



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

**DESARROLLO Y EVALUACION DE UN VEHICULO BASADO EN ISCOMS  
QUE CONTIENE LA PROTEINA PorA DE *Neisseria meningitidis***

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

**KARINA ANDREA GUTIÉRREZ ROMÁN**

PROFESOR PATROCINANTE  
Dr. Q.F. Jorge Chávez A.  
Dpto. de Ciencias y Tecnología  
Farmacéutica  
Universidad de Chile

DIRECTORES DE TESIS  
Q.F. Karina Valdés  
Dpto. de Ciencias y Tecnología  
Farmacéutica  
Universidad de Chile

BQ. Abel Vásquez  
Instituto de Salud Pública

Santiago, Chile  
2006

**Dedicado con mucho cariño  
a mis papás**

El verdadero conocimiento y la auténtica libertad se hallan en  
Jesús.  
Dejad que Jesús forme parte siempre de vuestra hambre de  
verdad y

justicia, y de vuestro compromiso por el bienestar de vuestros  
semejantes.  
S.S. Juan Pablo II

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de forma muy especial a mi familia, por el gran amor que me dan cada día. A mis papás, Eduardo y Angélica, que me transmitieron su fortaleza y que gracias a sus oraciones me alentaron en este camino. A mi tía Yoly, que siempre ha estado a mi lado dándome su cariño incondicionalmente.

A María Victoria, por su amistad y apoyo durante toda la carrera y por sobre todo en el desarrollo de la tesis.

A Cristian que brindó su ayuda y experiencia en la primera parte de este trabajo “la fabricación de los ISCOMs”.

A los profesores Jorge y Karina por todos sus consejos y conocimientos que fueron de utilidad, especialmente en los momentos difíciles.

A todas las personas que trabajan en la universidad y que colaboraron de una u otra manera.

A Abel por recibirme cordialmente en su laboratorio en el ISP y por su preocupación en el trabajo durante este tiempo.

A Ricardo por realizar el ensayo de anticuerpos bactericidas.

A Bárbara, Patty, Daniel y a todas las personas que en ISP ayudaron para que este trabajo pudiese ser llevado a cabo.

No puedo dejar de mencionar a Juan Pablo, a quien conocí durante este proceso, y que me ha ayudado y dado mucho ánimo para seguir en esto hasta el final.

A todos Muchas Gracias.

## INDICE GENERAL

Contenido	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice General.....	iv
Índice de Tablas.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
Summary.....	x
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Hipótesis de Trabajo.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>8</b>
3.1 Objetivo General.....	8
3.2 Objetivos Específicos.....	8
<b>4. Materiales y Métodos.....</b>	<b>9</b>
4.1 Materiales.....	9
4.1.1 Materias primas.....	9
4.1.2 Materiales y reactivos.....	9
4.2 Métodos.....	10
4.2.1 Transformación de células competentes E. coli BL-21(DE3).....	10
4.2.2 Expresión y purificación de proteína PorA.....	10
4.2.2.1 Expresión.....	10
4.2.2.2 Purificación.....	11
4.2.2.3 Análisis de expresión y purificación.....	13
4.2.3 Obtención de ISCOMs.....	13
4.2.3.1 Solubilización de componentes lipídicos.....	14
4.2.3.2 Incorporación de las saponinas.....	14
4.2.3.3 Diálisis.....	14
4.2.4 Obtención de ISCOMs cargados con PorA.....	15
4.2.5 Purificación de ISCOMs cargados.....	15
4.2.6 Análisis de las partículas de ISCOM.....	16

	<b>Página</b>
4.2.6.1 Estructura y forma de las partículas de ISCOMs.....	16
4.2.6.2 Determinación de la cantidad de proteína en los ISCOMs.....	16
4.2.7 Inmunización.....	16
4.2.8 Análisis de los sueros.....	17
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>19</b>
5.1 Expresión de la proteína PorA de <i>Neisseria meningitidis</i> usando para ello clones del vector pET-21a- <i>porA</i> en células <i>E. coli</i> BL-21(DE3).....	19
5.2 Purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad.....	20
5.3 Formación de ISCOM y de ISCOM-PorA.....	22
5.3.1 Formulación y obtención de ISCOM y de ISCOM-PorA por el método de diálisis.....	22
5.3.2 Microscopía electrónica de transmisión aplicada a los ISCOM-PorA.....	23
5.3.3 Cuantificación de proteína inserta en el vehículo mediante un método colorimétrico.....	26
5.3.4 Inmunización y evaluación de la respuesta inmune mediante la determinación de anticuerpos bactericidas.....	28
<b>6. Conclusiones</b> .....	<b>34</b>
<b>7. Bibliografía</b> .....	<b>35</b>
<b>8. Anexos</b> .....	<b>40</b>

## INDICE DE TABLAS

	<b>Pagina</b>
Tabla 1 Descripción de los reactivos y las concentraciones más apropiadas, a la cual se obtuvo la mejor purificación.....	12
Tabla 2 Formulación de ISCOM.....	13
Tabla 3 Condiciones de la diálisis.....	14
Tabla 4 Formulación de ISCOM-PorA.....	15
Tabla 5 Distribución de los grupos de ratones utilizados para la inmunización, se adjunta el volumen administrado en $\mu\text{L}$ (microlitros) en cada caso.....	17
Tabla 6 Concentración, cantidad en microgramos ( $\mu\text{g}$ ) y porcentaje de proteína identificados en las distintas fracciones estudiadas.....	26
Tabla 7 Número de colonias promedio en las distintas diluciones para ISCOM y ISCOM-PorA ( $25\mu\text{g}$ ).....	45
Tabla 8 Número de colonias promedio en las distintas diluciones para ISCOM+PorA ( $12\mu\text{g}$ ).....	46
Tabla 9 Número de colonias promedio en las distintas diluciones para ISCOM+PorA ( $4\mu\text{g}$ ).....	46
Tabla 10 Número de colonias promedio en las distintas diluciones para PorA ( $10\mu\text{g}$ ).....	46

## INDICE DE FIGURAS

		<b>Pagina</b>
Figura 1	Esquema que muestra la estructura del ISCOM matriz.....	2
Figura 2	Esquema que muestra la posible disposición de los distintos componentes que estructuran al ISCOM.....	2
Figura 3	Esquema de un ISCOM con proteínas insertas en su membranas.....	3
Figura 4	Esquema que muestra una conformación tridimensional de un monómero de la proteína PorA y sus respectivos loops.....	5
Figura 5	Gel de expresión SDS-PAGE al 10%.....	19
Figura 6	Gel de purificación SDS-PAGE al 10%.....	21
Figura 7	Micrografías de la microscopía electrónica de transmisión de ISCOM-PorA de las fracciones 4(A), 7(B) y 8(C).....	24
Figura 8	Número de colonias promedio hasta las tres primeras diluciones.....	29
Figura 9	Número de colonias promedio hasta las cuatro primeras diluciones.....	30
Figura 10	Número de colonias promedio hasta las tres primeras diluciones.....	31
Figura 11	Número de colonias promedio hasta las cinco primeras diluciones.....	31

## ABREVIATURAS

ABS: Albúmina Bovina Sérica.

APC: Célula Presentadora de Antígeno.

GALT: Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa Gastrointestinal.

Ig: Inmunoglobulina.

IL-1: Interleukina 1.

IPTG: isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside.

ISCOMs: Immunostimulating Complexes (complejos de inmunoestimulación).

ISCOMs-PorA: ISCOMs con incorporación de carga proteica (PorA).

ISCOM+PorA: mezcla física de ISCOM y PorA.

LPS: Lipopolisacárido.

MEGA-10: n-decanoil-n-metilglucamida.

MHC: Major Histocompatibility Complex (complejo mayor de histocompatibilidad).

OMP: Outer Membrane Protein (proteína de membrana externa).

OVA: Ovoalbúmina.

PorA: Proteína de membrana externa de *N. meningitidis*.

PP: Placas de Peyer.

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio).

TEM: Transmission Electron Microscope (microscopio electrónico de transmisión).

TGI: Tracto Gastrointestinal.

ufc: unidad formadora de colonias.

## RESUMEN

Los ISCOMs o complejos de inmunoestimulación, son vehículos constituidos por fosfolípidos, colesterol y saponinas con capacidad adyuvante, y que pueden transportar proteínas con un fin inmunológico. *Neisseria meningitidis*, es una bacteria patógena exclusiva de humanos y es la causante de meningitis, una enfermedad infectocontagiosa. Para el serogrupo B de *N. meningitidis* no existe actualmente, una vacuna universal que prevenga la enfermedad. La proteína PorA, es una proteína de membrana externa de *N. meningitidis* y un buen candidato como antígeno, ya que presenta propiedades inmunogénicas para el desarrollo de una vacuna. Como hipótesis se planteó que la inserción de la proteína PorA recombinante de *N. meningitidis* serogrupo B en el ISCOM, forma un complejo, el cual administrado a ratones por vía oral, genera una respuesta protectora evaluada mediante anticuerpos bactericidas.

Para realizar este trabajo, fue necesario expresar y purificar la proteína PorA recombinante desde *E. coli*. Luego se preparó el complejo ISCOM-PorA, basándose para ello en trabajos anteriores. La relación en peso de las materias primas de la formulación evaluada fue 1:1:5:0,87, correspondiente a colesterol, fosfatidilcolina, saponinas y PorA. La evaluación de los ISCOMs-PorA fue llevada a cabo a través de la visualización del complejo por un microscopio electrónico de transmisión, cuantificación de proteínas mediante el método colorimétrico de Bradford y un análisis de los sueros por medio de la determinación de anticuerpos bactericidas. El resultado de la microscopía mostró ISCOMs-PorA de un tamaño entre los 30 y 50nm aproximadamente. Al analizar los sueros, hubo actividad bactericida en los grupos ISCOM-PorA (25µg), ISCOM+PorA (4µg) y PorA (10µg). En conclusión los ISCOMs son un buen vehículo para el transporte de proteínas por vía oral y que en conjunto con PorA resistieron el medio ácido estomacal, ingresaron al tejido mucosal intestinal y fueron capaces de generar anticuerpos bactericida contra *N. meningitidis* serogrupo B. Estos resultados preliminares sugieren que la utilización de ISCOM-PorA y ISCOM+PorA son una buena alternativa para el desarrollo de una vacuna para *N. meningitidis* serogrupo B.

## SUMMARY

The ISCOMs or immunostimulating complexes, are vehicles constituted by phospholipids, cholesterol and saponins with adjuvant capacity, and that can transport proteins with an immunological aim. *Neisseria meningitidis*, is exclusive a pathogenic bacterium of humans and is the meningitis cause, a contagious disease. For serogroup B of *N. meningitidis* does not exist at the moment, a universal vaccine that prevents the disease. The PorA protein, is a outer membrane protein of *N. meningitidis* and a good candidate like antigen, since it presents immunogenic properties for the development of a vaccine. The hypothesis of this research was: the insertion of the recombinant PorA protein of *N. meningitidis* serogroup B in the ISCOM, it forms a complex, which administered to mice by oral route, generates an protective answer by means of bactericidal antibodies.

In order to make this work, it was necessary to express and to purify the recombinant PorA protein from *E. coli*. The ISCOM-PorA complex was prepared considering a previous work. The relation in weight of the raw materials of the evaluated formulation was 1:1:5:0,87, corresponding to cholesterol, phosphatidilcoline, saponins and PorA. The evaluation of the ISCOMs-PorA was carried out through the visualization of the complex by an electron microscope of transmission, protein quantification by means of the colorimetric method of Bradford and an analysis of serums by means of the determination of bactericidal antibodies. The result of microscopy approximately showed ISCOMs-PorA of a size between the 30 and 50nm. When analyzing the serums, there were bactericidal activities in the groups ISCOM-PorA (25µg), ISCOM+PorA (4µg) y PorA (10µg). In conclusion the ISCOM is good vehicle for the protein transport by oral route and that altogether with PorA resisted average stomach acid, entered the intestinal mucosal weave and they were able to generate bactericidal antibodies against *N. meningitidis* serogroup B. These preliminary results suggest it use of ISCOM-PorA and ISCOM+PorA are a good alternative for the development of a vaccine for *N. meningitidis* serogroup B.

## 1. INTRODUCCION

Las vacunas son un excelente medio para la prevención de enfermedades infecto-contagiosas y durante el continuo avance en su desarrollo, se han investigado diversos vehículos encargados del transporte de moléculas inmunogénicas como péptidos y proteínas, entre los cuales se encuentran microesferas (Arigita *et al.*, 2004), liposomas (Arigita *et al.*, 2003) e ISCOMs o Complejos de Inmunoestimulación. Adicionalmente, estos ISCOMs poseen una propiedad adyuvante, lo que proporciona una ventaja comparativa. Un adyuvante es una sustancia o preparado químico que, incorporado a un antígeno o inyectado simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. Esta característica los hace atractivos como vehículos para el diseño de una vacuna (O'Hagan *et al.*, 2001).

Los ISCOMs están formados por una mezcla de lípidos, colesterol y saponinas triterpénicas (Barr and Mitchell, 1996; Kersten *et al.*, 1991; Sjölander and Cox, 1998), que interactúan entre sí a través de interacciones hidrofóbicas, repulsiones electrostáticas, factores estéricos y puentes de hidrógeno. A estos se les puede insertar proteínas anfipáticas y no anfipáticas en su estructura con un fin inmunológico. Cuando ellos no tienen proteínas se les denomina ISCOM matriz (Barr and Mitchell, 1996; Kersten *et al.*, 1991; Sjölander *et al.*, 1998).

Estas estructuras formadas son esféricas, compuestas por varias micelas, las cuales se disponen en una forma anular con un poro hidrofóbico en su parte central. La disposición final de estas micelas asemeja a una "jaula" y su tamaño oscila entre los 40 y 100nm (Figura 1) (Barr and Mitchell, 1996; Bengtsson and Sjölander, 1996; Kersten *et al.*, 1991; Copland *et al.*, 2000).

