanas de edad se aclimataron y distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos estándar y se les proporcionó acceso libre a alimento y agua durante el experimento. Los ratones se manipularon y eliminaron de acuerdo con las pautas del Comité de Ética Institucional (CICUAL). El modelo de inmunización consistió en 20 ratones hembras de la cepa C57BL/6, que se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos experimentales de 5 individuos cada uno (Figura 1). Los días 0, 14, 28 y 42 los animales se inmunizaron vía oral con 100  $\mu$ L de la dosis correspondiente al grupo de inmunización usando una sonda orogástrica. Los grupos experimentales se inmunizaron con 10  $\mu$ g de OVA, rSIP (5-10  $\mu$ g), ALUM (2 mg) según el modelo descrito. (Figura 1). Finalmente, los ratones de experimentación eutanasiaron 5 días después post inmunización con 120 mg/kg ketamina y 10 mg/kg xylacina.

- Grupo 1: PBS 1X (100  $\mu$ L)
- Grupo 2: OVA (10  $\mu$ g)
- Grupo 3: OVA (10  $\mu$ g)/ALUM (2 mg)
- Grupo 4: OVA (10  $\mu$ g)/SIP (10  $\mu$ g)

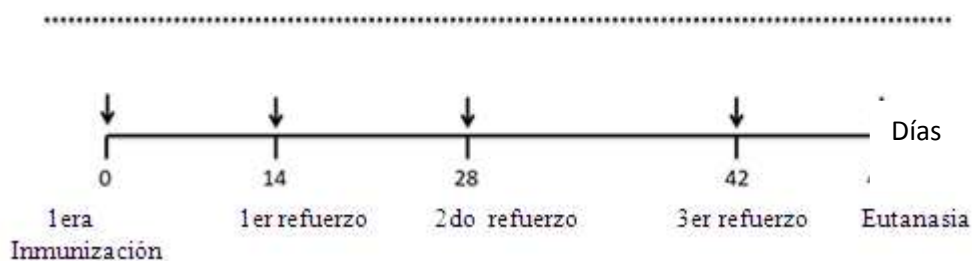


Fig 1. Grupo experimental de inmunización para analizar el efecto de SIP sobre la inducción de anticuerpos del tipo IgG anti OVA

### 5.4.2 Obtención de suero

Se obtuvo sangre por vía retroorbital 5 días después de la última inmunización. Se recolectó en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se mantuvo a 37°C por 30 min en un baño termoregulado. Transcurrido este tiempo, se procedió a extraer el suavemente el plasma y se centrifugó a 3.000 rpm a 4°C por 7 min. Se extrajo el sobrenadante que corresponde al

suero, cuidando de no tomar glóbulos rojos. Finalmente, se depositó el suero en un nuevo tubo eppendorf y se dejó a 4°C por 30 min, para luego ser almacenado a -20°C.

#### 5.4.3 Detección de anticuerpos específicos contra OVA por ELISA.

La detección de IgG total específica de OVA se detectó mediante ELISA indirecto en sueros de ratones. Se activó una placa de 96 pocillos durante la noche con 1 µg de OVA por pocillo en un volumen de 100 µL a 4°C. Luego, se lavó la placa 3 veces con PBS-Tween 0,05% y 2 veces con PBS1X, se bloqueó durante una hora a 37°C con PBS-leche descremada al 5%. Después de lavar la placa, se agregó el suero de los ratones (por triplicado) a cada pocillo en diluciones en serie de 1: 100 a 1: 3.200 en PBS-leche descremada al 5%, se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de los lavados, se agregó el anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:1.000 en PBS-leche descremada 5% y se incubó durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la placa y se agregó 200 µL de tampón sustrato p-nitrofenilfosfato a una concentración de 0,33 mg/mL disuelto en tampón 1 M de dietanolamina con 0,5mM de MgCl<sub>2</sub> y se incubó por 30 min. en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µL de NaOH 3M y se leyó absorbancia a 405 nm en lector de placas.

### **5.5 Análisis de la capacidad adyuvante de rSIP**

#### 5.5.1 Cultivo de células dendríticas desde médula ósea

Las células dendríticas de médula ósea se cultivaron usando el método descrito en ref.[44]. Las DCs se obtuvieron mediante disgregación del músculo y tejido adiposo del fémur y tibia de ratones hembras C57bl/6, estos se perfundieron con PBS 1X estéril y se pasaron por un filtro de células de 70 µm (*Cell Strainer*)(BD Falcon). Después se centrifugaron a 400 x g durante 6 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y los eritrocitos se lisaron con 3 mL de ACK (NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, EDTA di-sódico). Las DCs se sembraron en placas de cultivo celular hasta obtener un millón de células en medio RPMI con glutamina, suplementada con suero fetal bovino inactivado al 10%, 2% HEPES, 1% penicilina-estreptomicina y 40 ng/ml factor estimulante de colonias granulocito/macrófago (GM-CSF). Las células se incubaron a 37°C, a 100% de humedad y 5% CO<sub>2</sub>, después de 3 días se

añadió RPMI fresco con GM-CSF para duplicar el volumen original. Las DCs se estimularon con rSIP con (5- 10 µg/mL) y LPS (50ng/mL), usado como control positivo.

#### 5.5.2 Cultivo de células HEK-Blue™ hTLR

Las células HEK-Blue™ hTLR obtenidas comercialmente por InvivoGense cultivaron en placas de cultivo celular usando medio de cultivo DMEM con 4,5 g/L de glucosa, suplementada con suero fetal bovino inactivado al 10%, 100 mg/mL penicilina-estreptomicina, 100 mg/mL normocina y 2 mM de L- glutamina. Las células se incubaron a 37°C, a 100% de humedad y 5% CO<sub>2</sub>.

#### 5.5.3 Análisis de las DCs mediante citometría de flujo

Después de las 24 horas de estimulación se analizó la expresión de las moléculas co-estimuladoras, DC80, DC86, DC40 y MHCII por citometría de flujo, para ello se resuspendieron todas las células contenidas en los pocillos y se pasaron a tubos de citometría (BD Falcon) (1 pocillo/tubo). Luego las células se lavaron agregando 4 mL de amortiguador FACS (PBS 1X con BSA) y centrifugaron a 1.700 rpm por 6 min, se descartó el sobrenadante y se incubó con la combinación de 4 µL de anticuerpo marcado anti-CD80-PerCP-Cy5.5, CD40-FITC y CD86-PE en un volumen final de 100 µL de amortiguador FACS. Luego de 20 min de incubación en la oscuridad, se lavó el sedimento con amortiguador FACS y se centrifugó a 300 g por 7 min a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µL de amortiguador FACS y se mantuvieron en oscuridad hasta ser introducidas al citómetro de flujo FACSVerse, analizándose con el software FlowJo.

#### 5.5.4 Determinación de citoquinas IL-10 and IL12 en el sobrenadante de DCs

Para la determinación de la producción de citoquinas tratadas con LPS, rSIP y PBS1x como control de inmunización, el sobrenadante se colectó después de las 24 horas y medidas las citoquinas IL-12p70 e IL-10. Las cantidades de citoquinas liberadas al medio de cultivo se determinaron a 450 nm en microplacas de cultivo. La concentración de las muestras de citoquinas se calculó mediante una curva estándar generada por citoquinas recombinantes y los resultados fueron expresados en pg/mL.

### 5.5.5 Análisis de ligando de TLR

Las células HEK-Blue mTLR2y HEK-Blue mTLR4 se obtuvieron comercialmente de InvivoGen. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM en 4,5 g/L glucosa, 10% suero fetal bovino, 1x penicilina estreptomicina, 100 mg/mL neomicina y 2 mM L- glutamina, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> según indicaciones del proveedor. Las células HEK-Blue mTLR2 and HEK-Blue mTLR4 se sembraron en places de cultivo de 96 pocillos en una cantidad 5×10<sup>4</sup> células/pocillo, en los cuales se agregó 50 ng/μL de rSIP, 100 ng/mL de LPS de *E. coli* K12, péptidoglicano Pam3CSK4 (300 ng/mL,) como control positivo, rSIP purificada *P.pastori* y rSIP denaturada a 95°C por 10 min. Después de 24 horas de incubación de la microplaca a 37°C, la densidad óptica se midió a 620nm.

