

Obtención de extractos de membrana externa de *Vibrio cholerae* O1, mediante el uso de diferentes detergentes

José Luis Pérez, Yamisley González, Gemma Año, Bárbara Cedré, Tania Valmaseda, Maydelis Alvarez, Daily Serrano, Ernesto Millián, Mildrey Fariñas, Arturo Talavera y Luis García.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P. 11600, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: jlperez@finlay.edu.cu

En la actualidad existen dos variantes principales de vacunas orales contra el cólera: una basada en células inactivadas de diferentes biotipos y serotipos y otra basada en la administración de cepas vivas genéticamente atenuadas. Una vacuna por subunidades pudiera ser una variante muy atractiva. Este trabajo describe la purificación parcial y caracterización preliminar de extractos de proteínas de membrana externa-lipopolisacárido (PME-LPS), obtenidos a partir de *Vibrio cholerae* O1, con el interés de seleccionar un proteoliposoma que posteriormente será estructurado en forma de coqueatos para su uso por vía oral en humanos. Las preparaciones fueron obtenidas a través del uso de diferentes detergentes. La cantidad de LPS en cada preparación fue estimada mediante la determinación de las unidades endotóxicas en el ensayo del *Limulus* (*LAL*). La composición de cada muestra fue evaluada mediante *SDS-PAGE* y *Dot Blot*. La inoculación intranasal (IN) en ratones Balb/c se utilizó para la evaluación de la inmunogenicidad de las preparaciones, y la respuesta inmune fue determinada por ELISA y el título de anticuerpos vibriocidas. El tamaño molecular de la preparación con mejores resultados en inmunogenicidad se estimó mediante la cromatografía en Sephacryl S-1000. Se obtuvieron diferentes perfiles electroforéticos de acuerdo con el tipo de detergente utilizado. El LPS fue identificado en todas las preparaciones y aquella obtenida con el SDS al 15% mostró la más baja relación proteínas/LPS y los mejores resultados en los ensayos de inmunogenicidad. Adicionalmente se comprobó que su tamaño molecular es similar al observado en el proteoliposoma de VA-MENGOC-BC®. La preparación obtenida con el SDS al 15% constituye un proteoliposoma, con capacidad para estimular altos niveles de anticuerpos IgG anti-LPS y altos títulos de anticuerpos vibriocidas, luego de su administración por vía intranasal en ratones. Estos resultados constituyen un importante paso en las investigaciones dirigidas a la obtención de una vacuna por subunidades, como alternativa preventiva contra el cólera.

Palabras clave: Cólera, vacunas, respuesta vibriocida, complejos PME-LPS.

Introducción

El cólera es una de las infecciones entéricas que más drásticamente ha incidido en la salud de la población mundial (1, 2) y continúa siendo un serio problema en muchos países del mundo (3). El agente causal de esta enfermedad es *Vibrio cholerae*, de los serogrupos O1 y O139. El serogrupo O1 se divide en dos serotipos fundamentales: Clásico y El Tor, este último es el más ampliamente distribuido a nivel mundial y el principal responsable de la actual pandemia de la enfermedad (3).

Durante los últimos 20 años diferentes grupos de investigadores han trabajado con el objetivo de obtener una vacuna que sea capaz de prevenir la enfermedad en todos los grupos de edades y durante un largo período de tiempo.

Las cepas vacunales CVD 103 HgR (biotipo Clásico) y Perú 15 (biotipo El Tor) son cepas genéticamente atenuadas que han demostrado ser inmunogénicas, bien toleradas y protectoras en el modelo humano de reto experimental; la primera de ellas ha sido sometida a numerosos ensayos clínicos y constituye en la actualidad un producto licenciado en varios países (2, 5). Nuestro grupo ha trabajado también con el objetivo de obtener una vacuna contra el cólera y está evaluando en humanos la cepa atenuada 638, *V. cholerae* O1, El Tor Ogawa (6, 7, 8) que hasta la fecha ha demostrado ser consistentemente inmunogénica, bien tolerada en voluntarios cubanos (9) y ecuatorianos (datos no publicados), capaz de conferir protección pasiva en el modelo del ratón neonato (10) y contra un reto experimental en humanos, con la cepa salvaje 3008,

V. cholerae O1, El Tor Ogawa (11). Sin embargo, a estos candidatos vacunales les resta demostrar su eficacia protectora en un ensayo a gran escala en un área donde el cólera sea endémico. Recientemente han sido publicados los resultados de una vacunación masiva, con una vacuna oral inactivada suplementada con la subunidad B de la toxina del cólera, en Beira, Mozambique, que confirió un 78% de protección, tanto en niños como en adultos y en un área donde la incidencia del VIH es del 20-30% de la población, además de ser completamente segura y bien tolerada (12). No obstante ambas variantes vacunales presentan aspectos a favor y en contra que han afectado sus resultados, disponibilidad y posibilidades de aplicación en áreas endémicas y/o epidémicas y la enfermedad continúa siendo un serio problema de salud, fundamentalmente en países del Tercer Mundo.