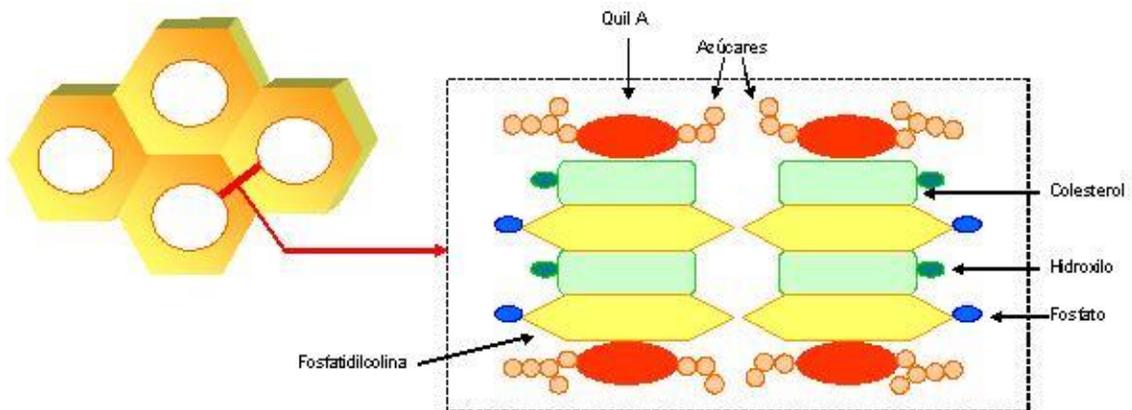
Cada uno de los componentes tiene una función específica, las saponinas, extraídas de la *Quillaja saponaria*, poseen una actividad adyuvante propia, aumentando de manera no específica, la actividad inmunológica (Barr *et al.*, 1998; Yuki

and Kiyono, 2003). El ácido glucurónico, que está presente en las cadenas de azúcares de la saponina, le confieren al ISCOM una carga superficial negativa (Barr and Mitchell, 1996; Kersten *et al.*, 1991; Barr *et al.*, 1998; Kersten and Crommelin, 1995; Pearse and Drane, 2005). El colesterol, permite la interacción entre la saponina y los fosfolípidos, dándole estabilidad a la estructura. Los fosfolípidos permiten la fluidez y favorecen la disposición de las proteínas dentro de la membrana (Barr and Mitchell, 1996; Kersten and Crommelin, 1995; Sjölander *et al.*, 1998).



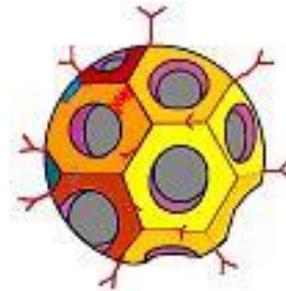
**Figura 1:** Esquema que muestra la estructura del ISCOM matriz.

Producto de análisis químicos, fisicoquímicos y datos de microscopía electrónica, fue posible realizar un modelo predictivo de su estructura. Con ello, se ha podido determinar que las saponinas condicionan la disposición en forma de anillo y favorecen la unión a otras micelas. Las cadenas de azúcares, que estas poseen, quedan dispuestas en las zonas externas e internas de cada micela, es decir, en la interacción micela-micela y en el poro (Figura 2) (Kersten *et al.*, 1991; Barr and Mitchell, 1996).



**Figura 2:** Esquema que muestra la posible disposición de los distintos componentes que estructuran al ISCOM.

Las proteínas insertadas en el ISCOM, se ubican entre las uniones micelares (Figura 3), así como lo harían en una membrana biológica, pero si estas no presentan propiedades anfipáticas, deberán ser tratadas previamente para que expongan sus regiones hidrofóbicas. Varios métodos han sido utilizados para esto, uno de ellos es la denaturación parcial con agentes como la urea y el mercaptoetanol (Barr *et al.*, 1998; Barr and Mitchell, 1996).



**Figura 3:** Esquema de un ISCOM con proteínas insertas en su membranas.

En este contexto, los ISCOMs, debido a su propiedad adyuvante (O'Hagan *et al.*, 2001), servirían para transportar proteínas de la *Neisseria meningitidis*, el cual es uno de los causantes de la meningitis (Van Deuren *et al.*, 2000). La meningitis es una infección que causa inflamación de las membranas que cubren el cerebro y la médula espinal, siendo esta una patología común en muchos países del mundo con una alta tasa de mortalidad.

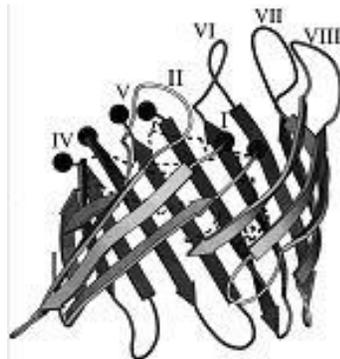
La bacteria *Neisseria meningitidis*, es un diplococo aerobio gram negativo y un patógeno exclusivo de los humanos. De acuerdo al tipo de cápsula, se han identificado 13 serogrupos (Lepow and Hughes, 2003; Van Deuren *et al.*, 2000), siendo A, B, C, W-135 e Y los más importantes (Harrison, 2006). Generalmente, los serogrupos A, B y C, provocan mayor cantidad de casos de enfermedades meningocócicas, estando el A y C más extendidos en África y Asia, mientras que el B y C en países occidentales (Lepow and Hughes, 2003; Segal and Pollard, 2004). En Chile, el serogrupo B es el más frecuente y afecta con mayor frecuencia a niños menores de 5 años (Ministerio de Salud, 2000). En Europa, entre el 50 y 90% de la enfermedad meningocócica se debe

a este serogrupo, siendo especialmente elevada en Noruega, Holanda, Alemania y Dinamarca. En América, se han declarado epidemias en Chile, Cuba, Brasil y Estados Unidos (Navarro, 2003).

La mucosa naso-orofaríngea es el reservorio natural de *N. meningitidis* y en cuanto a su transmisión esta es de persona a persona por contacto directo o por gotitas hasta un metro de distancia (Van Deuren *et al.*, 2000).

Se han desarrollado vacunas contra los distintos serogrupos de *N. meningitidis*, utilizando para ello un polisacárido capsular de los serogrupos A, C, Y y W135 pero los estudios para una vacuna contra el serogrupo B han resultado ser poco exitosos (Navarro, 2003), especialmente cuando se usan en niños pequeños, puesto que la cápsula de *N. meningitidis*, está compuesta por un homopolímero del ácido  $\alpha(2-8)$  N-acetil neuroamínico, análoga a las cadenas cortas del ácido neuroamínico presente en distintas glicoproteínas durante el desarrollo embrionario humano (Azmi *et al.*, 1995; Peeters *et al.*, 1999), lo que generaría una baja respuesta inmune, ya que probablemente los clones de linfocitos capaces de responder frente al polisacárido B desaparecen del organismo por selección clonal negativa. Por esas razones, se han buscado otras alternativas para realizar vacunas más efectivas para este serogrupo y dentro de estas se han estudiado algunas proteínas de membrana (Outer Membrane Protein u OMP) capaces de estimular una respuesta antigénica de carácter bactericida (Navarro, 2003; Harrison, 2006). Una de las candidatas es la OMP1, la cual ha dado buenos resultados en pruebas en ratones (Peeters *et al.*, 1999; Arigita *et al.*, 2004).

La OMP1, también denominada PorA, es el mayor componente de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*. Es una proteína trimérica con una conformación de hoja  $\beta$ -plegada, y en su forma monomérica tiene un peso molecular que se aproxima a los 42 kDa. Forma poros hidrofílicos, los cuales se relacionan con el transporte de cationes (Song *et al.*, 1999). Hacia el exterior, proyecta 8 asas o "loops" (Figura 4), siendo las asas 1 y 4 las regiones que presentan una alta variabilidad aminoacídica (regiones variables o VRs) (Van der Ley *et al.*, 1991; Derrick *et al.*, 1999).



**Figura 4:** Esquema que muestra una conformación tridimensional de un monómero de la proteína PorA y sus respectivos loops (Derrick *et al.*, 1999).

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune, frente al serogrupo B de la *Neisseria meningitidis*, es que se plantea fabricar ISCOMs cargados con la proteína PorA recombinante expresada y purificada desde *E. coli*. Este complejo ISCOM-PorA, debería ingresar de manera eficiente al organismo y transfectar las células presentadoras de antígenos (APC) y con ello obtener una buena respuesta inmune protectora.

La Unidad de Biotecnológicos e Inmunobiológicos (UBI) del Instituto de Salud Pública (ISP), a la fecha ha clonado el gen de *porA* desde *N. meningitidis* B:15:P1.3. El gen clonado fue secuenciado, expresado y purificado desde *E. coli*. La proteína recombinante PorA purificada fue utilizada para desarrollar anticuerpos policlonales en conejo, que reconocen en forma específica las diferentes purificaciones de la proteína recombinante purificada.

En este estudio, la vía de administración escogida para el complejo fue la oral. Esta vía, presenta ciertas ventajas, tales como la comodidad en la administración y que es más económicas. Otro punto a favor, es que en el intestino hay presente tejido linfoide que participa de la respuesta inmune mucosa. Uno de los componentes de gran importancia son las Placas de Peyer (PP), que contiene áreas con linfocitos B encargados de la producción de inmunoglobulina A (IgA) (Sjölander and Cox, 1998; Yuki and Kiyono, 2003; Quiding *et al.*, 1991). Esta IgA es un anticuerpo, que se

encuentra en mayor magnitud en las mucosas y representa una primera línea de defensa contra patógenos ingeridos o inhalados (Quiding *et al.*, 1991; Woof and Kerr, 2004). Los ISCOM-PorA, se administrarán por vía oral a un modelo ratón, y por último, la respuesta inmune generada se evaluará mediante la determinación de anticuerpos bactericidas contra colonias de *N. Meningitidis* serogrupo B (Kapczynski *et al.*, [s.a.] ).

## 2. HIPOTESIS DE TRABAJO

La incorporación de la proteína PorA recombinante en el ISCOM, forma un complejo, el cual administrado a ratones por vía oral genera una respuesta bactericida contra *N. meningitidis*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Obtener un vehículo basado en ISCOM, cargado con la proteína de membrana PorA recombinante de *N. meningitidis* y evaluar en modelo murino inmunizado vía oral la respuesta bactericida en colonias de *N. meningitidis*.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Expresión de la proteína PorA de *Neisseria meningitidis* usando para ello clones del vector pET21a-*porA* en células *E. coli* BL-21(DE3).
2. Purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad.
3. Obtención de ISCOMs por el método de diálisis.
4. Obtención de ISCOMs cargados con PorA por el método de diálisis.
5. Análisis de los ISCOM-PorA en cuanto a:
  - a. Forma.
  - b. Tamaño.
  - c. Cuantificación de la proteína inserta en el vehículo, mediante un método colorimétrico.
6. Inmunizar con ISCOMs-PorA los ratones por vía oral.
7. Evaluación de la respuesta inmune protectora mediante la determinación de anticuerpos bactericidas.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Materias primas

- , Células *E. Coli* DH-5 $\alpha$ , transformadas con el vector pET21a-*porA*, dispuestas en viales criogénicos en glicerol al 50%, aportados por la Unidad de Biotecnológicos e Inmunobiológicos (UBI) del ISP.
- , Solución de saponinas 100 mg/ml (Quil A<sup>®</sup>, Isconova).
- , Colesterol, aprox. 95% (Sigma).
- , L- $\alpha$ -fosfatidilcolina tipo X-E, de yema de huevo secada aprox. 60% (TLC) (Sigma).
- , N-decanoil-n-metilglucamida, aprox. 98% (MEGA-10, Sigma).

#### 4.1.2 Materiales y reactivos

- , Kit de purificación de DNA plasmidial (EZNA<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I, Omega Bio-Tek).
- , Bacto Tryptone (Difco).
- , Extracto de levadura granulada, para microbiología (Merck).
- , Agar-agar de alta pureza, para microbiología (Merck).
- , Cloruro de Sodio cristal, mínimo 99% de pureza (J.T. Baker).
- , Resina Ni-NTA His-Bind<sup>®</sup> (Novagen).
- , Fosfato de sodio monobásico dihidratado, mínimo 99% de pureza (Merck).
- , Fosfato de sodio dibásico, mínimo 99% de pureza (Merck).
- , Imidazol, aprox. 99,8% de pureza (US Biological).
- , 2-mercaptoetanol, mínimo 98% de pureza (Merck).
- , Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, grado biología molecular (Tween 20, Sigma)
- , t-octylphenoxy polyethoxy ethanol, grado laboratorio (Triton X100, Sigma).
- , Glicerol, aprox. 87% de pureza (Merck).
- , Membrana de diálisis de celulosa benzoilada de tamaño de poro 1200 (Sigma).
- , Tampón Tris base al 98% de pureza (Sigma).

- Fosfato de potasio monobásico, aprox. 98% de pureza (Merck).
- Urea, mínimo 99,5% de pureza (Sigma).

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Transformación de células competentes *E. coli* BL-21(DE3):**

El plasmidio pET21a-*porA* fue purificado desde un stock de células *E. coli* DH5 $\alpha$ , mantenidas en glicerol al 50% de células a -20°C. Las células descongeladas, se crecieron en agitación a 37°C en medio LB (ver Anexo Protocolo 1) suplementado con ampicilina de concentración 100mg/mL (ver Anexo Protocolo 3) y el DNA se purificó mediante EZNA<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I. Con el producto final de esta purificación se transformaron las células competentes *E. coli* BL-21(DE3).