### 5.5.6. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como el promedio y la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t student y ANOVA con P-Values <0,05 considerado estadísticamente significativo.

## VI RESULTADOS

### 6.1 Obtener la proteína recombinante SIP

#### 6.1.1 Obtención de la proteína recombinante rSIP en *E. coli* BL21 (DE3) codón plus.

La proteína rSIP fue purificada de acuerdo a lo descrito en metodología. La proteína rSIP fue purificada desde extractos de *E. coli* BL21 (DE3). Se logró purificar 5,1 mg de rSIP. Esta proteína se ha identificado a través de un test rápido STREP (desarrollado en el proyecto FONDEF D10I1202) y electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado.

#### 6.1.2 Purificación de la proteína rSIP de *E. coli* BL21(DE3) mediante Cromatografía por exclusión molecular en HPLC.

Con el objetivo de obtener una proteína rSIP de alta pureza, libre de LPS y otras proteínas de *E. coli*, se procedió a purificar la proteína mediante cromatografía de exclusión molecular en alta presión (SEC o SEC-HPLC) de acuerdo a lo descrito en metodología. Se realizó utilizando las muestras de rSIP recolectadas de la purificación por cromatografía de afinidad Ni-NTA. Como se describió en el punto anterior, previo al análisis cromatográfico de las muestras se realizó la calibración de la columna de exclusión molecular, BioSep-SEC-s2000, utilizando estándar de proteína que está dentro del rango de trabajo de la columna (1 a 300 kDa). Se puede observar la superposición de los cromatogramas de los estándares y la proteína rSIP purificada, en donde se puede apreciar que el tiempo de retención ( $T_R$ ) para la proteína rSIP es de 8,41 min y además, los diferentes tiempos de retención para las muestras los estándares de proteínas utilizadas para la calibración (figura 2).

Una vez realizada la calibración, el cromatograma obtenido de la proteína rSIP purificada desde SEC-HPLC, presenta un tiempo de retención similar a una de las proteínas utilizadas para la calibración de la columna, la gamma-globulina. Sin embargo, se observa la presencia de co-elución y/o impurezas en el cromatograma en un  $T_R$ : 15,77 min (figura 3).

La purificación de la proteína rSIP optimizada desde SEC-HPLC, muestra un tiempo de retención similar a los observados anteriormente, sin observar co-elución y/o impurezas en un  $T_R$ : 15,77 min (figura 4).

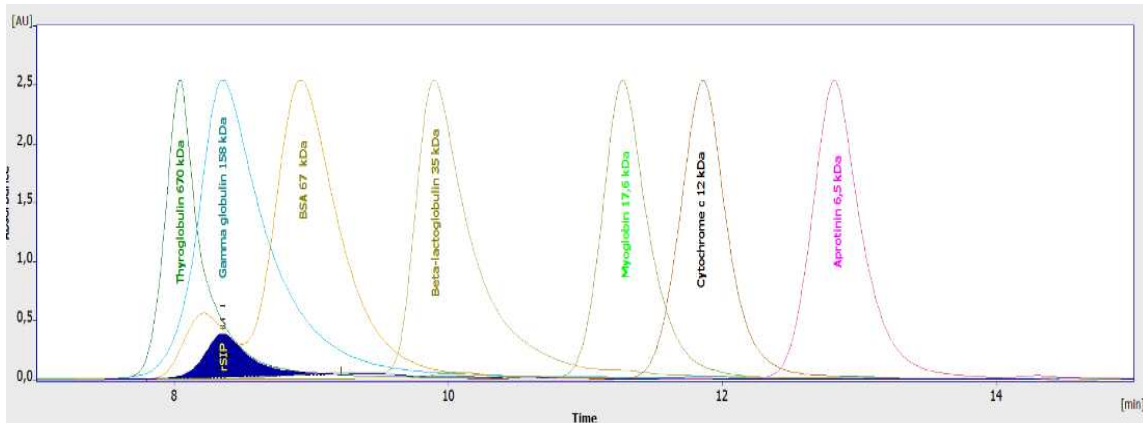


Fig.2. Superposición de cromatogramas obtenidos para las proteínas calibradoras de masa molecular usados en la determinación del tiempo de retención de la proteína rSIP. Tiempos de retención; gamma Globulina,  $T_R = 8,42$  min; BSA,  $T_R = 8,4$  min;  $\beta$  - lactoglobulina,  $T_R = 9,92$  min; mioglobina,  $T_R = 11,33$  min; citocromo c,  $T_R = 11,93$  min; aprotinina,  $T_R = 12,81$  min; rSIP,  $T_R = 8,41$  min. La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó en fosfato de sodio 34 mM y NaCl 0,5 M a pH: 6.6 a UV 280 nm con un columna BioSep-SEC-s2000 (300 mm x 21,2 mm x 5  $\mu$ m).

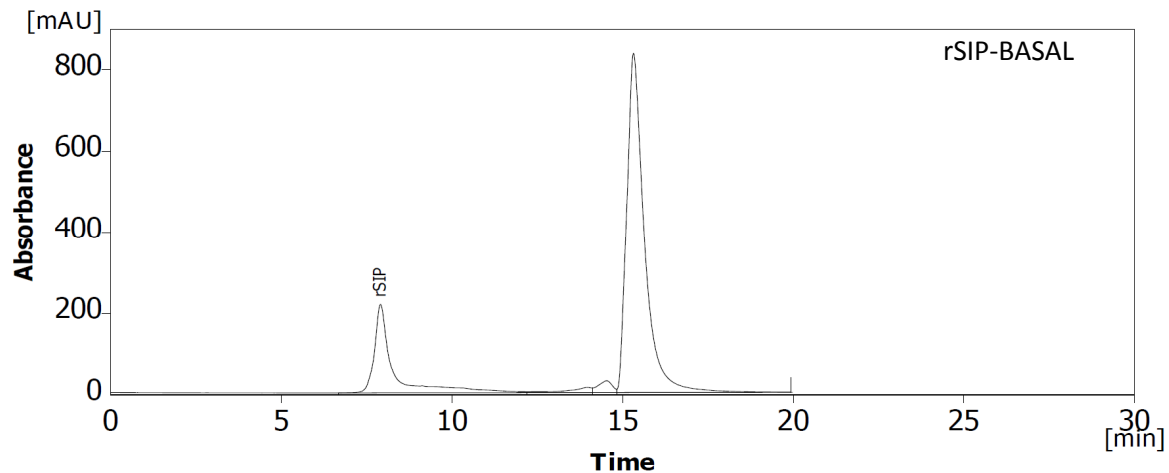


Fig 3 Perfil cromatográfico de rSIP purificado en condición basal. La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó en rSIP purificado por Ni-NTA en fosfato de sodio 34 mM y NaCl 0,5 M a pH:6.6 a UV 280 nm con una columna preparativa BioSep-SEC-s2000 (300 mm x 21,2 mm x 5  $\mu$ m). El pico cromatográfico de un tiempo de retención de 8.41 min corresponde a rSIP y el segundo pico cromatográfico de un tiempo de retención de 15,77 min corresponde a impurezas de la corrida. Los datos fueron recolectados digitalmente con el software de cromatografía Clarity.