Con el suero de los humanos inoculados con la cepa atenuada 638 hemos realizado estudios de especificidad y los resultados obtenidos (datos no publicados) constituyeron evidencias que confirmaron el carácter multifactorial de la inmunidad contra el cólera, en la que se destaca el papel del LPS como antígeno más importante, así como el de las PME que también desempeñan un importante papel (13). Estos resultados se han tenido en cuenta para el diseño de una estrategia alternativa, encaminada a la obtención de un preparado con potencialidades para constituir un candidato a vacuna por subunidades. Este trabajo describe la purificación parcial y caracterización preliminar desde el punto de vista físico-químico e inmunogénico de extractos de PME-LPS, obtenidos a partir de *V. cholerae* O1, con el interés de seleccionar un proteoliposoma que

posteriormente será estructurado en forma de coqueatos, con vistas a su uso por vía oral en humanos como posible candidato vacunal por subunidades contra el cólera.

Materiales y Métodos

Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa C7258, *V. cholerae* O1, biotipo El Tor, serotipo Ogawa (14), cultivada en un medio compuesto por Peptona de carne (MERCK) 3 g/L, Triptona (MERCK) 17 g/L, K₂HPO₄ (MERCK) 2,5 g/L y NaCl₂ (MERCK) 5 g/L, pH 7,2, durante 6h a 37 °C y 200 rpm de agitación rotacional.

Obtención de los extractos PME-LPS

La biomasa celular obtenida como resultado de la centrifugación del cultivo a 17 700 x g durante 1 h a 4 °C, se resuspendió en solución tampón 30 mM Tris - 2 mM EDTA pH 8,5, y se lavó dos veces con la misma solución. Finalmente se resuspendió en la misma solución y se dividió en nueve volúmenes iguales, a cada volumen se añadió un detergente diferente como sigue: Desoxicolato de Sodio (DEO) al 15%, Tween 20 al 15%, Tween 80 al 15%, SDS al 5%, 10% y 15% y Tritón X-100 al 5%, 10% y 15%. En todos los casos el detergente se añadió a 0,25 mL/g de biomasa. Posteriormente se efectuó una centrifugación bajo las mismas condiciones antes descritas, el sedimento se desechó y los sobrenadantes se sometieron a una ultracentrifugación a 65 000 xg durante 8 h a 4 °C. Los sedimentos obtenidos finalmente se resuspendieron en la solución tampón antes descrita, se filtraron a través de filtros Sartorius Minisart-plus de 0,45 y 0,2 µm respectivamente y se almacenaron a 4 °C.

Determinación de proteínas y LPS

La concentración de proteínas se cuantificó utilizando el método de Lowry (15) y un estándar de BSA. La concentración de LPS fue estimada mediante la determinación de las unidades endotóxicas, utilizando el ensayo del *LAL* (16), en el cual se incluyó una preparación de 1 mg/mL de LPS Ogawa purificado como patrón de referencia.

SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (12,5%), seguida de una tinción con azul comassie R250 (Sigma) (17). Se aplicaron 4 µg de cada muestra. Se utilizó como patrón de peso molecular (PPM) una mezcla de fosforilase b (94 kDa), BSA (67 kDa), OVA (43 kDa), Anhidrasa Carbónica (30 kDa), Soybean trypsin inhibitor (20,1 kDa) y α-lactalbumina (14,4 kDa). Posteriormente los geles se colocaron en un procesador de imágenes (Gene Genius Bioimaging System), para determinar el tamaño molecular de las proteínas, así como identificar las proteínas mayoritarias en cada muestra.