La transformación de células competentes fue llevada a cabo con 20 $\mu$ L de *E. Coli* BL-21(DE3) más 2 $\mu$ L del DNA plasmidial. Ambos se mezclaron y fueron incubadas en hielo durante 45 minutos y luego sometidas a un pulso de temperatura de 42°C por 1 minuto. Esta mezcla se agregó a 1mL de medio LB e incubada a 37°C por 1 hora con agitación. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 4000rpm. El pellet, que contiene el DNA plasmidial en las células *E. Coli* BL-21(DE3), se resuspendió y fue sembrado en placa LB suplementado con ampicilina de concentración 100mg/mL (ver Anexo Protocolo 2), y se dejó en estufa toda la noche a 37°C.

### **4.2.2 Expresión y purificación de proteína PorA:**

La expresión se realizó a partir de las colonias aisladas, que se obtuvieron en la transformación de las células competentes BL-21(DE3). La purificación de la proteína se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando la resina Ni-NTA que se une en forma específica a los residuos de aminoácidos histidina, los cuales fueron incorporados en número de seis en el extremo carboxilo de la proteína.

#### **4.2.2.1 Expresión:**

Una colonia aislada de *E. Coli* BL-21(DE3) transformada con el plasmidio pET21a-*porA* se inoculó en 30mL de medio LB suplementado con 30  $\mu$ L de glucosa estéril

(4g/L) y 150µL de ampicilina (100 mg/mL), toda la noche a 37°C con agitación a 220rpm.

El cultivo saturado se utilizó para inocular en una dilución 1:100 un matraz con medio LB y 1 mL de glucosa estéril (4g/L). Este paso se realizó en duplicado. Ambos matraces se incubaron a 37°C a 220rpm y a las 2 horas se le midió la densidad óptica (OD) a 600nm. Se hizo crecer el inóculo bacteriano hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,4 y 0,5.

Al alcanzar esta OD, a uno de los matraces se le agregó isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) de concentración 0,1M (ver Anexo Protocolo 4) como un inductor de la expresión y se disminuyó la temperatura de incubación a 30°C. El otro matraz se usó como control y no se le agregó IPTG. El IPTG, es un análogo de la lactosa ya que induce la actividad de la beta-galactosidasa, una enzima que promueve la utilización de la lactosa y sirve como un inductor de la expresión debido a que el vector de expresión que contiene el gen de *porA*, el pET21a, posee una región denominada operón *Lac* que contiene los genes que codifican para las proteínas implicadas en el metabolismo de la lactosa, la cual sirve como nutriente para los procesos vitales del sistema (Sambrook and Russell, 2001).

A cada hora se midió la OD, hasta un total de 3 mediciones. El inóculo ocupado para medir OD, se centrifugó y se resuspendió en agua destilada y buffer de lisis y se guardó a -20°C, para posterior análisis. El inóculo total se centrifugó y el pellet, que contiene a la PorA y otras proteínas insolubles, se almacenó a -20°C hasta el proceso de purificación.

#### **4.2.2.2 Purificación:**

Para la purificación de la proteína recombinante PorA se empleó una resina Ni-NTA His-Bind® (Novagen) que une específicamente los aminoácidos histidinas, que fueron incorporados a la proteína mediante la estrategia de clonamiento de su gen. Esta resina, tiene cationes Ni<sup>2+</sup> unidos por quelación a grupos reactivos de la estructura y son los que le confieren afinidad a la histidina (Sambrook and Russell, 2001).

La resina fue tratada de acuerdo al protocolo que dicta el fabricante, así como la preparación de los distintos buffers ocupados (Tabla 1). Como la proteína PorA recombinante forma cuerpos de inclusión, se trabajó bajo condiciones denaturantes usando para ello urea en concentración 6M.

En el inicio del procedimiento, la columna fue tratada con agua destilada a pH 8 y más tarde con buffer de lisis a pH 8. En cuanto al pellet bacteriano, este se resuspendió en buffer de lisis, se agregó una punta de espátula de lisosima, se sonicó y se dejó a temperatura ambiente por media hora. Luego se re-sonicó y se centrifugó durante 1 hora a 20.000rpm en una centrifuga SORVAL. Después se recolectó el sobrenadante, se filtró por 0,2µm y se cargó a la columna de purificación. Se eluyó con buffer de lisis a pH 8 y buffer de lavado a pH 8.

La elución final se realizó con buffer de elución a pH 8 obteniendo unos 20mL, los que se recolectaron separadamente en volúmenes de 1mL, para el análisis posterior.

**Tabla 1:** Descripción de los reactivos y las concentraciones más apropiadas, a la cual se obtuvo la mejor purificación:

	<b>Concentración</b>	
<b>Buffer de Lisis</b>	Cloruro de Sodio	300mM
	Buffer Fosfato de Sodio*	50mM
	Imidazol	25mM
	2-mercaptoetanol	10mM
	Urea	6M
<b>Buffer de Lavado</b>	Tween 20	2%
	Triton X100	1%
	Buffer Fosfato de Sodio*	50mM
	Cloruro de Sodio	2M
	Imidazol	50mM
	Glicerol	10%
	Urea	6M
	2-mercaptoetanol	10mM
<b>Buffer de Elución</b>	Glicerol	10%
	Cloruro de Sodio	300mM
	Buffer Fosfato de Sodio*	50mM
	Imidazol	250mM
	Urea	6M

\* ver Anexo Protocolo 6

#### 4.2.2.3 Análisis de expresión y purificación:

El análisis de la expresión y de la purificación se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% (ver Anexo Protocolo 5). La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico y para este método se pueden utilizar los geles SDS-PAGE. Estos geles utilizan a la poliacrilamida como soporte y al dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico, como agente denaturante usado para que la proteína pierda su estructura terciaria. A su vez, este agente le confiere carga negativa a la proteína. Finalmente, al colocar en el gel la proteína cargada negativamente y aplicar una diferencia de potencial eléctrico, las moléculas se moverán a distintas velocidades hacia el ánodo, siendo esta migración proporcional al peso de la proteína (Sambrook and Russell, 2001). Para lograr identificar la proteína en el gel se utilizaron marcadores de peso molecular, los que se colocaron de la misma forma que la muestra en los carriles que se hicieron en el gel. La diferencia de potencial utilizada para las electroforesis fue de 110mV. Al término de la electroforesis los geles fueron teñidos con una solución de tinción de azul de coomassie (ver Anexo Protocolo 5) y desteñidos con una solución decolorante (ver Anexo Protocolo 5) para facilitar la detección de las bandas de interés.

#### 4.2.3 Obtención de ISCOM:

La formulación utilizada para la formación de ISCOM se basó en una realizada en un trabajo anterior (Saavedra, 2004) la cual también se trabajó de acuerdo a literatura (Barr and Mitchell, 1996; Kersten *et al.*, 1991) y que se puede apreciar en la Tabla 2. En ella se muestra la formulación del lote y en este caso el número de ISCOMs preparados es indeterminada. Ahí se observa la relación en peso más apropiada de las materias primas para la fabricación del vehículo, además de la concentración de las materias primas y la cantidad en miligramos que se ocuparon.

**Tabla 2:** Formulación de ISCOM.

	Formulación del Lote		
	Relación en peso	mg/mL	mg
Fosfatidilcolina/colesterol	1:1	15	4
Saponinas	5	100	10

Para la obtención de los ISCOMs, se aplicó el método de diálisis, el que consiste en retirar del medio de disolución un detergente, el cual mantiene solubilizados a los lípidos y las saponinas (Barr and Mitchell, 1996; Kersten *et al.*, 1991; Sjolander and Cox, 1998; Bengtsson and Sjölander, 1996; Peeters *et al.*, 1999; Bengtsson and Sjölander, 1996; Copland *et al.*, 2000; van Pinxteren *et al.*, 1999). Esto se realizó en las siguientes etapas:

#### **4.2.3.1 Solubilización de los componentes lipídicos:**

El colesterol y la fosfatidilcolina se solubilizaron en una solución acuosa de MEGA-10 al 20% p/v, con ayuda de agitación durante toda la noche a 4°C y posterior sonicación en baño de agua por 15 minutos a temperatura ambiente.

#### **4.2.3.2 Incorporación de las saponinas:**

A la mezcla lipídica se le adicionó cuidadosamente un volumen de saponinas de concentración 100mg/mL, para evitar la formación de espuma. Para mejorar la homogenización de la mezcla, esta fue sonicada en baño de agua por 15 minutos a temperatura ambiente.

#### **4.2.3.3 Diálisis:**

Para realizar la diálisis y retirar el detergente, se adaptó un procedimiento empleando un equipo de disolución para formas farmacéuticas sólidas (Pharma Test Type PTW SIII). A un vaso de disolución de 1 litro se le añadió buffer fosfato 0,01M (ver Anexo Protocolo 7) a pH 7,4 y la mezcla de lípidos y saponinas se colocó en una bolsa de diálisis con un tamaño de poro de 1200 PM, la que se dejó suspendida en el interior del vaso. La agitación se consiguió usando la paleta correspondiente al aparato II de la USP.

**Tabla 3** : Condiciones de la diálisis.

Velocidad de Agitación:	75rpm.
Temperatura de diálisis:	24-26°C.
Volumen de líquido:	1 litro.
Cambios de líquido:	Cada 24 horas.
Tiempo de diálisis:	96 horas.

#### 4.2.4 Obtención de ISCOMs cargados con PorA.

La formulación de los ISCOM-PorA también es la formulación del lote (Tabla 4). Del mismo modo que en la tabla 2, en esta aparecen la concentración de los materias primas y la proteína y los miligramos que se ocuparon.

**Tabla 4:** Formulación de ISCOM-PorA.

	Formulación del Lote		
	Relación en peso	mg/mL	mg
Fosfatidilcolina/colesterol	1:1	15	4
Saponinas	5	100	10
PorA	0,87	1,13	1,75

Los ISCOMs cargados con PorA, fueron preparados de forma similar, agregando la proteína en solución, en un buffer fosfato y con una concentración de urea 2M.

#### Diálisis:

Se efectuó bajo las condiciones señaladas en el punto 4.2.3.3, con buffer fosfato en concentraciones decrecientes de urea, partiendo con una concentración 2M las primeras 24 horas hasta quedar con una concentración 0,5M las 24 horas finales. Este proceso se realizó para evitar la precipitación de la proteína.

#### 4.2.5 Purificación de ISCOMs cargados:

La separación de las distintas estructuras resultantes al final de la diálisis, se realizó mediante centrifugación, método por el cual se pueden separar sólidos de líquidos de distinta densidad, para lo cual se usó una gradiente de sacarosa (Barr and Mitchell, 1996; Bengtsson and Sjölander, 1996; Kersten *et al.*, 1991; Copland *et al.*, 2000; Könnings *et al.*, 2002; van Pinxteren *et al.*, 1999). Mediante una centrífuga, se imprime a la mezcla un movimiento rotatorio con una fuerza de mayor intensidad que la gravedad, provocando la sedimentación de las partículas de mayor densidad, quedando en la zona de gradiente de menor concentración, el material que no reaccionó. Esta gradiente se preparó en las siguientes concentraciones: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 50%p/v. Un volumen de 3,75mL de cada una de estas soluciones fue depositado en un tubo de centrífuga, desde la mayor concentración hasta la menor

concentración, con bastante precaución y así evitar el mezclado de las distintas soluciones. Finalmente 5mL de muestra fueron añadidos a la gradiente. La centrifugación se realizó en una ultracentrífuga Beckman modelo 90XL con rotor SW28 a 100.000g durante 18 horas a 10°C. Al término, se recogieron 9 fracciones.

Posteriormente la sacarosa fue sacada de todas las fracciones mediante diálisis contra buffer fosfato 0,01M pH 7,4 durante 4 horas a 5°C, cambiando el buffer cada hora. Las fracciones dializadas fueron concentradas con polietilenglicol 20.000 seco por el tiempo necesario hasta que las fracciones quedaron con un volumen aproximado de 1mL.

#### **4.2.6 Análisis de las partículas de ISCOMs**

##### **4.2.6.1 Estructura y forma de las partículas de ISCOMs**

Se realizó utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Barr *et al.*, 1998; Bengtsson and Sjölander, 1996; Kersten *et al.*, 1991; Copland *et al.*, 2000; Pearse and Drane, 2005) con tinción negativa usando acetato de uranilo al 2%. El equipo utilizado fue un microscopio electrónico de transmisión PHILIPS TECNAI 12.

##### **4.2.6.2 Determinación de la cantidad de proteína en los ISCOMs**

La cantidad de proteína se midió en cada fracción de la gradiente de sacarosa, usando el método colorimétrico de Bradford (Kersten *et al.*, 1991; Kersten *et al.*, 1988; van Pinxteren *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999; Bengtsson and Sjölander, 1996) adaptado a microplatos.

#### **4.2.7 Inmunización**

Se inmunizaron 28 ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de vida (Tabla 5), los cuales fueron divididos en 7 grupos. El protocolo de inmunización empleado, consistió en administrar el antígeno en varias inmunizaciones y finalmente dar una dosis de refuerzo.

El protocolo que se siguió fue el siguiente, los ratones fueron sangrados vía retro-orbital a tiempo cero, luego se administró el antígeno por vía oral 3 veces durante una semana (día 3, 5 y 7), para lo cual se usó una sonda nasogástrica de uso en neonatos.

A las 4 semanas se procedió a realizar un segundo sangrado retro-orbital, luego de lo cual se administró la dosis de refuerzo. Como etapa final se llevó a cabo el sangrado mediante una punción cardiaca.

**Tabla 5:** Distribución de los grupos de ratones utilizados para la inmunización, se adjunta el volumen administrado en  $\mu\text{L}$  (microlitros) en cada caso.