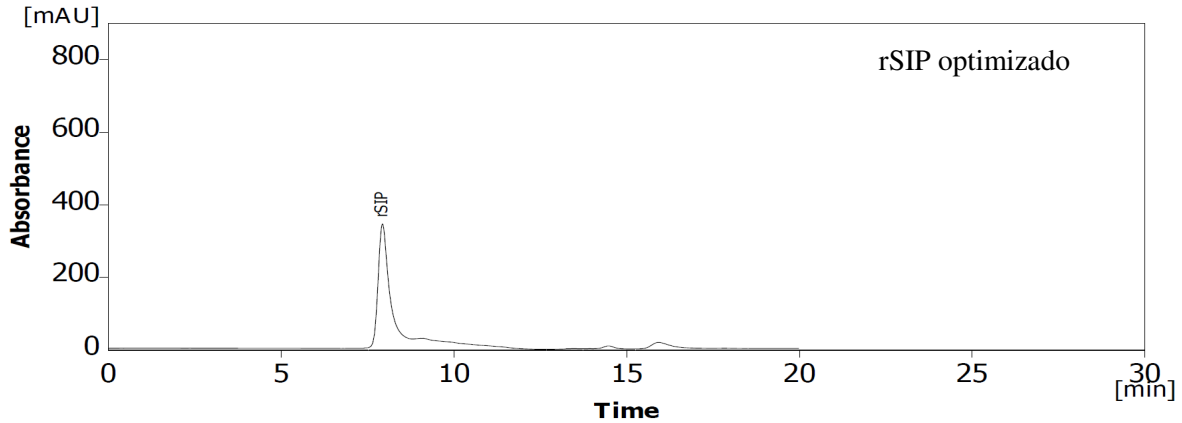


Fig.4 Perfil cromatográfico de rSIP purificado optimizado. La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó en rSIP obtenida del purificado en condición basal en fosfato de sodio 34 mM y NaCl 0,5 M a pH: 6.6 a UV 280 nm con una columna preparativa BioSep-SEC-s2000 (300 mm x 21,2 mm x 5  $\mu$ m). El pico cromatográfico de un tiempo de retención de 8.41 min corresponde a rSIP y libre de impurezas.

## 6.2. Identificación de la proteína recombinante purificada

### 6.2.1 El Test rápido STREP

Este test inmunocromatográfico fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología (FONDEF D10I1202) y ha permitido verificar la presencia de la proteína rSIP en el eluido de la columna de afinidad NI-NTA, de la columna SEC-HPLC y a su vez descartar que las impurezas corresponden a rSIP. En la fracción eluida a los 8,41 min se confirma la presencia de SIP y a su vez el eluido a 15,77 min da negativo para esta proteína (figura 5).

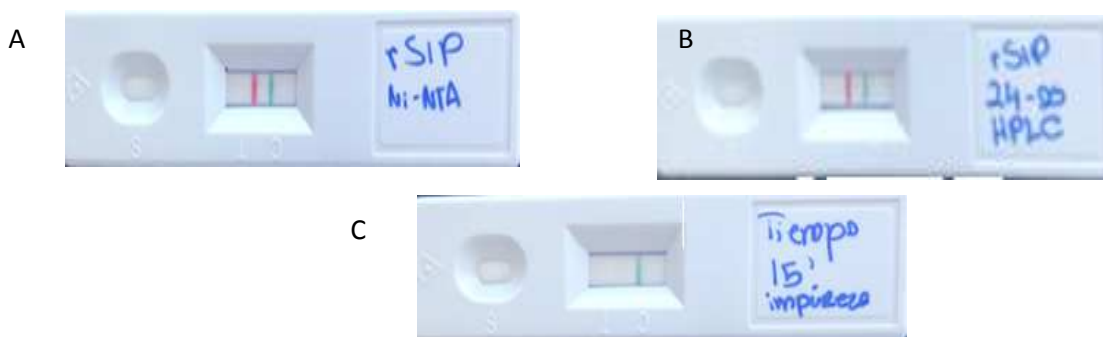
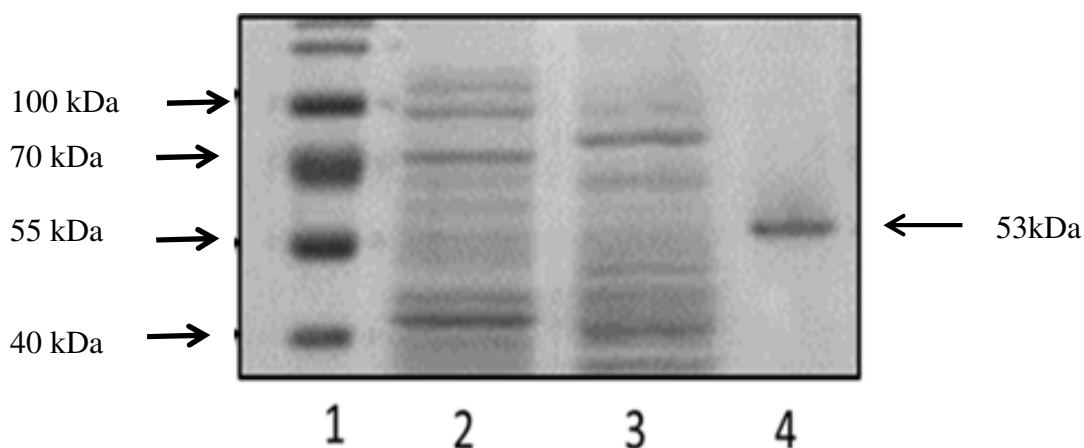


Fig. 5 Test rápido para detección de *S. agalactiae*, STREP B desarrollado con anticuerpos monoclonales. (A) Banda roja del kit inmunocromatográfico indica la presencia de rSIP obtenida desde la columna NI-NTA (B) Banda roja del kit inmunocromatográfico indica la presencia de rSIP obtenida mediante Cromatografía por exclusión molecular en HPLC de rSIP purificado optimizado. (C) Banda roja del kit inmunocromatográfico indica la ausencia de la rSIP obtenida mediante Cromatografía por exclusión molecular en HPLC de rSIP purificado en condición basal.

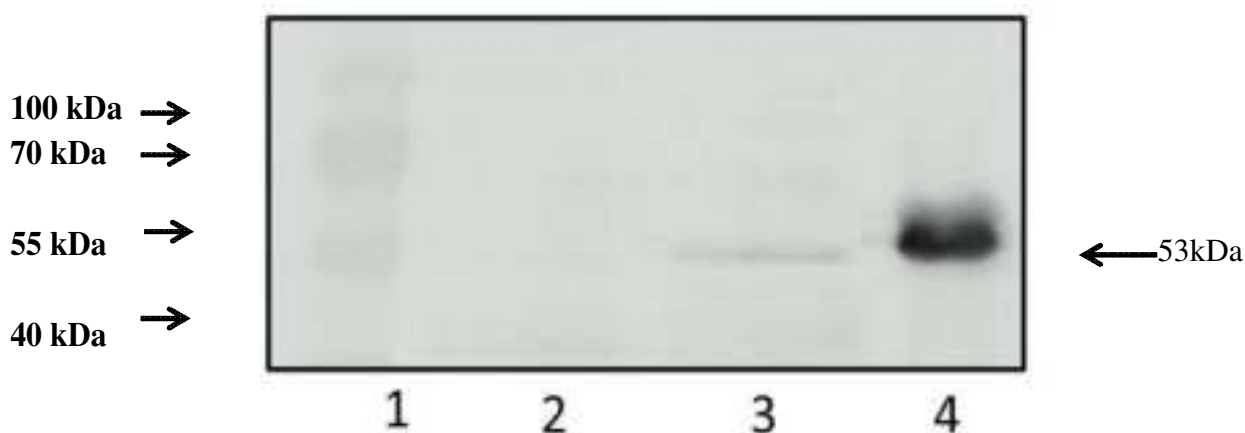


### 6.2.2 Electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado

La identidad de rSIP se analizó mediante electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado de acuerdo a lo descrito en la metodología. Como se muestra (figura 6) en el gel de SDS/PAGE se detecta que se obtuvo una proteína con un alto grado de pureza y no se observó degradación de esta proteína (bandas de menor masa molecular). La masa molecular de 53 kDa corresponde a lo descrito para la proteína SIP. Al realizar la electroinmunotransferencia se utilizó para revelar un anticuerpo anti-rSIP desarrollado en la sección de biotecnología del ISP, confirmando que la proteína recombinante de 53 kDa corresponde a rSIP (figura 7).