Dot Blot

La presencia de LPS en las preparaciones obtenidas se visualizó por medio de un *Dot Blot* (18). Las preparaciones fueron ajustadas 5 mg de proteínas/mL y 5 µL de cada una, fueron aplicadas en una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó LPS Ogawa y O139 (ambos purificados en nuestro laboratorio) como control positivo y negativo

respectivamente, así como un anticuerpo monoclonal anti-LPS Ogawa (2B4G5), a 25 µg/mL, obtenido en el Instituto Finlay, Habana, Cuba.

Cromatografía en columna: La preparación que mostró los mejores resultados en los ensayos de inmunogenicidad fue evaluada en columna cromatográfica XK16/100, empaquetada con Sephacryl S-1000 y equilibrada con 30 mM Tris - 2 mM EDTA - 0,5% del detergente correspondiente pH 8,5. El tamaño molecular fue estimado a través de la relación del volumen de elusión de cada componente (Ve) y el volumen total de la columna (Vt), así como tomando como referencia los estudios de caracterización realizados con el proteoliposoma de VA-MENGOC-BC[®], cuyo Ve/Vt promedio es 0,66 con tamaño molecular estimado entre los 50-80 nm (Acta Farmacéutica Bonaerense [En prensa]).

Ensayo de Inmunogenicidad

La inmunogenicidad de las muestras obtenidas fue evaluada utilizando el modelo de IN en ratones Balb/c. Se emplearon ratones de aproximadamente 18-20 g (9 a 11 semanas de edad), de sexo masculino, suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), con su correspondiente certificado de salud. Los animales fueron mantenidos antes y durante los ensayos, siguiendo las instrucciones que aparecen en la *Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación* (19) y el protocolo de los experimentos fue analizado y autorizado por el Comité de Ética para el trabajo con animales de laboratorio del Instituto Finlay. Los ratones fueron distribuidos en 10 grupos de 10 animales cada uno y se inocularon como sigue: los grupos 1 al 9 recibieron 20 µL (10 µL por fosa nasal de una u otra preparación a evaluar, las cuales fueron ajustadas a 1 mg de LPS/mL y el grupo 10 (control negativo del ensayo) recibió PBS. Se administraron 2 dosis separadas 28 días una de otra. Las extracciones de sangre se realizaron antes de la primera dosis y a los 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días después.

Determinación del título de anticuerpos IgG anti LPS O1

El título de anticuerpos IgG anti-LPS O1, se determinó por medio de un ELISA indirecto, en el que se utilizó LPS Ogawa como antígeno en fase sólida (20). El título fue definido como la dilución del suero (calculada por interpolación), que da un valor de absorbancia de 0,4 unidades por encima del valor de fondo. Los resultados son expresados como el logaritmo del recíproco del título medio aritmético (20).

Determinación del título de anticuerpos vibriocidas

Se siguió un procedimiento previamente descrito (20). Brevemente, 50 µL de sueros descomplementados en diluciones doble seriadas con PBS fueron mezclados con igual volumen de una suspensión bacteriana de la cepa VC12, *V. cholerae* O1, Clásico Ogawa, conteniendo 10⁸ UFC/mL, suplementada con complemento de curiel al 2% y colocados en placas de 96 pocillos. La mezcla fue incubada 1 h a 37 °C y posteriormente suplementada con 150 µL de Caldo Infusión Cerebro-Corazón, que contiene 2% de dextrosa y 0,02% de púrpura de bromocresol. Las placas fueron colocadas a 37 °C durante 3 h y posteriormente se procedió a la lectura por observación visual. Durante la reacción bactericida, la dilución del suero en la primera columna de la placa es 1:20 y en la última columna es 1:40960. El crecimiento bacteriano se determinó por el cambio de color en el

medio y el título se asume como el inverso de la mayor dilución del suero, en la que se observó inhibición completa del crecimiento bacteriano, reflejado por la invariabilidad del color del medio. Los resultados fueron expresados como el logaritmo del título medio geométrico de anticuerpos vibriocidas en el suero (GMT).

Pruebas estadísticas

Para el procesamiento estadístico de los datos fueron utilizados el análisis de Varianza y la prueba t de Student con un nivel de significación de 0,05%.