Grupo	Descripción	Volumen administrado ( $\mu\text{L}$ )	Cantidad de PorA ( $\mu\text{g}$ )
1	Buffer fosfato	200	---
2	ISCOM	200	---
3	ISCOM-PorA	200	50
4	ISCOM-PorA	100	25
5	ISCOM + PorA	200	12
6	ISCOM + PorA	100	4
7	PorA	200	10

ISCOM-PorA: Proteína PorA inserta en el ISCOM; ISCOM+PorA: mezcla física de ISCOM y PorA.

Las muestras de sangre se incubaron primero a temperatura ambiente por 30 minutos y luego a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Finalmente las muestras fueron centrifugadas a 4000rpm por 20 minutos. El sobrenadante obtenido (suero) se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.8 Análisis de los sueros

Se realizó para determinar anticuerpos bactericidas. Este ensayo, sirve como una medición funcional del anticuerpo *in vitro* y que en conjunto con el complemento tiene la capacidad de lisar bacterias (Mountzouros and Howell, 2000), por lo que se utiliza en este caso, para evaluar la capacidad protectora de los sueros contra el desarrollo de la enfermedad meningocócica (Santos *et al.*, 2001).

El ensayo bactericida se realizó en placa de 96 pocillos. Las columnas 1 a la 10 de la placa, fueron ocupadas para el análisis de los sueros. El procedimiento fue el siguiente, se agregó a cada pocillo  $25\mu\text{L}$  de buffer de Hanks. Luego se agregaron  $50\mu\text{L}$  de suero de ratón a la columna 1 de la placa y se transfirieron  $25\mu\text{L}$  de estos a la columna 2 y se mezcló 5 veces con la pipeta. Después de mezclar se removieron  $25\mu\text{L}$

de la columna 2 y se transfirieron a la 3 y así sucesivamente hasta la columna 10. Al final de mezclar el contenido de la columna 10, se removieron los 25 $\mu$ L y se descartaron. A continuación, se colocó en los pocillos 10 $\mu$ L de la solución de trabajo bacteriana de *N. Meningitidis* cepa B:15:P1.3 (medido en unidades formadoras de colonias, ucf). Finalmente, se agregó 15 $\mu$ L de suero humano como fuente de complemento. El suero en la placa, quedó diluido con los factores 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024.

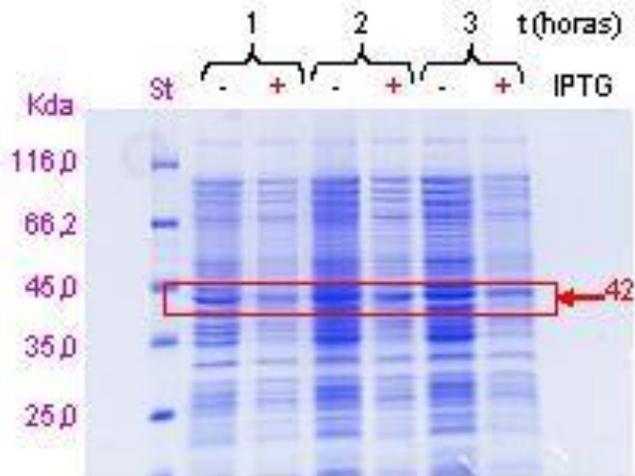
Finalmente, la placa se incubó por 30 minutos a 37°C sin CO<sub>2</sub>. Después se agregó a todos los pocillos 100 $\mu$ L de agar TSB/A. En paralelo se sembró 10  $\mu$ L de solución de trabajo bacteriana como control en una placa agar GC (Difco). Este es un método adaptado del realizado por Kapczynski et al. (ver Anexo Protocolo 8) del Center for Disease Control and Prevention (CDC) (USA). Al día siguiente se contaron las colonias usando un microscopio (Nikon SMZ800) y a los pocillos más representativos se les tomó fotos.

El título bactericida fue definido como la más alta dilución que produce una disminución del 50% o más de las colonias comparado con el control (Santos et al., 2001; Mountzouros and Howell, 2000). Según literatura es aceptado como título protector una dilución  $\geq 1:4$  en Europa y de  $\geq 1:8$  en Estados Unidos (Santos et al., 2001).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Expresión de la proteína PorA de *Neisseria meningitidis* usando para ello clones del vector pET21a-porA en células *E. coli* BL-21(DE3):

El resultado de la expresión de la proteína en cuestión se puede apreciar en el gel SDS-PAGE de la figura 5. Este gel muestran la expresión de proteínas a los tres tiempos en los que se midió la densidad óptica, como se explicó en el punto 4.2.2.1. La densidad óptica se utilizó para evaluar el crecimiento bacteriano. Cuando la densidad óptica estuvo entre 0,4 y 0,5 a tiempo 1 hora, se le añadió IPTG. Después de este tiempo inicial, comienza a expresarse en mayor magnitud la proteína PorA que el resto de las proteínas. Como se puede observar en el gel (Figura 5) este muestra que en los tiempos 2 y 3 h en las muestras con IPTG se produjo una disminución en las expresión de las otras proteínas, en cambio, se produce un aumento en la expresión de la PorA que se visualiza alrededor de los 42 kDa (ver figura 5). Con este resultado se dio paso a la purificación de la proteína.



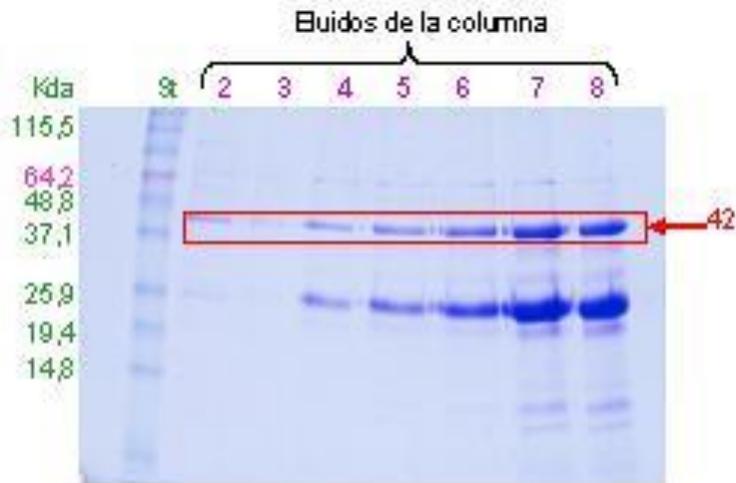
**Figura 5:** Gel de expresión SDS-PAGE al 10%. Se puede observar a la proteína PorA en un peso aproximado a los 42 kDa. Se utilizó como marcador de peso molecular al estándar Fermentas #SM0431. De izquierda a derecha carril 1: estándar; carril 2 y 3: tiempo 1; carril 4 y 5: tiempo 2; carril 6 y 7: tiempo 3; - : indica sin IPTG; + : indica con IPTG.

Como la intensidad del color es dependiente de la concentración de la proteína, en el gel se puede observar que la expresión de esta fue baja, ya que la banda es débil, situación que se mantuvo al comparar la expresión en el primer y el último tiempo.

## **5.2 Purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad:**

En la aplicación de esta tarea, se prepararon 3 buffer, cada uno con una función importante para el éxito de la purificación. Cada buffer tiene en su composición un agente denaturante (Urea 6M) que tiene por función modificar la estructura terciaria de la proteína exponiendo los sitios donde se ubica la histidina y así facilitar la unión a la resina. También se ocuparon otros agentes para evitar que las proteínas contaminantes se uniesen a la resina, como aquellos que reducen interacciones iónicas (NaCl), los puentes disulfuros ( $\beta$ -mercaptoetanol) y las interacciones hidrofóbicas (glicerol) (Sambrook and Russell, 2001). El primer buffer es el denominado buffer de lisis, ya que ayuda a lisar el pellet bacteriano que quedó de la expresión; además, este también se ocupó para ambientar la columna que contiene la resina y con esto acondicionarla con el fin de mantener el lisado celular en las mismas condiciones. Con el buffer de lavado se comenzó con la remoción de las otras proteínas que fueron expresadas y que se consideraron contaminantes. El buffer de elución, que lleva un exceso de imidazol es el encargado de soltar a la proteína PorA de la resina. Esto sucede debido a que la composición molecular del imidazol, es similar a la histidina y como esta se coloca en exceso en el buffer produce la competencia con la histidina y por lo tanto suelta a la proteína (Sambrook and Russell, 2001). Es importante que en el transcurso del proceso se respeten las condiciones de pH de las soluciones utilizadas, así como de ciertos rangos de concentración dictados por el proveedor de los distintos reactivos para que la purificación sea lo más efectiva.

En el gel (Figura 6) se observan distintos carriles con el eluido de la columna. En ellos se ve que además de la proteína PorA hay otra proteína de peso molecular cercano a los 26 kDa que no logró ser retirada de la resina con el buffer de lavado, lo que indica que la purificación no logró ser totalmente efectiva.



**Figura 6:** Gel de purificación SDS-PAGE al 10%. Se visualiza la proteína PorA (42 kDa) y un contaminante de peso molecular menor. Se usó como marcador de peso molecular al estándar Invitrogen BenchMark Pre-stained N°10748-010. De izquierda a derecha carril 1: estándar; carril 2 al 8: eluidos de la columna.

Con la proteína purificada hasta este punto se comenzó con la formación del complejo ISCOM-PorA. El hecho de que el complejo se fabrique con la proteína PorA más el contaminante tiene la complicación de que en los ISCOMs se puedan insertar ambos y que uno de estos se inserte más que el otro en el vehículo. No se identificó que contaminante era, ni la cantidad específica que había.

En el desarrollo de vacunas con proteínas recombinantes, que son antígenos más puros, estos tienden a ser pobremente inmunogénicos cuando se compara con vacunas vivas atenuadas. Los adyuvantes más efectivos tienen un componente inmunoestimulador tal como una bacteria muerta o pared celular bacteriana, siendo estos componentes, potentes activadores de células presentadoras de antígenos (APC). Debido a que este contaminante pudiese ser parte de la proteína en cuestión, fue que se ocupó el contaminante que aparece en el gel, ya que este pudiera favorecer y dar una mayor respuesta inmunológica (McGeary *et al.*, 2003).

### **5.3 Formación de ISCOM y ISCOM-PorA:**

#### **5.3.1 Formulación y obtención de ISCOM y de ISCOM-PorA por el método de diálisis.**

Los ISCOMs son estructuras vesiculares compuestas por varias micelas anulares que interactúan entre sí y que poseen un poro en el centro (Kersten *et al.*, 1991; Sjölander *et al.*, 1998; Barr and Mitchell, 1996). Para que estas partículas mantengan su estructura es importante la proporción de las materias primas. La formulación para los ISCOM, utilizada en este trabajo, se obtuvo de una investigación anterior (Saavedra, 2004) y como allí se realizó el desarrollo del vehículo y analizaron sus factores críticos, se optó por tomar los mismos resultados de la relación en peso de las materias primas. La proporción de las materias primas es de suma importancia, ya que si esta no es la correcta no habrá formación del vehículo. Si disminuye la cantidad de fosfatidilcolina, se observan láminas en las cuales las micelas se disponen en un solo plano sin configurarse en tres dimensiones. Esta disminución también se ve reflejada, en la diversidad de tamaño que presentan los ISCOMs, ya que se forman partículas pequeñas y otras de mayor tamaño. Esto demostró la importancia de los fosfolípidos en la estructura del ISCOM, pues le dan la capacidad de configurarse en forma esférica y le permiten la incorporación de proteína hidrofóbicas y anfipáticas (Barr and Mitchell, 1996; Kersten and Crommelin, 1995; Bengtsson and Sjölander, 1996; Copland *et al.*, 2000; Kersten *et al.*, 1991; Morein and Bengtsson, 1999). En otros estudios se evidencia, a través de micrografías, que la falta de saponinas en la formulación sólo daba como resultado la formación de liposomas (Bomford *et al.*, 1992). En literatura también se ha descrito que los lípidos y las saponinas forman micelas anulares de un tamaño en un rango entre los 10 a 12nm de diámetro las que a su vez se unen para formar los ISCOMs (Bengtsson and Sjölander, 1996; Morein and Bengtsson, 1999; Kersten *et al.*, 1991).