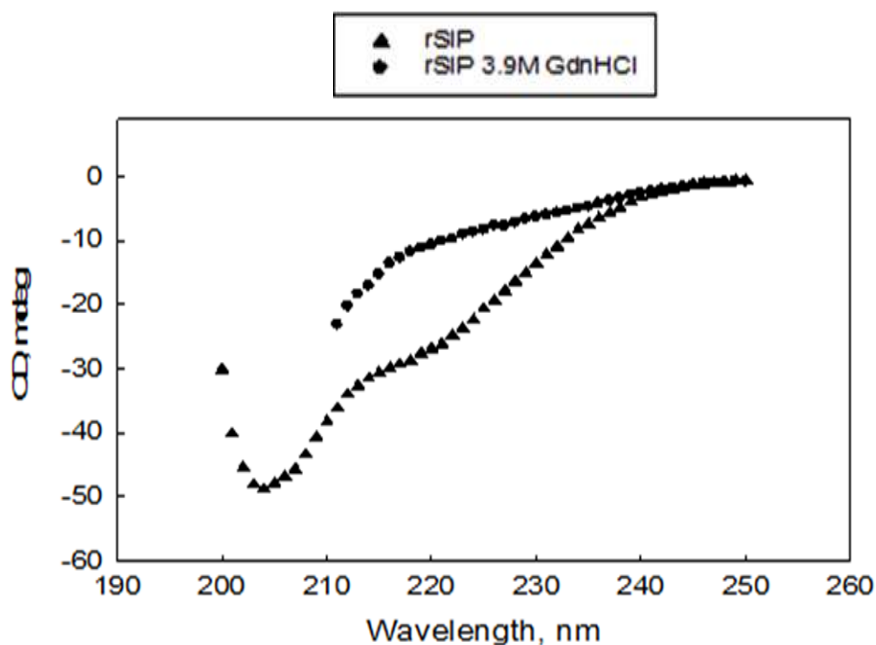
**Fig. 6. Análisis de expresión rSIP por SDS-PAGE al 12,5%.** Carril 1 estándar de masa molecular de amplio rango (190-10 kDa), Carriles 2 y 3 extracto bacteriano sin inducir y Carril 4 proteína rSIP purificada desde columna Ni-NTA.



**Fig. 7. Electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado usando anticuerpo policlonal contra rSIP.** Carril 1 Estándar de masa molecular preteñido (Thermo Scientific), Carril 2 control negativo sin inducir, Carril 3 Extracto bacteriano proveniente de la expresión de la proteína rSIP desde *E. coli* y Carril 4 proteína rSIP purificada desde columna Ni-NTA.

### 6.3 Analizar preliminarmente la estructura de la proteína rSIP

La alta pureza y calidad de la proteína rSIP obtenida por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) por HPLC, permitió realizar estudios de dicroísmo circular para determinar el tipo de estructura secundaria. Se trabajó con la proteína rSIP nativa en una cantidad 10  $\mu\text{M}$  y además con la misma proteína en presencia de 3,9 M GdnHCl. Al ser analizada a través del Programa Spectra Manager se aprecia que se encuentra mayoritariamente en una estructura secundaria de hoja beta (figura 8) ( $\Delta$ ), al observar algunas características típica de las curvas de dicroísmo circular, distinguiendo la forma del espectro en V en un máximo negativo de 200-210 para proteínas con estructura mayoritariamente hoja beta. Sin embargo, los espectros a veces resultan ser muy variables porque las hojas beta pueden ser paralelas o antiparalelas y por la variación en el largo y ancho. En la proteína rSIP tratada por 2 horas con GdnHCl se aprecia la existencia de un desplegamiento como se muestra (figura 8) ( $\bullet$ ). Estos resultados demuestran que la proteína recombinante generada tiene una estructuración hoja beta que puede ser desplegada con el GdnHCl. En resumen, estos resultados confirman que la proteína rSIP es adecuada para los estudios posteriores de su capacidad como adyuvante al ser estructurada.



**Fig.8.** Espectro de dicroísmo circular (DC) de la proteína rSIP. La proteína SIP fueron analizadas en dos condiciones: proteína rSIP nativa y rSIP en 3.9 GdnHCl. El programa Spectro manager determinó que la rSIP presenta una estructura mayoritariamente plegada. La espectroscopia de CD se realizó en el equipo Jasco 840. El espectro fue medido en la región lejana UV 260-190 nm.

## 6.4 Evaluar la capacidad de adyuvante de rSIP

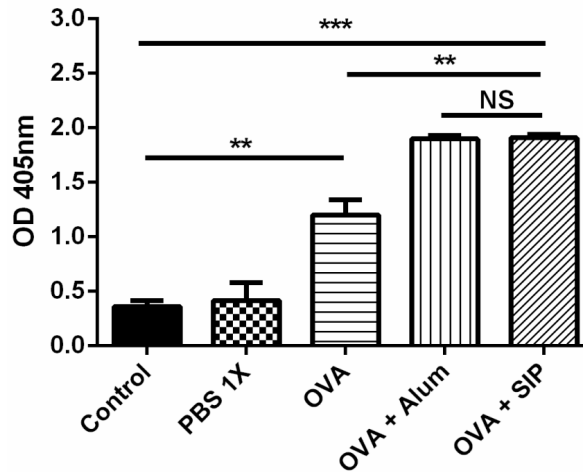
La determinación de la capacidad de adyuvante de la proteína rSIP se realizó mediante la evaluación de varios parámetros entre ellos anticuerpo anti-OVA del tipo IgG, citoquinas IL-12p70 e IL-10, moléculas co-estimuladoras DC86/80, CD40, MHCII y receptores TLR.

### 6.4.1 Efecto de la rSIP como adyuvante en la respuesta inmune

El suero obtenido del protocolo de inmunización de ratones C57BL/6 y procesados de acuerdo de manera descrita en metodología 5.41. La figura 9 muestra los resultados obtenidos del efecto de inductor de la secreción de anticuerpos anti-OVA al tratarlos con OVA, OVA-ALUM y con OVA-rSIP. Se puede observar en la figura 9, que OVA-rSIP aumenta el nivel de secreción de anticuerpos anti-OVA y aplicando una prueba de comparaciones múltiples entre OVA y OVA-rSIP se muestra que hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Esta misma prueba se realizó para comparar la inducción de anticuerpos anti-OVA con OVA-ALUM y con OVA-rSIP, encontrándose que no existen diferencias significativas en la secreción de anticuerpos en suero. Además, una inmunización con OVA-rSIP aumenta la inducción de anticuerpos IgG casi 5 veces sobre el valor de los controles del procedimiento de inmunización. Al comparar el control con la formulación OVA-rSIP y con OVA sola aumenta la inducción de anticuerpos estadísticamente significativa.

En resumen, la proteína rSIP formulada como adyuvante induce mayor cantidad de anticuerpos anti-OVA que la formulación con OVA sola y con OVA más adyuvante.

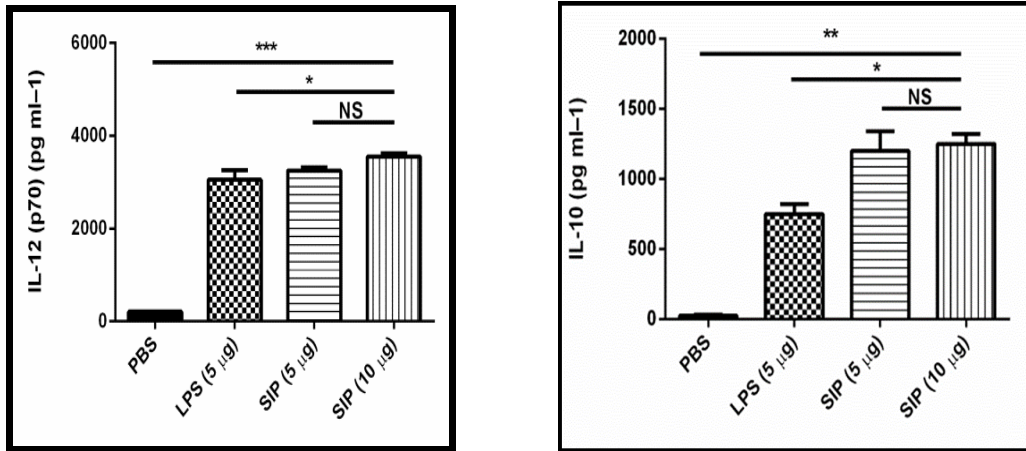
## Anti-OVA IgG1



**Fig. 9. Inducción de anticuerpos específicos anti-OVA del tipo IgG.** Cada grupo de ratones C57/BL6 (n=5) se inmunizaron con OVA, OVA/SIP, OVA/Alum en los días 0, 14, 28, 42. Se recogieron los sueros y diluyeron para una sola detección por ELISA 6 días después de la finalización de la última inmunización de refuerzo. Se sensibilizó cada placa de cultivo de 96 pocillos con OVA a 2µg/mL y se determinaron los niveles de absorbancia del anticuerpo anti-OVA IgG en suero y sueros control. Los ensayos se realizaron por triplicado y las barras representan la media  $\pm$  SD (\*\*\*\*p < 0.0001 and \*\*\*p < 0.001) se obtuvo por comparaciones múltiples de ANOVA para ratones inmunizados OVA/SIP en comparación con OVA+ALUM, OVA sola y control.