Resultados

En este trabajo se evaluó el uso de diferentes detergentes para la extracción de complejos de PME-LPS a partir de la superficie externa de *V. cholerae* O1. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos, luego de cuantificar la cantidad de proteína y LPS en cada caso. La concentración de proteínas más elevada se obtuvo con la utilización de DEO (15%), SDS (10%), Tritón X-100 (5%) y Tritón X-100 (10%) como detergentes, los cuales mostraron resultados no significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$). En otros casos como el SDS (5%), el SDS (15%), y el Tritón X-100 (15%), la cantidad de proteínas obtenidas fue significativamente menor y tampoco se observaron diferencias significativas dentro de este grupo ($P < 0,05$). Con la utilización del Tween 20 (15%) y el Tween 80 (15%) se obtuvieron los más bajos niveles de proteínas en el ensayo,

significativamente diferentes a los anteriores aunque no entre sí ($P < 0,05$). Para el caso del LPS los resultados obtenidos indican que la mayor cantidad de LPS se obtiene cuando en la extracción se utiliza el DEO (15%), el SDS (5, 10,15%) y el Tritón X-100 (10%), con diferencias no significativas entre sí ($P < 0,05$). Cuando se utiliza el Tritón X-100 (5, 15%) y el Tween 20 (15%) la cantidad de LPS obtenida es significativamente menor con respecto a los anteriores y no diferente entre sí ($P < 0,05$) y cuando se utilizó el Tween 80 (15%) se obtuvieron los más bajos niveles de LPS en el estudio, significativamente menores que los obtenidos con el resto de los detergentes, excepto cuando se compararon con los obtenidos con el Tween 20 (15%), entre los que no se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$). La Tabla 1 también muestra la relación proteínas/LPS para cada preparación, y se observa que con el Tritón X-100 al 5% y al 15%, se obtuvieron las preparaciones que contienen la más elevada cantidad de proteínas respecto a la cantidad de LPS ($P < 0,05$). En cambio, con el SDS al 15%, se obtuvo la preparación con la más baja relación ($P < 0,05$).

Se realizaron tres procesos de extracción y purificación utilizando cada variante de detergente. Los resultados representan la cantidad de proteínas y LPS/g de biomasa celular y son expresados como la media aritmética y el error de la media para cada caso. Un mg de LPS purificado, utilizado como referencia en el ensayo del *LAL*, contiene 140 000 unidades endotóxicas.

Tabla 1. Cuantificación de proteínas y LPS.

Detergentes	Proteínas (mg)	LPS (mg)	Relación Proteínas/LPS	Unidades Endotox. x 1000
DEO (15%)	8,75 ± 1,75	0,78 ± 0,15	11,21 ± 0,08	109,2 ± 19
SDS (5%)	4,40 ± 1,03	0,75 ± 0,17	5,86 ± 0,04	105 ± 25,1
SDS (10%)	6,01 ± 1,05	0,9 ± 0,15	6,67 ± 0,05	126 ± 20
SDS (15%)	3,74 ± 1,01	0,81 ± 0,20	4,61 ± 0,09	113,4 ± 25
Triton X-100 (5%)	5,84 ± 1,8	0,5 ± 0,14	11,68 ± 0,25	70 ± 15
Triton X-100 (10%)	5,71 ± 2,1	0,6 ± 0,15	9,51 ± 0,87	84 ± 24
Triton X-100 (15%)	5,18 ± 1,5	0,45 ± 0,13	11,51 ± 0,07	63 ± 20,1
Tween 20 (15%)	1,89 ± 1,03	0,33 ± 0,16	5,72 ± 0,21	46,2 ± 23,3
Tween 80 (15%)	1,04 ± 0,8	0,18 ± 0,12	5,77 ± 0,34	25,2 ± 19,5

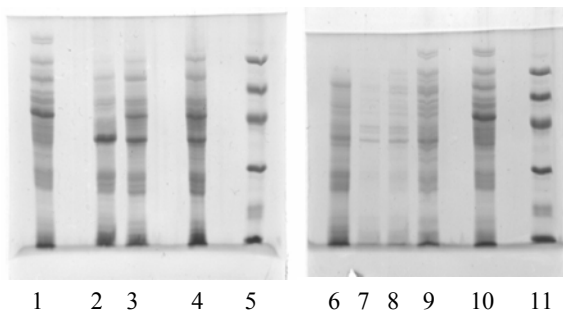


Figura 1. SDS- PAGE (12,5% de acrilamida, tinción con Coomassie). 10 µg de proteína de cada muestra. 1:5% Tritón X-100, 2:15% SDS, 3: 10% SDS, 4: 5% SDS, 5: Patrón de Peso Molecular (PPM), 6: 15% DEO, 7: 15% Tween 80, 8: 15% Tween 20, 9: 15% Tritón X-100, 10: 10 % Tritón X-100, 11: PPM.