En la inserción de la proteína PorA en el ISCOM, sólo se estudió una formulación. En ella se mantuvo la proporción de los componentes lipídicos y de las saponinas y en el caso de la PorA se usó una relación en peso igual a 0,87 respecto a las demás materias primas. La proporción de la proteína quedó en el rango entre 0,1 y 1 descrito

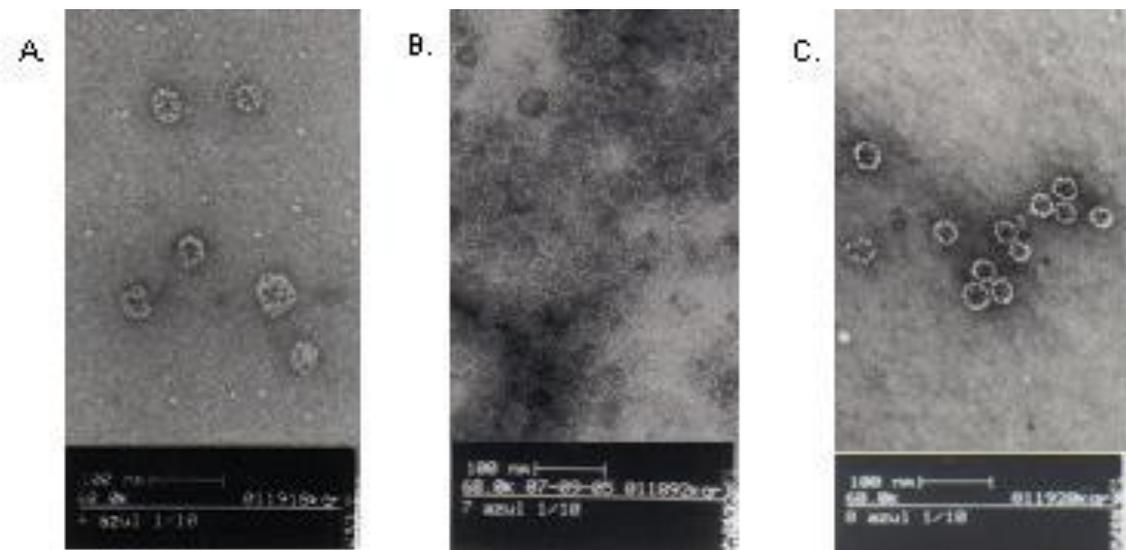
en la literatura (Barr and Mitchell, 1996). En literatura, también se describe una formulación de ISCOM-PorA en que la relación en peso del vehículo fue de 0,4:4:1:1 lo que correspondería a PorA: Saponina: fosfatidiletanolamina: colesterol. Pese a que ahí no se mencionan características físicas del vehículo obtenido, este se identificó a través de microscopía electrónica de transmisión (Peeters *et al.*, 1999) indicando que para esta proteína el rango 0,1-1 es apropiado para la formación del complejo. Además, es necesario tomar en cuenta, que no todas las proteínas son de fácil inserción en el ISCOM. Otros vehículos como son los liposomas, incorporan la proteína dentro del vehículo. En contraste a ellos, los ISCOMs, que son estructuras huecas y con poros deben llevarlas insertas externamente entre las mismas micelas que lo conforman. Por esto es que proteínas anfipáticas no debiesen producir mayores problemas, pero otras deben de ser tratadas para que expongan sus sitios hidrofóbicos (Kersten and Crommelin, 1995; Morein and Bengtsson, 1999). En este caso la PorA, a pesar de ser una proteína de membrana fue tratada con un agente denaturante como la urea debido a que en su estado terciario no expone estos sitios con los que fácilmente se incorpora entre las micelas del ISCOM. Entre los agentes utilizados para este fin además de la urea, está el mercaptoetanol (Barr *et al.*, 1998; Barr and Mitchell, 1996), la incorporación de ácidos grasos como el ácido palmítico el cual ha sido adicionado a ovoalbúmina (OVA) (Könning *et al.*, 2002; Demana *et al.*, 2004) y otros métodos físicos como la exposición a pH bajo y altas temperaturas (Barr *et al.*, 1998; Barr and Mitchell, 1996; Morein and Bengtsson, 1999; Sjölander *et al.*, 1998).

### **5.3.2 Microscopía electrónica de transmisión aplicada a los ISCOM-PorA**

De las 9 fracciones que se obtuvieron producto de la ultracentrifugación a través de la gradiente de sacarosa, las fracciones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 fueron observadas con el microscopio electrónico de transmisión (TEM). De la fracción 4 a la 8 se observaron ISCOMs, pero las formas más definidas y uniformes en tamaño se vieron de la fracción 6 a la 8.

En las micrografías las estructuras se observaron como esferas con puntos oscuros en su superficie, los cuales corresponden a los poros, siendo esto consistente con lo descrito en literatura (Barr and Mitchell, 1996; Bengtsson and Sjölander, 1996; Kersten

*et al.*, 1991; Kersten and Crommelin, 1995; Copland *et al.*, 2000; Sjölander *et al.*, 1998). Como el aumento con que se tomaron las fotos fue el mismo, se puede observar que las partículas van disminuyendo en tamaño a medida que el número de la fracción aumenta, lo que se puede comprobar en la micrografía de la fracción 4 en la cual las estructuras son de mayor tamaño (Figura 7.A) que en la fracción 7 (Figura 7.B) y que en la fracción 8 que son más pequeñas (Figura 7.C). Por otro lado, en la fracción 7, se puede evidenciar una mayor cantidad de ISCOMs que en las otras fracciones (Figura 7.B), tomando en cuenta que todas las fracciones fueron vistas usando la misma dilución. De acuerdo a las micrografías, las partículas tienen un tamaño entre los 50 y 30 nm aproximadamente, coincidiendo a lo descrito en la literatura (Kersten and Crommelin, 1995; Barr and Mitchell, 1996; Barr *et al.*, 1998; Morein and Bengtsson, 1999; Kersten *et al.*, 1991; Demana *et al.*, 2004). Sin embargo, este tamaño de partícula es solo considerando una vista parcial de las fracciones y no de la totalidad de esta, debido a que la microscopía proporciona un campo limitado de visión de la gradilla en la cual estaba la muestra.



**Figura 7:** Micrografías de la microscopía electrónica de transmisión de ISCOM-PorA de las fracciones 4(A), 7(B) y 8(C). Aumento 68.0k

Conocer el tamaño de partícula es muy importante para el producto final, con el objetivo de escoger la vía de administración. Debido a que el objetivo de este trabajo es administrar este vehículo con un antígeno por vía oral, es necesario que el complejo sea de un tamaño pequeño y el ISCOM que está en el orden de los nanómetros cumple muy bien con este parámetro, por lo que puede ser absorbido por vía intestinal y producir un efecto en el sistema inmune. En el intestino existen diversos tipos celulares tales como células absorbivas o enterocitos, células calciformes secretadoras de mucus y células endocrinas entre otras. Asimismo, también existen barreras que restringen la captura y transporte de antígenos a nivel intestinal como el glicocaliz presente en las microvellosidades de los enterocitos. Otro tipo celular importante son las células M, que separan folículos linfoides intestinales en las Placas de Peyer (PP), y que son especializadas en el transporte transepitelial de antígenos a través de la barrera epitelial, usando para ello múltiples mecanismos de endocitosis. Otro tipo de transporte utilizado, es el paracelular en el caso de los enterocitos (Sjölander and Cox, 1998; Kaiserlian and Etchart, 1999). Estudios muestran que los ISCOMs son capturadas rápidamente y eficientemente por células M en las PP. Además, otros estudios indican que también pueden ingresar a enterocitos a través de endocitosis (Mcl Mowat *et al.*, 2005). Esto es coherente, puesto que el tamaño de los ISCOMs es inferior al tamaño máximo de captura de los enterocitos el cual es de 200nm (Sjölander and Cox, 1998).

Como se mencionó anteriormente, para inducir una respuesta inmune, el antígeno, debe ser capturado desde el lumen del intestino y liberado al tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal (GALT). El tejido mucosal intestinal está compuesto por tejido linfoide organizado y disperso. El tejido linfoide organizado está compuesto por las Placas de Peyer (PP), nódulos linfoides solitarios y nódulos linfáticos mesentéricos. La Placa de Peyer es una zona rica en linfocitos B y T y en Células Presentadoras de Antígeno (APC) razón por la cual este es un sitio inductor de inmunidad (Abbas and Lichtman, 2003; Sjölander and Cox, 1998; Yuki and Kiyono, 2003; Quiding *et al.*, 1991). De las células encontradas en las PP y que inducen inmunidad están los linfocitos T helper CD4<sup>+</sup> y linfocitos citotóxicos CD8<sup>+</sup>. También están las APC que pueden ser tanto células dendríticas como macrófagos y son las encargadas de procesar los antígenos y

presentarlos a través de una molécula denominada Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). De estas poblaciones celulares, las células dendríticas son de importancia ya que se ha demostrado que participan en la captura y presentación de antígenos en ISCOMs (Mcl Mowat, 2005; Robson *et al.*, 2003). Los antígenos pueden ser presentados por el MHC clase I y el MHC clase II (Robson *et al.*, 2003; Kersten and Crommelin, 1995). El primero está encargado de presentar péptidos propios y el segundo presenta péptidos foráneos. Los ISCOMs están relacionados con la estimulación de ambas moléculas (Morein and Bengtsson, 1999; Mcl Mowat *et al.*, 1999; Yuki and Kiyono, 2003).

### 5.3.3 Cuantificación de Proteína inserta en el vehículo mediante un método colorimétrico.

La concentración de proteína fue medida en todas las fracciones usando el método de Bradford (Tabla 6). Este método permite la cuantificación espectrofotométrica de proteínas, el cual consiste en la formación de un compuesto de adsorción de coloración azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante azul de coomassie. La intensidad de absorción depende del contenido de aminoácidos básicos y aromáticos.

**Tabla 6:** Concentración, cantidad en microgramos ( $\mu\text{g}$ ) y porcentaje de proteína identificados en las distintas fracciones estudiadas.

Fracción	Concentración $\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g}$	%
1	3,08	11,5	2,57
2	3,42	12,8	2,85
3	3,32	12,5	2,77
4	2,89	10,8	2,41
5	2,83	10,6	2,36
6	3,43	12,9	2,86
7	3,18	11,9	2,65
8	3,35	12,6	2,79
9	2,66	16,3	3,63
Total		112	24,9

En la tabla 6 se observa, que la cantidad de proteína cuantificada en cada fracción es más o menos similar en todas ellas. El porcentaje total de proteína encontrado en

las distintas fracciones es de un 25%. El grado de incorporación de proteína, se puede determinar indirectamente por coincidir en la misma fracción de la gradiente de sacarosa, proteínas y ISCOMs (Sjölander et al., 1998). Entendiendo que los ISCOMs se formaron con la cantidad exacta de proteína, todo el exceso de proteína debiese de quedar en las primeras fracciones de la gradiente junto con el material que no reaccionó y que es de menor peso que el complejo ISCOM-PorA. Como se visualiza en la tabla 6 el porcentaje de proteína en las primeras fracciones es bajo, lo que indica una gran pérdida de proteína en los distintos procesos de la fabricación a los cuales fue sometida la proteína, entre los que están, la diálisis para la formación del complejo ISCOM-proteína, al pasar la solución con el complejo por un filtro y la gradiente de sacarosa.

Según literatura, el porcentaje de incorporación de proteínas depende en gran medida de las características físicoquímicas que presente la proteína y del tratamiento al cual se exponga para insertarla en el ISCOM. En el caso de inmunoglobulina de ratón y de conejo la incorporación estuvo entre el 15 y el 80% después de denaturarla mediante un tratamiento ácido, por otro lado un 30 a 50% de BSA se incorporó al denaturar con una temperatura de 70°C (Barr and Mitchell, 1996). La exposición a pH 2,5 resultó en un 15% de incorporación de la proteína gp120 de HIV-1 (Barr *et al.*, 1998; Sjölander *et al.*, 1998). No obstante, aunque la cantidad de proteína sea poca, lo importante radica en que está en un vehículo como el ISCOM que contiene saponinas, las que a su vez tienen propiedades adyuvantes que producen una mejor respuesta inmunológica (Barr *et al.*, 1998; Yuki and Kiyono, 2003) aumentando el nivel de citoquinas proinflamatorias (Behboudi *et al.*, 1999), estimular la secreción de IL-1, activación de linfocitos T citotóxicos y helper (Sjölander *et al.*, 1998; Sjölander *et al.*, 2001), aumento en la expresión de MHC II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II) sobre las células presentadoras de antígeno (APC) y generación de una respuesta de anticuerpos potente de larga duración (Bengtsson and Sjölander, 1996; Morein and Bengtsson, 1999). Por otro lado, se ha concluido que la frecuencia de administración del antígeno es mas un factor crítico que la cantidad total de antígeno dado en estudios de ISCOM-OVA (ovoalbúmina) (Sjölander and Cox, 1998).

Con el propósito de afrontar otras enfermedades se ha estudiado el desarrollo de ISCOM con otras proteínas de carácter inmunológico. La proteína hemaglutinina (HA) de virus influenza H1N1 inserta en ISCOM genera linfocitos citotóxicos específicos al virus y título de anticuerpos en suero IgG e IgA en pulmón de ratones (Sjölander *et al.*, 2001). La proteína VP6 de rotavirus en ISCOM, genera incremento de linfocitos T CD8+ en placas de peyer de yeyuno y anticuerpo IgG anti-rotavirus en corderos (van Pinxteren *et al.*, 1999). La proteína gp120 de VIH-1 en ISCOM genera anticuerpos neutralizantes contra la proteína y aumento en los niveles de citoquinas en macaco (Verschoor *et al.*, 1999). Proteínas de la cubierta de virus respiratorio sincicial (VRS) en ISCOM genera anticuerpos neutralizantes IgA, IgM e IgG en suero y mucosa específicos a VRS en ratones (Hu *et al.*, 1999). Las proteínas E6 y E7 de virus de papiloma humano (VPH) en ISCOM, genera linfocitos citotóxicos específicos a estas proteínas en ratones (Tarpey *et al.*, 1996). La proteína de 38-kilodalton de *Mycobacterium tuberculosis* genera linfocitos citotóxicos contra la lipoglicoproteína y anticuerpos IgG específicos en el suero contra esta en ratones (da Fonseca *et al.*, 2001).

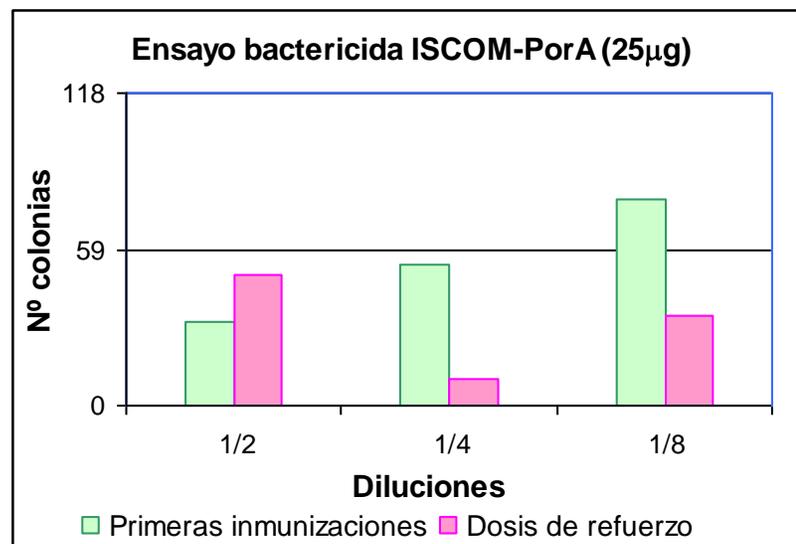
Tomando en consideración los resultados de la cuantificación de proteína y la microscopía electrónica de transmisión se dio paso a preparar la inmunización por vía oral. Debido a que se encontró presencia de ISCOMs desde la fracción 4 en adelante y que la cuantificación de proteína fue similar en todas las fracciones se tomó la decisión de inmunizar con una mezcla de todas ellas. En literatura no se menciona si se inmuniza con alguna fracción de ISCOM en particular o con todas ellas (Peeters *et al.*, 1999; Mcl Mowat *et al.*, 1999, van Pinxteren *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2005; Hägglund *et al.*, 2004).