### 6.4.2 Efecto de la proteína rSIP sobre los niveles de citoquinas IL-12 y IL-10 en células dendríticas (DCs).

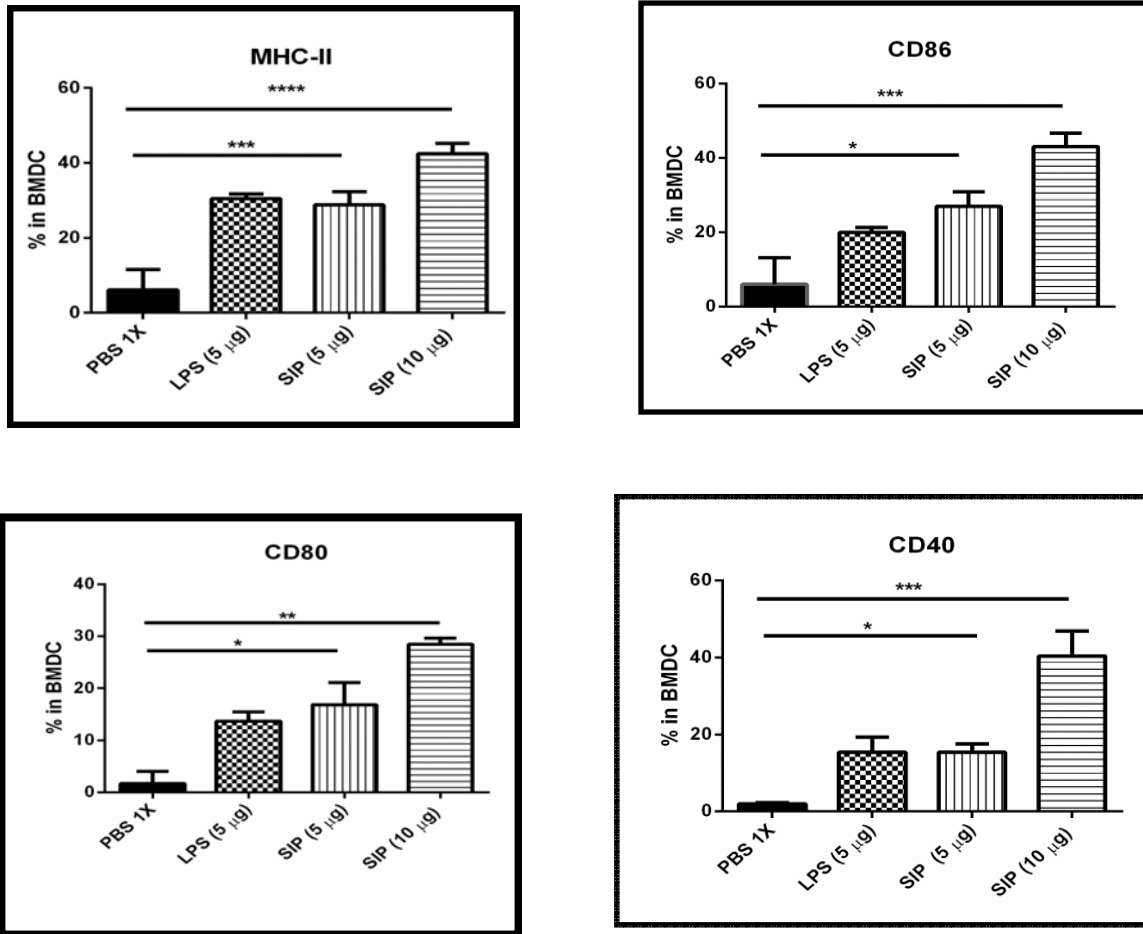
Se evaluaron los niveles de citoquinas en el sobrenadante las DCs en presencia de un pufo de rSIP. En la figura 10 se muestran los cambios en los niveles de las citoquinas IL-12 e IL-10 de los grupos de ratones inmunizados con 5 y 10 µg/mL rSIP comparando con los valores del control positivo (LPS) y además con PBS como control del procedimiento de inmunización. Como se ve en las figuras 10A y 10B, en los ratones inmunizados con 5 y 10 µg de rSIP las citoquinas IL-12 e IL-10 aumentan sus niveles no observándose diferencias significativas al trabajar con el doble de concentración de rSIP. Las comparaciones múltiples realizadas con el programa de gráficos GraphPad Prism utilizando mostraron que había diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0,05$ ). Resumiendo rSIP es eficiente en producir un aumento de ambas interleuquina, no encontrándose diferencias en las dos concentraciones utilizadas.



**Fig 10 Expresión de citoquinas IL-12 y IL-10 por SIP.** La determinación de las citoquinas fue realizada mediante ELISA. Los valores se presentan como promedio en unidades de pg./mL  $\pm$  desviación estándar de la medición de pocillos por duplicado. Las diferencias significativas con el grupo OVA y el grupo OVA-ALUM se calcularon mediante la prueba comparaciones múltiple ANOVA. Los grupos con diferencias significativas están destacadas con \* y no diferencias significativas con NS. La determinación se midió a 405 nm. Estas comparaciones múltiples se realizaron con el programa de gráficos GraphPad Prism utilizando un ( $p > 0,05$ ).

#### 6.4.3 Evaluación fenotípica en las células dendríticas de ratones C57/BL6 estimuladas con la proteína rSIP de *Streptococcus agalactiae*.

Se evaluaron los cambios fenotípicos a través de marcadores de superficie tales como DC86/80, DC40 y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHCII) característicos de CDs como marcadores de maduración, luego de haber sido sometidas a estímulo durante 24 horas. Se cultivaron las DCs durante 6 días, para luego estimularlas con diferentes concentraciones de rSIP (5 y 10  $\mu$ g/mL), como control positivo, las DCs se estimularon con LPS (5  $\mu$ g/mL), y como control negativo DCs sin estimularse agregó PBS1X. En la figura 11 se puede observar que la expresión de las moléculas CD80, CD40, CD86 y MHCII se incrementó de manera dependiente de la dosis en DCs estimuladas con SIP (5 y 10  $\mu$ g/mL). Como control positivo las DCs se estimularon con LPS (5  $\mu$ g/mL) y como control negativo, las DCs no tratadas retuvieron un fenotipo inmaduro.

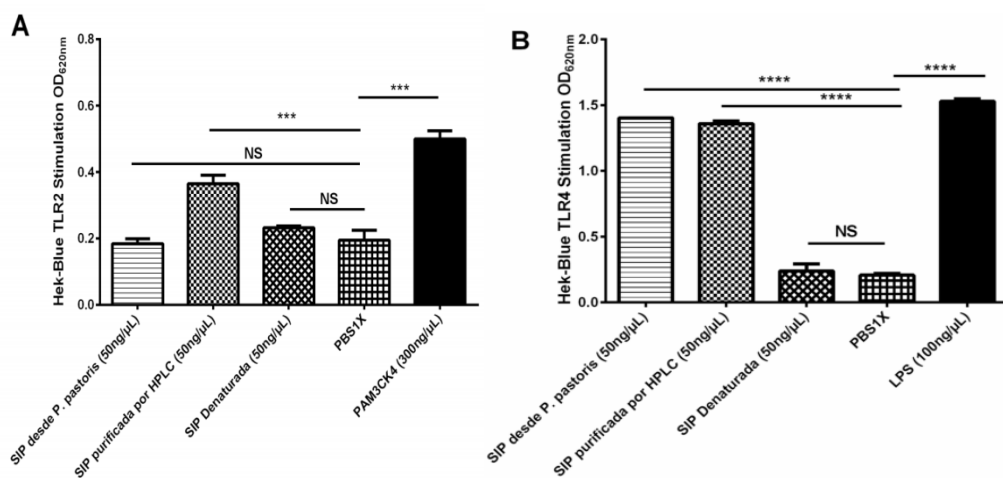


**Fig 11. Proteína SIP promueve la maduración de las DCs.** Las células progenitoras hemapoyéticas de médula ósea (BMDCs) de ratones C57BL/6 fueron cultivadas en presencia de GM-CSF por 6 días. Estas BMDCs fueron estimuladas con 5 µg y 10 µg de proteína rSIP por 24 h y LPS (5 µg) como control positivo. Los marcadores de superficie, CD86, CD80, CD40 y MHC-II fueron analizados por citometría de flujo. Los valores mostrados en los perfiles de citometría de flujo son índices MFI (\*\*\*\*p < 0.0001; \*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.01 por comparación de múltiples de ANOVA para la estimulación SIP en comparación PBS-1X).

#### 6.4.4 Evaluación de la proteína rSIP como ligando de TLR

Las células HEK-Blue mTLR2 and HEK-Blue mTLR4 provenientes de células comerciales, cultivadas según indicaciones del proveedor, se trataron con la proteína rSIP purificada desde HPLC, con LPS y peptidoglicano Pam3CSK4 como controles positivos, y además la rSIP denaturada y rSIP purificada de *Pichia pastoris* como control adicional. *P. pastoris* es una levadura que se caracteriza por ser un sistema de producción de proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales en la industria farmacéutica mediante la cual se obtuvo proteína rSIP.

En la figura 12 se observa que en la respuesta TLR2 asociada a estos receptores hay una diferencia estadísticamente significativa entre rSIP purificada desde HPLC y el control negativo de PBS 1X, y de igual manera al comparar control positivo peptidoglicano Pam3CSK4 con el control el negativo PBS 1X. Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativa al comparar los grupos entre la proteína rSIP denaturada y *P. pastori* comparadas con el control negativo PBS 1X (figura 12 A). En la respuesta TLR4 se observa al comparar los grupos experimentales una diferencia estadísticamente significativa entre rSIP purificada desde HPLC, rSIP purificada *P. pastori* con el negativo PBS 1X y además se observaron diferencias estadísticamente significativa entre control positivo LPS y el control negativo PBS 1X. Esta diferencia estadísticamente significativa no se aprecia al comparar los grupos entre la proteína rSIP denaturada y control de negativo PBS 1X. (figura 12 B). En resumen, se pudo establecer que en los grupos experimentales con la rSIP purificada desde HPLC es capaz de activar los receptores TLR.



**Fig. 12 La proteína SIP estimula la Hek-Blue TLR2 and TLR4.** Las células HEK-Blue mTLR2 and HEK-Blue mTLR4 fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos en una cantidad  $5 \times 10^4$  células/pocillo, en la cuales la proteína rSIP purificada desde HPLC fue agregada a las células en una concentración 50 ng/μL, LPS de *E. coli* K12 (100 ng/mL), peptidoglicano Pam3CSK4 (300 ng/mL) como control positivo, rSIP purificada *P.pastori* y rSIP denaturada a 95°C por 10 min como controles adicionales y medidas a una densidad óptica fue medida 620nm. Los valores de DO se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar. Los grupos con diferencias significativas están destacadas con \* y no diferencias significativas con NS.

## VII Discusión

El estreptococo del grupo B (SGB, por sus siglas en inglés) es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad infantil en todo el mundo, con vacunas desarrolladas durante más de cuatro décadas, pero ninguna tiene licencia hasta la fecha [45]. La inmunización subcutánea con la proteína inmunogénica de superficie (SIP) genera una disminución de la colonización vaginal por SGB en un modelo murino [46] y un alto nivel de anticuerpos contra esta proteína. Además, la inmunización oral con SIP aumenta el nivel de anticuerpos específicos contra el SGB. Debido al potencial inmunogénico de rSIP, evaluamos la capacidad de rSIP para generar una respuesta inmune como adyuvante de vacuna. En este estudio, se ha purificado, realizados estudios sobre su estructura secundaria y caracterizado la capacidad adyuvante de rSIP de SGB expresada por *E. coli*. El alto nivel de pureza de la proteína obtenida y haber confirmado que mantiene una estructuración beta ha permitido evaluar el efecto de la respuesta de rSIP sobre la inmunoglobulina específica de OVA, maduración de las células dendríticas, estimulación de las células Hek-Blue TLR2 y TLR4. Diferentes ligandos de organismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Entamoeba histolytica*, se han descrito como ligandos para TLR2 y TLR4 [31]. La descripción de la caracterización fenotípica de las células HEK-Blue-4 (informador TLR4) y HEK-Blue-2 (informador TLR2), así como sus especificidades de ligando a varios TLR4 y TLR2, se han descrito anteriormente y validados previamente por lo que se ha utilizan en esta tesis [47].

Se ha demostrado en este trabajo que rSIP de SGB obtenido y purificado por HPLC, estimula las células HEK-Blue-4 y HEK-Blue-2. Esta observación se apoya en el hecho de que rSIP estimula la maduración de las DCs y aumenta el nivel de anticuerpos IgG. Este es un resultado relevante en el desarrollo de SIP como un posible adyuvante de vacunas y/o inmunógeno contra el SGB. A pesar del éxito de que SIP es un agonista de TLR2 y TL4 y un adyuvante inmune potencial, una de las limitaciones plausibles del mecanismo de acción actual es evaluar el antígeno específico de la respuesta inmune celular potencialmente protectora. Las mejoras futuras en la obtención de SIP podrían involucrar el uso de *P. pastoris*, encapsulación para la entrega mejorada y administración en conjunto con la



nucleoproteína F del virus respiratorio sincicial la cual podría proteger a los bebés contra ambas enfermedades.

Las relaciones estructura-actividad podrían determinar la unión de TLR y la estimulación consecuente de la respuesta inmune innata, que se ha investigado para una gama de lipopéptidos [48]. En este trabajo, se utilizó la proteína rSIP desde *P. pastori* y rSIP denaturada, rSIP nativa de SGB. De los resultados de estimulación de las células Hek-blue, se dedujo que la estructura conformacional del SIP es necesaria para la estimulación con TLR, ya que se no apareció estimulación para los TLR en la condición rSIP denaturada y ni tampoco una estimulación en TLR4 para rSIP obtenido de *P. pastori*. Este enfoque indica que SIP tiene un epítoto conformacional que podría ser esencial para la actividad adyuvante de la vacuna. En este contexto, se estima que la mayoría de los epítotos de células B (hasta el 90%) son conformacionales [49]. Esto podría explicar el aumento en el nivel de anticuerpos anti-OVA en ratones inmunizados con SIP como adyuvante de vacuna.

En general, la maduración de las DCs aumenta su capacidad de presentación de antígenos y su capacidad para activar las células T y es un requisito previo para la inducción de una inmunidad duradera, crucial en la interfaz entre las respuestas inmunes innatas y adaptativas [50]. Los adyuvantes generalmente actúan activando respuestas inmunes innatas y adaptativas que producen la maduración de las DCs. En este trabajo, el rSIP indujo la maduración de las DCs de la médula ósea, apoyada por el cambio de la morfología (datos no mostrados) y la expresión de los marcadores de la superficie celular CD86/80, DC40 y MHCII, donde se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar la proteína rSIP de 5-10 µg en comparación con control de PBS.

Además, rSIP induce la secreción de citoquinas IL-10 e IL-12 de las DCs maduras, que es esencial para regular la respuesta inmune Th1 y Th2 respectivamente inducida por TLR2 y TLR 4 [51]. Esto sugiere que el rSIP tiene el potencial de estimular la maduración de las DC, activar la respuesta Th1 y Th2 y ser un agonista de TLR2 y TLR4.