#### **5.3.4 Inmunización y evaluación de la respuesta inmune mediante la determinación de anticuerpos bactericidas:**

*N. meningitidis* serogrupo B, no posee modelo animal de estudio. No obstante, recientemente se ha descrito un ratón transgénico que expresa la proteína CD46 y que permite a la *N. meningitidis* serogrupo B realizar un cuadro invasivo (Johansson *et al.*, 2003). Este es un modelo ideal para el estudio de la enfermedad y estudio de vacunas,

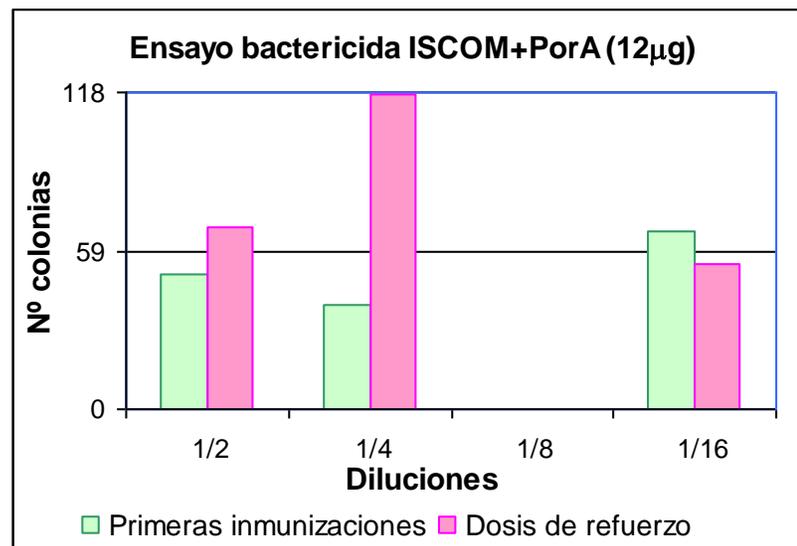
pero no fue posible obtenerlo para el desarrollo de esta tesis. En la actualidad, frente a la no existencia de un modelo animal para ensayar la capacidad protectora de vacunas y nuevas formulaciones, se realiza una prueba indirecta, la determinación de anticuerpos bactericidas contra *N. meningitidis*.

La determinación de anticuerpos bactericidas, se realizó para evaluar la capacidad protectora de los anticuerpos generados por los grupos ISCOM-PorA (25 $\mu$ g), ISCOM+PorA (12 y 4 $\mu$ g) y PorA (10 $\mu$ g), siguiendo el protocolo utilizado en el CDC (USA). El número de colonias contadas en la placa control fue de 118 y debido a que el título bactericida fue definido como la más alta dilución que produce una disminución del 50% o más de las colonias comparado con el control, la presencia de 59 colonias o menos, se consideró un resultado positivo. Con ISCOM-PorA a una dosis de 25 $\mu$ g (Figura 8), se observó actividad bactericida protectora con las 3 primeras inmunizaciones, en las dos primeras diluciones y con la dosis de refuerzo administrada 1 mes después, también se observó actividad bactericida en las tres primeras diluciones.



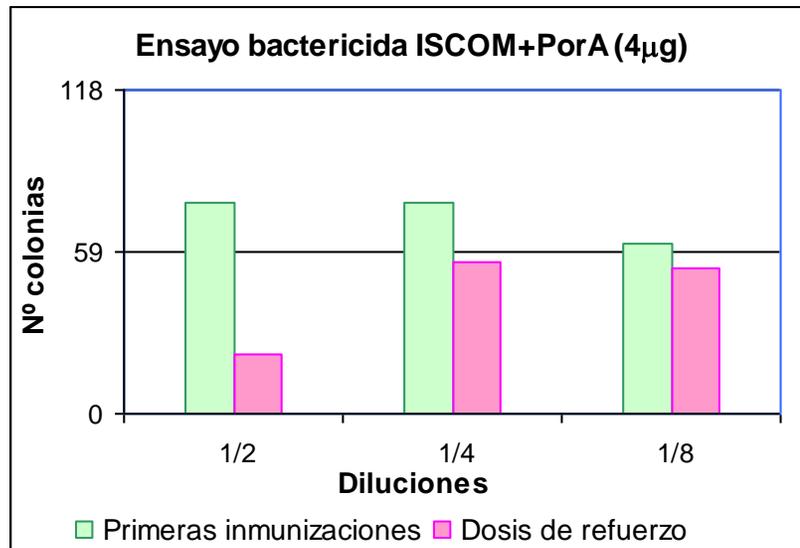
**Figura 8:** Número de colonias promedio hasta las tres primeras diluciones. Control = 118 colonias. 50% = 59 colonias (ver Anexo Tabla 7).

Con ISCOM+PorA a una dosis de 12 $\mu$ g (Figura 9), se observó actividad bactericida con las 3 primeras inmunizaciones, en los dos primeras diluciones y con la dosis de refuerzo administrada 1 mes después, no hay resultados concluyentes debido a que no se observó actividad bactericida en las primeras 3 diluciones, pero sí se observa en la cuarta dilución. Este hecho pudo haberse dado por una falla en la operación de la prueba, ya que al haber actividad bactericida después de las 3 primeras inmunizaciones, se espera que la dosis de refuerzo, haga más potente la respuesta protectora.



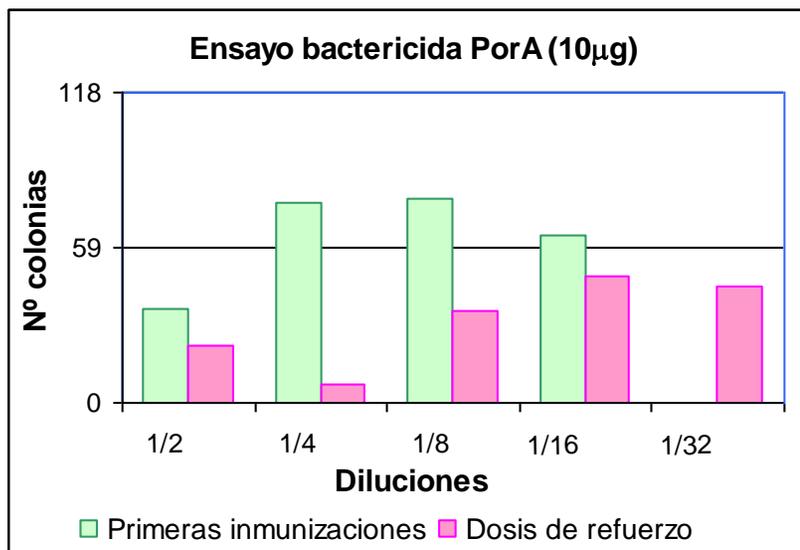
**Figura 9:** Número de colonias promedio hasta las cuatro primeras diluciones. Colonias de la tercera dilución: No Contables. Control = 118 colonias. 50% = 59 colonias (ver Anexo Tabla 8).

Con ISCOM+PorA a una dosis de 4 $\mu$ g (Figura 10), después de las 3 primeras inmunizaciones no se observó actividad bactericida y con la dosis de refuerzo administrada 1 mes después, se observa actividad bactericida en los tres primeras diluciones. El hecho de que no haya actividad bactericida después de las 3 primeras inmunizaciones, puede deberse a que la dosis de proteína haya sido baja para activar al sistema inmune más tempranamente, ya que al observar los resultados de ISCOM+PorA en esta misma etapa a una dosis mayor, sí produjo actividad (Figura 9).



**Figura 10:** Número de colonias promedio hasta las tres primeras diluciones. Control = 118 colonias. 50% = 59 colonias (ver Anexo Tabla 9).

Con PorA sola, a una dosis de 10µg (Figura 11), se observó actividad bactericida con las 3 primeras inmunizaciones, en la primera dilución y con la dosis de refuerzo administrada 1 mes después, también se observó actividad bactericida en las cinco primeros diluciones.



**Figura 11:** Número de colonias promedio hasta las cinco primeras diluciones. Control = 118 colonias. 50% = 59 colonias (ver Anexo Tabla 10).

El análisis de los anticuerpos bactericidas tiene un inconveniente con el conteo de las colonias, ya que este proceso es difícil de estandarizar. A medida que el suero estaba más diluido la cantidad de colonias aumentaba y el conteo se hacía cada vez más engorroso, hasta el punto en que se imposibilitaba el conteo. A este evento se le asignó el término No Contable (NC) (ver Anexo Tablas 7,8,9 y 10). El grupo ISCOM-PorA, inmunizado con una dosis de 50µg, no pudo ser analizado porque la cantidad de suero que había no era la adecuada para el ensayo. En la literatura se menciona a este ensayo, pero realizado con algunas variantes en cuanto al número de ufc por pocillo, el tampón de ensayo, las condiciones de crecimiento, el tiempo de incubación y la dilución del suero, lo que indica que no hay un método único a nivel mundial. Sin embargo, estos parámetros no perjudicaron la prueba, ya que de acuerdo a los resultados esto fue controlado. Además se ha comprobado que el suero humano puede tener anticuerpos adquiridos naturalmente y que reaccionarían frente a polisacáridos específicos del grupo bacteriano, LPS o frente a proteínas de membrana externa, los cuales activan el complemento y producen una lisis bacterial adicional, razón por la cual es que algunos usan suero de conejo (Santos *et al.*, 2001). Esta última variable fue analizada en la técnica que se realizó, dando como resultado que el suero que se usó como fuente de complemento no tenía actividad bactericida en comparación a un suero obtenido de un portador asintomático de *N. meningitidis*, el cual no produjo crecimiento de colonias (ver Anexo protocolo 9).

En general, los resultados obtenidos confirman lo descrito en literatura, en relación a la características inmunogénicas de la proteína PorA. Estudios *in vitro* indican que esta proteína recombinante, por sí sola, es capaz de activar células dendríticas (Al-Bader *et al.*, 2004). Adicionalmente, en un trabajo, se utilizó esta proteína para formular ISCOMs y luego de inmunizar subcutáneamente a ratones, se demostró una inducción del título de anticuerpo IgG (Peeters *et al.*, 1999), lo que indicaría que los ISCOMs son un buen vehículo para el transporte de esta proteína y la generación de respuesta inmune.

Con estos resultados, se puede concluir que todas las preparaciones por vía oral en ratones BALB/c, dieron origen a anticuerpos bactericidas contra *N. meningitidis* serogrupo B. En el caso de ISCOM-PorA (25 $\mu$ g) y ISCOM+PorA (4 $\mu$ g) presentaron actividad bactericida en las diluciones 1/8, mientras que PorA (10 $\mu$ g) en la dilución 1/32. Este último resultado sugiere seguir trabajando en este tema, ya que por sí sola la proteína puede ser utilizada para inducir una respuesta protectora por vía oral.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que la proteína PorA recombinante pudo ser insertada en el ISCOM, para formar el complejo. Las formulaciones, ISCOM, ISCOM-PorA y ISCOM+PorA al ser administradas por vía oral no se destruyeron y resistieron el medio ácido, fueron capaces de llegar al sitio blanco e ingresar al tejido mucosal intestinal y que ISCOM-PorA, ISCOM+PorA y la PorA recombinante por sí sola son capaces de generar anticuerpos bactericidas, los que son aumentados en el tiempo con la dosis de refuerzo. Todos estos puntos indican que los ISCOMs son un buen vehículo para el transporte de proteínas por vía oral y que la proteína PorA formulada como complejo ISCOM-PorA y ISCOM+PorA puede ser utilizada para el desarrollo de vacuna para *N. meningitidis* serogrupo B.

## 6. CONCLUSIONES

El diseño experimental empleado en este trabajo permitió demostrar la hipótesis propuesta y cumplir los objetivos planteados.

La expresión y purificación de la proteína PorA, permitió disponer de una cantidad suficiente para incorporarla al ISCOM en forma exitosa. Las condiciones denaturantes necesarias para lograr la formación del complejo ISCOM-proteína no produjeron alteraciones estructurales permanentes ni variaciones en la estabilidad física ya que la proteína mantuvo sus características inmunogénicas nativas.

La utilización de la gradiente de sacarosa para separar el complejo ISCOM-proteína permitió identificar proteína en todas las fracciones, indicando que parte del contenido de esta no fue “encapsulado” en los ISCOMs y que además se formaron otras estructuras de peso molecular intermedio, situación que configuró el uso de todas las fracciones para la inmunización.

La respuesta protectora obtenida después de la administración del complejo ISCOM-proteína por vía oral, demostró que el complejo y la proteína resistieron las condiciones adversas del TGI, llegaron al sitio de acción, fueron ingresadas a las células presentadoras e indujeron una respuesta bactericida.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sirven de base sólida para permitir el desarrollo de una vacuna por vía oral contra *N. meningitidis* serogrupo B.