En las vacunas, la naturaleza del adyuvante contribuye a modificar las propiedades proinflamatorias. Los niveles de anticuerpo, cambio de isotipo y citoquinas antiinflamatorias IL-4 y IL-6 y citoquinas proinflamatorias IFN-γ e IL-2 favorecen una

polarización hacia una respuesta Th1 y TH2 más robusta, es por eso sería necesario aumentar el perfil de citoquinas, niveles de anticuerpo y subclase para confirmar una respuesta inmune Th1 / Th2 [52].

El papel de las TLR en infecciones bacterianas *in vivo* se ha estudiado en ratones deficientes en TLR individuales. *Salmonella typhimurium*, una bacteria gramnegativa que puede replicarse dentro de los macrófagos, tiene al menos cuatro PAMPs detectados por los TLR: lipoproteína (TLR2), LPS (TLR4), flagelina (TLR5) y CpG-DNA (TLR9) [53]. En el caso de SGB, contiene ligandos no descritos para TLR2 y TLR4 [54]. En el caso de TLR-2, SGB lo hace a través de lipoproteínas, y esta interacción es importante para el resultado de la sepsis por SGB *in vivo* [55]. Por su parte, el TLR4 no está implicado en las respuestas proinflamatorias por SGB en macrófagos de ratones. **Nuestros resultados son una novedad que describe el primer ligando de SGB para TLR2 y TLR4. Esto podría ser beneficioso en el desarrollo de un adyuvante de vacunas, debido a que los adyuvantes basados en el ligando TLR4 son los más avanzados en vacunas comerciales [56] y el adyuvante TLR2 ha atraído un gran interés como un adyuvante eficaz para vacunas contra enfermedades infecciosas [57].**

TLR2 y TLR 4 se expresan en diversas células inmunitarias, incluidos los neutrófilos, los monocitos/macrófagos y las DCs. Entre estos, los neutrófilos primero migran al sitio de la infección, detectan el patógeno y provocan una respuesta inmune. Sin embargo, la activación coordinada de la respuesta adaptativa está mediada a través de la unión de un ligando específico a los monocitos o DC que también están mediados principalmente por TLR2 y TLR 4. Además; estos TLR también se expresan en células inmunes adaptativas clásicas como los linfocitos B y T [31].

Esto se correlaciona con el informe anterior de que el SIP como una vacuna contra el SGB genera un reclutamiento de neutrófilos en el sitio de la infección, una respuesta inmune celular contra la infección bacteriana y anticuerpos opsonizantes funcionales [57]. Nuestros resultados apoyan la noción de que SIP es agonista de TLR2 y TLR4, lo que podría considerarse para un adyuvante de vacuna. Teniendo en cuenta que la administración de vacunas de proteínas a humanos ha demostrado ser segura, y los estudios

de inmunogenicidad del SIP se encuentran en la etapa preclínica avanzada, esta proteína es una candidata para un posible adyuvante de nueva vacuna.

## VIII Conclusiones

- La proteína rSIP tiene la capacidad de estimular la maduración de células dendríticas, la cual expresa las señales necesarias para la activación de linfocitos T, entre las cuales se destacan MCH II, moléculas co-estimulador CD80/86, DC40 y citoquinas IL-12 y IL-10
- rSIP purificada desde *E. coli* es un ligando de TLR 2 y TLR4, característica descrita como favorable para estimular una respuesta inmune protectora contra patógenos bacterianos
- rSIP en solución presenta una estructura mayoritariamente hoja beta en su estado plegado. En este estado plegado es en el que se observa la propiedad de adyuvante descrita en este trabajo, puesto que al denaturar rSIP, pierde la capacidad de estimular TLR 2 y TLR 4.

## IX Referencias

- [1] Tazi, A., Bellais, S., Tardieux, I., Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., & Poyart, C. (2012). Group B *Streptococcus* surface proteins as major determinants for meningeal tropism. *Current opinion in microbiology*, 15(1), 44-49.
- [2] Cieslewicz, M. J., Chaffin, D., Glusman, G., Kasper, D., Madan, A., Rodrigues, S., & Rubens, C. E. (2005). Structural and genetic diversity of group B *streptococcus* capsular polysaccharides. *Infection and immunity*, 73(5), 3096-3103.
- [3] Shet, A., & Ferrieri, P. (2004). Neonatal & maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. *Indian Journal of Medical Research*, 120(3), 141.
- [4] Tenenbaum, T., Bloier, C., Adam, R., Reinscheid, D. J., & Schrotten, H. (2005). Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. *Infection and immunity*, 73(7), 4404-4409.
- [5] Kim, Y. S., Sheldon, R. A., Elliott, B. R., Liu, Q., Ferriero, D. M., & Täuber, M. G. (1995). Brain injury in experimental neonatal meningitis due to group B streptococci. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 54(4), 531-539.
- [6] Cutting, A. S., Del Rosario, Y., Mu, R., Rodriguez, A., Till, A., Subramani, S. Doran, K. S. (2014). The role of autophagy during group B *Streptococcus* infection of blood-brain barrier endothelium. *Journal of Biological Chemistry*, 289(52), 35711-35723.
- [7] Maisey, H., Doran, K., Nizet, V. (2009) Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Review in Molecular Medicine* 10, 1-16.

- [8] Kobayashi, M., Schrag, S. J., Alderson, M. R., Madhi, S. A., Baker, C. J., Sobanjo-ter Meulen, A., Vekemans, J. (2016). WHO consultation on group B *Streptococcus* vaccine development: report from a meeting held on 27–28 April 2016. *Vaccine*.
- [9] Madhi, S. A., Koen, A., Cutland, C. L., Jose, L., Govender, N., Wittke, F., & Narasimhan, V. (2017). Antibody kinetics and response to routine vaccinations in infants born to women who received an investigational trivalent group B *Streptococcus* polysaccharide CRM197-conjugate vaccine during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*, 65(11), 1897-1904.
- [10] Brodeur, B. R., Boyer, M., Charlebois, I., Hamel, J., Couture, F., Rioux, C. R., & Martin, D. (2000). Identification of group B *streptococcal* Sip protein, which elicits cross-protective immunity. *Infection and immunity* 68(10), 5610-5618.
- [11] Rioux, S., Martin, D., Ackermann, H. W., Dumont, J., Hamel, J., Brodeur, B. R. (2001). Localization of surface immunogenic protein on group B *streptococcus*. *Infection and immunity*, 69(8), 5162-5165.
- [12] Soto, J. A., Díaz-Dinamarca, D. A., Soto, D. A., Barrientos, M. J., Carrión, F., Kalergis, A. M., & Vásquez, A. E. (2019). Cellular immune response induced by surface immunogenic protein with AbISCO-100 adjuvant vaccination decreases group B *Streptococcus* vaginal colonization. *Molecular immunology*, 111, 198-204.
- [13]. Gupta, R. K. (1998). Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced drug delivery reviews*, 32(3), 155-172.
- [14] Resik, S., Tejeda, A., Mach, O., Fonseca, M., Diaz, M., Alemany, N., & Sutter, R. W. (2018). Does Simultaneous Administration of Bivalent (Types 1 and 3) Oral Poliovirus Vaccine and Inactivated Poliovirus Vaccine Induce Mucosal Cross-immunity to Poliovirus Type 2. *Clinical Infectious Diseases*, 67(suppl\_1), S51-S56.).

- [15] Morris Quevedo, H. J., Martínez Manrique, C., Abdala Díaz, R. T., & Campos Orama, D. (1999). Adyuvantes inmunológicos. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(2), 130-137.
- [16] Tello-Solís, S. R., Arroyo-Reyna, A. (2002). Estudio por difracción circular de la desnaturalización térmica de la subtilisina BPN': Modelo irreversible de dos estados. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46(2), 105-108.
- [17] Ragunathan, P., Ponnuraj, K. (2011). Expression, purification and structural analysis of a fibrinogen receptor FbsA from *Streptococcus agalactiae*. *The protein journal*, 30(3), 159-166.
- [18] Toussi, D. N., Liu, X., & Massari, P. (2012). The FomA porin from *Fusobacterium nucleatum* is a Toll-like receptor 2 agonist with immune adjuvant activity. *Clin. Vaccine Immunol*, 19(7), 1093-1101.
- [19] Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, 1(6), 2876.
- [20] Wetzler, L. M., Ho, Y., Reiser, H., & Wetzler, L. W. (1996). Neisseria porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. *Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1151-1159.
- [21] Fusco, P. C., Michon, F., Laude-Sharp, M., Minetti, C. A., Huang, C. H., Heron, I., & Blake, M. S. (1998). Preclinical studies on a recombinant group B meningococcal porin as a carrier for a novel Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine. *Vaccine*, 16(19), 1842-1849.
- [22] Christodoulides, M., Brooks, J. L., Rattue, E., & Heckels, J. E. (1998). Immunization with recombinant class I outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of liposomes and adjuvants on antibody avidity, recognition of native protein and the

induction of a bactericidal immune response against meningococci. *Microbiology*, 144(11), 3027-3037.

[23] Massari, P., King, C. A., MacLeod, H., & Wetzler, L. M. (2005). Improved purification of native meningococcal porin PorB and studies on its structure/function. *Protein expression and purification*, 44(2), 136-146.

[24] Anbazhagan, V., Vijay, N., Kleinschmidt, J. H., & Marsh, D. (2008). Protein– Lipid Interactions with *Fusobacterium nucleatum* Major Outer Membrane Protein FomA: Spin-Label EPR and Polarized Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, 47(32), 8414-8423.

[25] Kleinschmidt, J. H. (2006). Folding kinetics of the outer membrane proteins OmpA and FomA into phospholipid bilayers. *Chemistry and physics of lipids*, 141(1), 30-47.

[26] Pocanschi, C. L., Apell, H. J., Puntervoll, P., Hugh, B., Jensen, H. B., Welte, W., & Klein Schmidt, J. H. (2006). The major outer membrane protein of *Fusobacterium nucleatum* (FomA) folds and inserts into lipid bilayers via parallel folding pathways. *Journal of molecular biology*, 355(3), 548-561.

[27] Ho, N. I., in't Veld, L. G. H., Raaijmakers, T. K., & Adema, G. J. (2018). Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: the key to more effective vaccines. *Frontiers in immunology*, 9.

[28] Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 5(10), 987.

[29] Van Haren, S. D., Ganapathi, L., Bergelson, I., Dowling, D. J., Banks, M., Samuels, R. C., & Levy, O. (2016). In vitro cytokine induction by TLR-activating vaccine adjuvants in human blood varies by age and adjuvant. *Cytokine*, 83, 99-109.

[30] Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., & Akira, S. (1999). Unresponsiveness



of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11(1), 115-122.

[31]Mukherjee, S., Karmakar, S., & Babu, S. P. S. (2016). TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), 193-204.

[32]Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245.

[33]Kalergis, A. M. (2003). Modulation of T cell immunity by TCR/pMHC dwell time and activating/inhibitory receptor pairs on the antigen-presenting cell. *Current pharmaceutical design*, 9(3), 233-244.

[34].Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., & Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260(5107), 547-549.

[35]Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of immunology*, 136(7), 2348-2357.

[36]Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., & Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260(5107), 547-549.

[37]Scott, P. (1993). IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science*, 260(5107), 496-498.

- [38] Vidova, B., Chotar, M., Godany, A. (2009). N-terminal anchor in surface immunogenic protein of *Streptococcus agalactiae* and its influence on immunity elicitation. *Folia microbiologica*, 54(2), 161-166
- [39] Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, 1(6), 2876.
- [40] Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. In *Methods in enzymology* Vol. 131, pp. 266-280. Academic Press.
- [41] Benjwal, S., Verma, S., Röhm, K. H., & Gursky, O. (2006). Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. *Protein Science*, 15(3), 635-639.
- [42] Díaz-Dinamarca, D. A., Jerias, J. I., Soto, D. A., Soto, J. A., Díaz, N. V., Leyton, Y. Y., & Vásquez, A. E. (2018). The optimisation of the expression of recombinant surface immunogenic protein of group B *Streptococcus* in *Escherichia coli* by response surface methodology improves humoral immunity. *Molecular biotechnology*, 60(3), 215-225.
- [43] Le Doare, K., Kampmann, B., Vekemans, J., Heath, P. T., Goldblatt, D., Nahm, M. H., ... & Madhi, S. A. (2019). Serocorrelates of protection against infant group B streptococcus disease. *The Lancet Infectious Diseases*.
- [44] Liu, X., Wetzler, L. M., & Massari, P. (2008). The PorB porin from commensal *Neisseria lactamica* induces Th1 and Th2 immune responses to ovalbumin in mice and is a potential immune adjuvant. *Vaccine*, 26(6), 786-796.
- [45] Diaz-Dinamarca, D. A., Soto, D. A., Leyton, Y. Y., Altamirano-Lagos, M. J., Avendaño, M. J., Kalergis, A. M., & Vásquez, A. E. (2018). Oral vaccine based on a surface immunogenic protein mixed with alum promotes a decrease in *Streptococcus agalactiae* vaginal colonization in a mouse model. *Molecular immunology*, 103, 63-70.

[46]Hood, J. D., Warshakoon, H. J., Kimbrell, M. R., Shukla, N. M., Malladi, S. S., Wang, X., & David, S. A. (2010). Immunoprofiling toll-like receptor ligands: Comparison of immunostimulatory and proinflammatory profiles in ex vivo human blood models. *Human vaccines*, 6(4), 322-335.

[47] Zaman, M., & Toth, I. (2013). Immunostimulation by synthetic lipopeptide-based vaccine candidates: structure-activity relationships. *Frontiers in immunology*, 4, 318.

[48]Liljeroos, L., Malito, E., Ferlenghi, I., & Bottomley, M. J. (2015). Structural and computational biology in the design of immunogenic vaccine antigens. *Journal of immunologyresearch*, 2015.

[49] Ho, N. I., in't Veld, L. G. H., Raaijmakers, T. K., & Adema, G. J. (2018). Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: the key to more effective vaccines?. *Frontiers in immunology*, 9.

[50]He, L., Zang, A., Du, M., Ma, D., Yuan, C., Zhou, C., & Deng, Q. (2015). mTOR regulates TLR-induced c-fos and Th1 responses to HBV and HCV vaccines. *Virologica Sinica*, 30(3), 174-189

[51]Kaisho, T., & Akira, S. (2002). Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1589(1), 1-13

[52] Gerold, G., Zychlinsky, A., & Juana, L. (2007). What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections?. In *Seminars in immunology* (Vol. 19, No. 1, pp. 41-47). Academic Press.

[53]Henneke, P., O. Takeuchi, J. A. van Strijp, H.-K. Guttormsen, J. A. Smith, A. B. Schromm, T. A. Espevik, S. Akira, V. Nizet, D. L. Kasper, and D. T. Golenbock. 2001. Novel engagement of CD14 and multiple Toll-like receptors by group B streptococci. *J. Immunol.* 167: 7069 –7076.

[54]Henneke, P., Dramsi, S., Mancuso, G., Chraibi, K., Pellegrini, E., Theilacker, C., &Poyart, C. (2008). Lipoproteins are critical TLR2 activating toxins in group B streptococcal sepsis. *TheJournal of Immunology*, 180(9), 6149-6158.

[55]Reed, S. G., Hsu, F. C., Carter, D., & Orr, M. T. (2016). The science of vaccine adjuvants: advances in TLR4 ligand adjuvants. *Current opinion in immunology*, 41, 85-90.

[56]Lei, Y., Zhao, F., Shao, J., Li, Y., Li, S., Chang, H., & Zhang, Y. (2019). Application of built-in adjuvants for epitope-based vaccines. *PeerJ*, 6, e6185.

[57]Soto, J. A., Díaz-Dinamarca, D. A., Soto, D. A., Barrientos, M. J., Carrión, F., Kalergis, A. M., &Vásquez, A. E. (2019). Cellular immune response induced by surface immunogenic protein with AbISCO-100 adjuvant vaccination decreases group B *Streptococcus* vaginal colonization. *Molecular immunology*, 111, 198-204.