## 7. REFERENCIAS

ABBAS A. y LICHTMAN A. *Celular and Molecular Immunology*. 5ª ed. Philadelphia, Saunders, 2003. 33-34p.

AL-BADER T., JOLLEY K., HUMPHRIES H., HOLLOWAY J., HECKELS J., SEMPER A., FRIEDMANN P., CHRISTODOULIDES M. Activation of human dendritic cells by the PorA protein of *Neisseria meningitidis*. *Cellular Microbiology*. 6(7):651-662, 2004.

ARIGITA C., VAN DEN BERG J., WENSINK K., VAN STEENBERGEN M., HENNINK W., CROMMELIN D., KERSTEN G., JISKOOT W. Immunogenicity of meningococcal PorA formulations encapsulated in biodegradable microspheres. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 21:131-141, 2004.

ARIGITA C., KERSTEN G., HAZENDONK T., HENNINK W., CROMMELIN D., JISKOOT W. Restored functional immunogenicity of purified meningococcal PorA by incorporation into liposomes. *Vaccine*. 21:950-960, 2003.

AZMI F.H., LUCAS A. H., SPIEGELBERG H.L., GRANOFF D.M. Human Immunoglobulin M Paraproteins Cross-Reactive with *Neisseria meningitidis* Group B Polysaccharide and Fetal Brain. *Infection and Immunity*. 63(5):1906-1913, 1995.

BARR I.G., SJÖLANDER A, COX J.C. Iscoms and other saponin based adjuvants. *Advanced Drug delivery Reviews*. 32:247-271, 1998.

BARR I.G. y MITCHELL G.F. ISCOMs (immunostimulating complexes): The first decade. *Immunology and Cell Biology*. 74:8-25, 1996.

BEHBOUDI S., MOREIN B., VILLACRES-ERIKSSON M.C. Quillaja Saponins Formulation that Stimulate Proinflammatory Cytokines Elicit a Potent Acquired Cell-Mediated Immunity. *Scandinavian Journal of Immunology*. 50:371-377, 1999.

BENGTSSON L.K. And SJÖLANDER A. Adjuvant activity of iscoms; effect of ratio and co-incorporation of antigen and adjuvant. *Vaccine*. 14(8):753-760, 1996.

BOMFORD R., STAPLETON M., WINSOR S., BEESLEY J.E., JESSUP E.A., PRICE K.R., FENWICK G.R. Adjuvant activity and ISCOM formation by structurally diverse saponins. *Vaccine*. 10(9):572-577, 1992.

COPLAND M.J., RADES T., DAVIES N.M. Hydration of lipid films with an aqueous solution of Quil A: a simple method for the preparation of immune-stimulating complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. 196:135-139, 2000.

DA FONSECA D.P., FRERICHS J., SINGH M., SNIPPE H., VERHEUL A.F.M. Induction of antibody and T-cell responses by immunization with ISCOMS containing the 38-kilodalton protein of *Micobacterium tuberculosis*. Vaccine. 19:122-131, 2001.

DEMANA P.H., DAVIES N.M., BERGER B., RADES T. Incorporation of ovalbumin into ISCOMs and related colloidal particles prepared by the lipid films hydration method. International of Journal Pharmaceutics. 278:263-274, 2004.

DERRICK J.P., URWIN R., SUKER J., FEAVERS I.M., MAIDEN M.J.C. Structural and Evolutionary Inference from Molecular Variation in *Neisseria* Porins. Infection and Immunity. 67(5):2406-2413, 1999.

HÄGGLUND S., HU K., LARSEN L.E., HAKHVERDYAN M., VALARCHER J.F., TAYLOR G., MOREIN B., BELAK S., ALENIUS S. Bovine respiratory syncytial virus ISCOMs-protection in the presence of maternal antibodies. Vaccine. 23:646-655, 2004.

HARRISON L. Prospects for Vaccine Prevention of Meningococcal Infection. Clinical Microbiology Reviews. 19(1):142-164, 2006.

HU K.F., EKSTROM J., MERZA M., BENGTSSON K., MOREIN B. Induction of antibody responses in the common mucosal immune system by respiratory syncytial virus immunostimulating complexes. Med. Microbiol. Immunol. 113:235-243, 1998.

HU K., REGNER M., SIEGRIST C., LAMBERT P., CHEN M., BENGTSSON L.K., MOREIN B. The immunomodulating properties of human respiratory syncytial respiratory and immunostimulating complexes containing *Quillaja* saponin components QH-A, QH-C and ISCOPREP™ 703. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 43:269-273, 2005.

JOHANSSON L., RYTKÖNEN A., BERGMAN P., ALBIGER B., KÄLLSTRÖM H., HÖKFELT T., AGERBERTH B., CATTANEO R., JONSSON A. CD46 in Meningococcal Disease. Science. 301:373-375, 2003.

KAISERLAIN D. y ETCHART N. Entry sites for oral vaccines and drugs: A role for M cells, enterocytes and dendritic cells?. Immunology. 11:217-224,1999.

KAPCZYNSKI D., WILLIAMS D., HARAKEH H., CARLONE G. *Neisseria meningitidis*. Serogroup B Bactericidal Assay. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Estados Unidos, [s.a.].

KERSTEN G.F.A. y CROMMELIN D.J.A. Liposomes and ISCOMS as vaccines formulations. Biochimica et Biophysica Acta. 1241:117-138, 1995.

KERSTEN G.F.A., VAN DE PUT A.M., TEERLINK T., COEN B.E., CROMMELIN D.J.A. Immunogenicity of Liposomes and Iscoms Containing the Mayor Outer Membrane Protein of *Neisseria gonorrhoeae*: Influence of Protein Content and Liposomal Bilayer Composition. Infection and Immunity. 1661-1664, 1988.

KERSTEN G.F.A., SPIEKSTRA A., BEUVERY E.C. and CROMMELIN D.J.A. On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (iscoms). Biochimica et Biophysica Acta. 1062:165-171, 1991.

KÖNNINGS S., COPLAND M.J., DAVIS N.M., RADES T. A method for the incorporation of ovalbumin into immune stimulating complexes prepared by the hydration method. International Journal of Pharmaceutics. 241:385-389, 2002.

LEPOW M.L. y HUGHES P.A. Meningococcal immunology. Immunology and Allergy Clinics of North America. 23:769-786, 2003.

MCGEARY R., OLIVE C., TOTH I. Lipid and Carbohydrate Based Adjuvant/Carriers in Immunology. Journal of Peptide Science. 9:405-418, 2003.

MCI MOWAT, A. Dendritic cells and immune responses to orally administered antigens. Vaccine. 23:1797-1799, 2005.

MCI MOWAT, A. SMITH R.E., DONACHIE A.M., FURRIE E., GRDIC D., LYCKE N. Oral vaccination with immune stimulating complexes. Immunology Letters. 65:133-140, 1999.

MINISTERIO DE SALUD. División de las personas. Departamento de Epidemiología. Normas Técnicas de Vigilancia de Enfermedades Transmisibles. Chile. 50-51, 2000.

MOUNTZOUROS K. y HOWELL A. Detection of Complement-Mediated Antibody-Dependent Bactericidal Activity in a Fluorescence-Based Serum Bactericidal Assay for Group B *Neisseria meningitidis*. Journal of Clinical Microbiology. 38(8):2878-2884, 2000.

MOREIN B. y BENGTSSON L.K. Immunomodulation by Iscoms, immunostimulating complexes. Methods. 19:94-102, 1999.

NAVARRO J.A. La inmunización activa frente a *Neisseria meningitidis* serogrupo B. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 9:513-519, 2003.

O'HAGAN D.T., MACKICHAN M.L., SINGH M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. Biomolecular Engineering. 18:69-85, 2001.

PEARSE M.J. y DRANE D. ISCOMATRIX® adjuvant for antigen delivery. Advanced Drug Delivery Reviews. 57:465-474, 2005.

PEETERS C., CLAASSEN I., SCHULLER M., KERSTEN G., ROUPPE VAN DER VOORT E., POOLMAN J. Immunogenicity of various presentation forms of PorA outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* in mice. Vaccine. 17:2702-2712, 1999.

QUIDING M., NORDSTRÖM I., KILANDER A., ANDERSSON G., HANSON L., HOLMGREN J., CZERKINSKY C. Intestinal Immune Response in Humans. Journal of Clinical Investigation. 88:143-148, 1991.

ROBSON N.C., BEACOCK-SHARP H., DONACHIE A.M., MCI MOWAT A. The role of antigen-presenting cells and interleukin-12 in the priming of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells by immune stimulating complexes. Immunology. 110:95-104, 2003.

SAAVEDRA G. Cristian. Desarrollo de una formulación de un vehículo para la administración de proteínas basado en ISCOMs utilizando saponinas nativas. Tesis (Memoria para optar al grado de Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2004. 65h.

SAMBROOK J. y RUSSELL D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>a</sup> ed. , Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 999p.

SANTOS G., DECK R., DONNELLY J. BLACKWELDER W., GRANOFF D. Importance of Complement Source in Measuring Meningococcal Bactericidal Titers. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 8(3):616-623, 2001.

SEGAL S. y POLLARD A.J. Vaccines against bacterial meningitis. British Medical Bulletin. 72:65-81, 2004.

SJÖLANDER A. and COX J.C. Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines. Advanced Drug Delivery Reviews. 34:321–338, 1998.

SJÖLANDER A., COX J.C. BARR I. ISCOMs: an adjuvant with multiple function. Journal of Leukocyte Biology. 64:713-723, 1998.

SJÖLANDER S., DRANE D., DAVIS R., BEEZUM L., PEARSE M., COX J. Intranasal immunization with influenza-ISCOM induces strong mucosal as well as systemic antibody and cytotoxic T- lymphocyte responses. Vaccine. 19:122-131, 2001.

SMITH R.E., DONACHIE A.M., GRDIC D., LYCKE N., MCI MOWAT A. Immune-Stimulating Complexes Induce an IL-12-Dependent Cascade of Innate Immune Responses. The Journal of Immunology. 162:5536-5546, 1999.

SONG J., MINETTI C., BLAKE M.S., COLOMBINI M. Meningococcal PorA/C1, a Channel that Combines High Conductance and High Selectivity. Biophysical Journal. 76:804-813, 1999.

TARPEY I., STACEY S.N., MC INDOE A., DAVIES D.H. Priming in vivo and quantification in vitro of class I MHC-restricted cytotoxic T cells to human papilloma virus type 11 early proteins (E6 and E7) using immunostimulating complexes (ISCOMs). Vaccine. 14:230-236, 1996.

VAN DER LEY, P., HECKELS, J.E., VIRJI M., HOOGERHOUT, P., POOLMAN J.T. Topology of outer-membrane porins in pathogenic Neisseria spp. Infection and Immunity. 59:2963-2971, 1991.

VAN DEUREN M., BRANDTZAEG P., VAN DER MEER J. Update on Meningococcal Disease with Emphasis on Patogénesis and Clinical Management. Clinical Microbiology Reviews. 13(1):144-166, 2000.

VAN PINXTEREN L.A.H., BRUCE M.G., CAMPBELL I., WOOD A., CLARKE C.J. BELLMAN A., MOREIN B., SNODGRASS D.R. Effect of oral rotavirus/iscom vaccines on immune responses in gnotobiotic lambs. Veterinary Immunology and Immunopathology. 71:53-67, 1999.

VERSCHOOR E.J., MOOIJ P., OOSTERMEIJER H., VAN DER KOLK M., TEN HAAFT P., VERSTREPEN B., SUN Y., MOREIN B., AKERBLOM L., FULLER D., BARNETT S., HEENEY L. Comparison of immunity generated by nucleic acid-, MF59-, and ISCOM-formulated human immunodeficiency virus type 1 vaccines in Rhesus macaques: evidence for viral clearance. Journal of Virology. 73:3292-3300, 1999.

WOOF J.M. y KERR M.A. IgA function – variations on a theme. Immunology. 113:175-177, 2004.

YUKI Y. y KIYONO H. New generation of mucosal adjuvant for the induction of protective immunity. Reviews in Medical Virology. 13:293-310, 2003.

## 8. ANEXOS

### A. Composición de las soluciones y reactivos usados:

#### Protocolo 1: Medio LB (Luria – Bertani):

<i>Materias primas</i>	%
Triptona	1
Extracto de levadura	0,5
Cloruro de sodio	1
Agua c.s.p.	100

- i. Pesar cada reactivo e incorpórelos en un matraz erlenmeyer de 250mL.
- ii. Agregar agua destilada y disolver de manera suave.
- iii. Autoclavar 15 minutos a 121 °C

#### Protocolo 2: Placa agar LB suplementado con ampicilina:

<i>Materias primas</i>	%
Triptona	2
Extracto de levadura	1
Cloruro de sodio	2
Agar	3
Agua c.s.p.	200

- i. Pesar cada reactivo e incorporarlos a un frasco de tapa rosca de 500mL.
- ii. Agregar agua destilada y disolver de manera suave.
- iii. Autoclavar 15 minutos a 121 °C.
- iv. Luego de autoclavar esperar que el frasco con la solución este a una temperatura soportable a la palma de la mano (Trabajar cerca de mechero en forma esteril); agregar 1µl de ampicilina de concentración 100 mg/m por cada ml de medio LB.
- v. Agitar suavemente.
- vi. Agregue el medio a placas petri aproximadamente 20 mL/ placa

#### Protocolo 3: Ampicilina 100 mg/ml :

- i. Tarar un vaso de precipitado de 10 mL y pesar 1gramo de ampicilina.
- ii. Disolver en agua destilada estéril, trasvasijar a un matraz aforado de 10 ml.
- iii. Agregar agua destilada hasta completar el aforo.
- iv. Alicuotar en tubos eppendorf de 1mL. Almacenar a - 20 °C.

#### Protocolo 4: IPTG 0,1M:

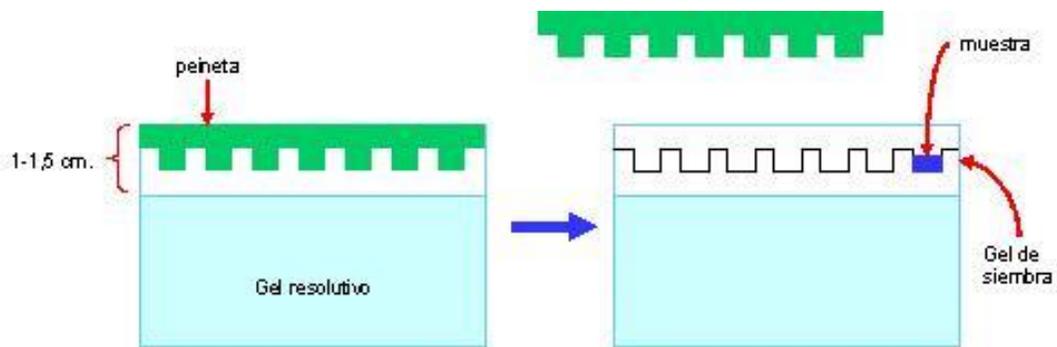
- i. Tarar un vaso de precipitado de 10mL y pesar 1,2 gramos de IPTG.
- ii. Disolver en agua destilada y trasvasijar a un matraz aforado de 50mL.
- iii. Agregar agua destilada hasta completar el aforo y esterilizar por filtración, 0,22µm.
- iv. Alicuotar en tubos eppendorf de 1mL. Almacenar a - 20 °C

### Protocolo 5: Soluciones para preparación de geles SDS-PAGE:

Materias primas	Gel resolutivo 10% (mL)	Gel de siembra (mL)
Agua destilada	4,0	6,0
Tris-HCl 1,5M pH8,8	2,5	----
Tris-HCl 0,5M pH6,8	----	2,5
Acrilamida/Bis acrilamida	3,3	1,3
SDS 10%	0,1	0,1
Persulfato de amonio 10%	0,1	0,1
Temed	0,01	0,01

#### Preparación del gel:

- i. Preparar el molde para el gel. Hacer una marca de aproximadamente 1-1,5 cm. debajo del nivel del "peine" de muestras. Retirar el peine.
- ii. Agregar la mezcla que formará el gel resolutivo, hasta la marca de 1-1,5 cm.



#### Gel resolutivo:

- iii. En un vaso precipitado de 100 mL agregar con pipeta el agua destilada, el buffer Tris-HCl pH8,8, la acrilamida/bisacrilamida y el SDS.
- iv. Finalmente agregar el persulfato de amonio y el temed.
- v. Mezclar suavemente y agregar rápidamente al molde para preparar el gel.
- vi. Una vez agregada la mezcla, eliminar la curvatura (menisco) en la superficie, con una delgada capa (1-2 mm) de agua destilada o de isobutanol, depositada muy suavemente sobre la mezcla. Dejar que polimerice el gel (óptimamente en 15-20 min).
- vii. Cuando la interfase entre el polímero y el agua se torna visible, decantar el exceso de líquido de la superficie y preparar el gel de siembra.

#### Gel de siembra:

- viii. En un vaso precipitado de 100 mL agregar con pipeta el agua destilada, el buffer Tris-HCl pH6,8, la acrilamida/bisacrilamida y el SDS.
- ix. Finalmente agregar el persulfato de amonio y el temed.
- x. Mezclar suavemente y agregar rápidamente al molde sobre el gel resolutivo.
- xi. Colocar la peineta y esperar a que se forme el gel.

- xii. Cuando el gel este listo, este se coloca en la cámara de electroforesis, junto con el buffer de cámara (100mL del buffer de cámara 10X más 900mL de agua destilada). Retirar la peineta, limpiar los pocillos y cargar la muestra.

**A.- Buffer Tris-HCl 1,5M pH 8,8:**

<i>Materias primas</i>	<i>Cantidad</i>
Tris base	18,2 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

- i. Pesar tris base y disolverlo en una cantidad de agua destilada en un vaso precipitado.
- ii. Ajustar pH con HCl y aforar con agua destilada.
- iii. Almacenar a 4°C.

**B.- Buffer Tris-HCl 0,5M pH 6,8:**

<i>Materias primas</i>	<i>Cantidad</i>
Tris base	6,1 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

- i. Pesar tris base y disolverlo en una cantidad de agua destilada en un vaso precipitado.
- ii. Ajustar pH con HCl y aforar con agua destilada.
- iii. Almacenar a 4°C.

**C.- Acrilamida/Bisacrilamida:**

<i>Materias primas</i>	<i>Cantidad</i>
Acrilamida	29,2 g
Bisacrilamida	0,8 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

- i. Pesar con guantes y mascarilla ambos reactivos, disolver y aforar a la cantidad indicada.
- ii. Filtrar por membrana 0,45µn.
- iii. Almacenar a 4°C.

**D.- SDS 10%:**

<i>Materias primas</i>	<i>Cantidad</i>
SDS	10 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

- i. Pesar con guantes y mascarilla.
- ii. Disolver con el agua destilada y agitar con precaución para evitar la formación de espuma.
- iii. Aforar a la cantidad indicada y almacenar.

#### E.- Persulfato de amonio:

<i>Materias primas</i>	<i>Cantidad</i>
APS	1 g
Agua destilada c.s.p.	1 mL

- i. Pesar el APS (persulfato de amonio) y disolverlo con agua destilada.
- ii. Aforar a la cantidad indicada.
- iii. Alicuotar en tubos eppendorf de 1mL. Almacenar a 4°C.

#### F.- Buffer de cámara:

<i>Materias primas</i>	<i>Cantidad</i>	
	10X	5X
Tris base	30 g	15 g
Glicina	140 g	70 g
SDS 10%	100 mL	50 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL	500 mL

- i. Agregar en un vaso precipitado el tris base, la glicina y el agua destilada para disolverlos.
- ii. Agregar el SDS lentamente para evitar la formación de espuma.
- iii. Aforar a la cantidad indicada y almacenar a 4°C.

#### G.- Solución de tinción de azul de comassie:

<i>Materias primas</i>	<i>Cantidad</i>
Azul de comassie	0,25 g
Ácido acético	10 mL
Metanol absoluto	50 mL
Agua destilada c.s.p.	100 mL

- i. Pesar el azul de comassie y disolverlo con el ácido acético, el metanol absoluto y parte del agua.
- ii. Aforar hasta la cantidad indicada.

#### H.- Solución decolorante:

<i>Materias primas</i>	<i>Cantidad</i>
Ácido acético	450 mL
Metanol absoluto	70 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

- i. Medir los volúmenes que se indican.
- ii. Mezclarlos y aforarlos con agua hasta la cantidad necesaria.

Protocolo 6: Buffer fosfato 0,1M (ocupado en purificación):

<i>Materias primas</i>	<i>Cantidad</i>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (solución 0,2M)	26,5 mL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (solución 0,2M)	473,5 mL
Agua c.s.p.	1000 mL

- iii. Medir los volúmenes que se indican.
- iv. Mezclarlos y aforarlos con agua hasta la cantidad necesaria.
- v. Almacenar a 4°C.

Protocolo 7: Buffer fosfato 0,01M (ocupado en la diálisis para la fabricación de ISCOM):

<i>Materias primas</i>	<i>Cantidad</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,36 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

- i. Pesar el KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, agregar el agua destilada y disolverlo.
- ii. Ajustar a pH 7 con NaOH y aforar hasta la cantidad necesaria.

Protocolo 8: Análisis de los sueros. Análisis de anticuerpos bactericidas para el serogrupo B de *N. meningitidis*:

- i. Sembrar una alícuota de *Neisseria meningitidis* en Agar noble (US Biological) suplementado con medio de cultivo Tryptic Soy Broth(\*) (Difco) (TSB/A) por aproximadamente 24 horas a 37°C y en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%.  
(\*)TSB: Pancreatic Digest of Casein, Enzymatic Digest of Soybean Meal, Sodium Chloride, Dipotassium Phosphate, Dextrose.
- ii. Tomar con tórula colonias del día anterior y sembrar en una placa con TSB/A por 4 horas a 37°C en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%.
- iii. Preparar una solución de trabajo bacteriana. Tomar la placa de 4 horas de incubación y con una tórula cultivo y colocarlo en aproximadamente 5 mL de buffer de Hanks (NaHCO<sub>3</sub> 4mM, glucosa y albumina bovina sérica 0,1%). La lectura en espectrofotómetro a 600nm debe ser 0,35, lo que equivaldría a 5×10<sup>8</sup> ufc/mL. De esta solución bacteriana hacer diluciones las siguientes diluciones:  
Dilución 1:15. A 180 µL de buffer de Hanks adicionarle 13 µL de la solución bacteriana, quedando aproximadamente una concentración de 5×10<sup>7</sup> ufc/mL.  
Dilución 1:100. A 990 µL de buffer de Hanks adicionarle 10 µL de la dilución 1:15, quedando aproximadamente una concentración de 5×10<sup>5</sup> ufc/mL.  
Dilución 1:50. A 4900 µL de buffer de Hanks conteniendo 2,5 unidades/mL de heparina, adicionarle 100 µL de la dilución 1:100, quedando aproximadamente una concentración de 1×10<sup>4</sup> ufc/mL.
- iv. En microplaca de 96 pocillos fondo plano colocar:
  - 25µL de buffer de Hanks en las columnas 2-10 y columna 12 A-D.
  - 27µL de buffer de Hanks en la columna 11 A-H.
  - 40µL de buffer de Hanks en la columna 12 E-H.
- v. Agregar 50 µL de suero de ratón a la columna 1 de la placa.

- vi. Transferir 25  $\mu$ L de columna 1 a la 2 y mezclar 5 veces con la pipeta. Después de mezclar remover 25  $\mu$ L de la columna 2 y transferirlos a la 3. Continuar con esto hasta llegar a la columna 10; al final de mezclar el contenido de la columna 10, remover los 25  $\mu$ L y descartarlos.
- vii. Colocar en los pocillos 10  $\mu$ L de la solución de trabajo bacteriana (dilución 1:50).
- viii. Agregar 15 $\mu$ L de complemento (suero) a las columnas 1-10 y en la columna 12 A-D. A la columna 11 agregar 12,5  $\mu$ L de suero de paciente inactivado a 56°C en baño maría por 30 minutos.
- ix. Incubar la microplaca 30 minutos a 37°C sin CO<sub>2</sub>.
- x. Agregar a todos los pocillos 100  $\mu$ L de agar TSB/A.
- xi. Incubar 18-24 horas a 37°C en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%.
- xii. En paralelo sembrar en una placa agar GC(\*) (Difco) 10  $\mu$ L de solución de trabajo bacteriana (dilución 1:50) (Control).
  - (\*) GC: Proteose Peptone No. 3, Corn Starch, Dipotassium Phosphate, Monopotassium Phosphate, Sodium Chloride, Agar.
- xiii. Leer la placa GC control y las 12 columnas de la placa.

Protocolo 9: Test del complemento.

Realizado para medir si es que el suero, utilizado como fuente del complemento tiene anticuerpos bactericidas contra *N. meningitidis* serogrupo B.

- i. Preparar una solución de trabajo bacteriana, como en el punto iii del protocolo 8.
- ii. Control complemento negativo: colocar 25  $\mu$ L de buffer de Hanks, 10  $\mu$ L de la solución de trabajo bacteriana y 15  $\mu$ L del suero a controlar.
- iii. Control complemento positivo (de un suero de un portador asintomático de *N. meningitidis*): colocar 12,5  $\mu$ L de buffer de Hanks, 12,5  $\mu$ L del suero positivo, 10  $\mu$ L de la solución de trabajo bacteriana y 15  $\mu$ L de suero como fuente de complemento.
- iv. Después de agregar todos los componentes, cubrir la placa e incubarla en un ambiente sin CO<sub>2</sub> a 37°C por 30 minutos.
- v. Después de 30 minutos agregar 100  $\mu$ L de TSB/A como se describe en el protocolo 8.
- vi. Cubrir la placa e incubar toda la noche a 37°C en un ambiente con un 5% de CO<sub>2</sub>.

**B. Tablas**

**Tabla 7:** Número de colonias promedio en las distintas diluciones para ISCOM-PorA (25 $\mu$ g).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DILUCIONES	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
ISCOM-PorA	32	53	78	63	80	69	NC	NC	NC	NC
ISCOM-PorA(*)	49	10	34	NC	73	86	103	NC	NC	96

Control de viabilidad bacteriana: 118 colonias. (\*): Dosis de refuerzo. NC: no contable.

**Tabla 8:** Número de colonias promedio en las distintas diluciones para ISCOM+PorA (12µg).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DILUCIONES	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
ISCOM+PorA	50	39	NC	66	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ISCOM+PorA(*)	68	117	NC	54	99	78	74	70	88	91

Control de viabilidad bacteriana: 118 colonias. (\*): Dosis de refuerzo. NC: no contable.

**Tabla 9:** Número de colonias promedio en las distintas diluciones para ISCOM+PorA (4µg).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DILUCIONES	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
ISCOM+PorA	77	77	62	92	65	57	NC	NC	NC	NC
ISCOM+PorA(*)	22	55	53	NC	NC	84	NC	82	NC	NC

Control de viabilidad bacteriana: 118 colonias. (\*): Dosis de refuerzo. NC: no contable.

**Tabla 10:** Número de colonias promedio en las distintas diluciones para PorA (10µg).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DILUCIONES	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
PorA	36	76	78	64	51	84	NC	NC	NC	NC
PorA(*)	22	7	35	48	44	72	85	NC	NC	NC

Control de viabilidad bacteriana: 118 colonias. (\*): Dosis de refuerzo. NC: no contable.