La Figura 1 muestra los perfiles electroforéticos de cada una de las preparaciones obtenidas para los diferentes detergentes, con diferencias apreciables en su composición. En contraste, se observó una elevada similitud entre los perfiles correspondientes a las diferentes concentraciones de un mismo detergente, aunque para el caso del SDS (15%) no se aprecia una banda próxima a los 43 kDa, que sí aparece muy bien expresada en las preparaciones correspondientes a las otras dos concentraciones en que fue utilizado este detergente (5 y 10%). Por otra parte, se observó que en las preparaciones obtenidas con este último, aparece muy bien expresada una proteína con peso molecular próximo a los 40 kDa, que no se observa en el resto de las preparaciones, al menos de manera evidente.

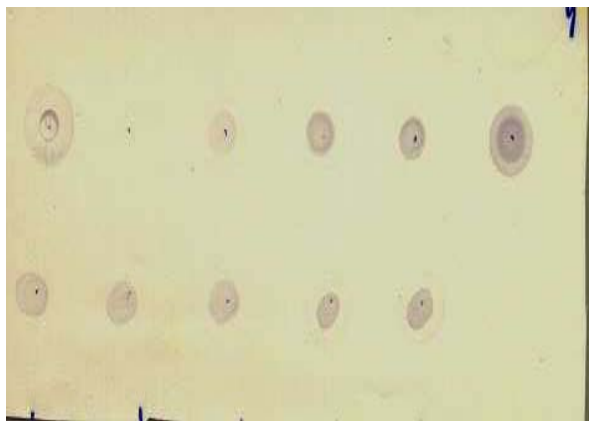


Figura 2. Dot Blot. Se aplicaron 25 µg de proteínas de cada preparación. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-LPS Ogawa (25 µg/mL) obtenido en el Instituto Finlay. 1: LPS Ogawa (5µg, control positivo), 2: LPS O139 (5µg, control negativo), 3: 15% DEO, 4:5% SDS, 5:10% SDS, 6:15% SDS, 7:5% Tritón X-100, 8: 10% Tritón X-100, 9:15% Tritón X-100, 10:15% Tween 20, 11:15% Tween 80.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos cuando se realizó el dot blot. Se observó reactividad del anticuerpo monoclonal anti-LPS Ogawa, con todas las preparaciones aplicadas, excepto con el LPS O139 (control negativo del ensayo). Se observó, además, que la reactividad fue mucho más intensa frente a la preparación obtenida con el SDS (15%).

La capacidad de las preparaciones obtenidas para desarrollar respuesta de anticuerpos anti-LPS O1 fue ensayada, utilizando el modelo de IN en ratones Balb/c. La Figura 3 muestra los resultados obtenidos, se observó que solamente la preparación obtenida con el SDS (15%), fue capaz de desarrollar respuesta de anticuerpos anti-LPS O1 con una sola dosis del inmunógeno. Esta respuesta se incrementó a niveles significativamente superiores al resto ($P < 0,05$), luego de administrar la 2da dosis. Con la administración de la 2da dosis, también se observó un incremento de la respuesta inducida por el resto de las preparaciones, aunque los niveles cuando se utilizaron DEO (15%), SDS (10%) y Tritón X -100 (5, 10 15%), fueron

significativamente inferiores ($P < 0,05$) a los observados con SDS (5%), Tween 20 (15%) y Tween 80 (15%), que mostraron niveles no significativamente diferentes entre sí ($P < 0,05$).

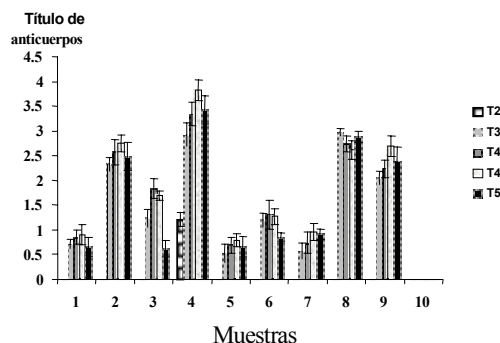


Figura 3. ELISA para la determinación de anticuerpos IgG anti LPS Ogawa. 1: 15% DEO, 2: 5% SDS, 3:10% SDS, 4: 15% SDS, 5: 5% Tritón X-100, 6: 10% Tritón X-100, 7: 15% Tritón X-100, 8: 15% Tween 20,9: 15% Tween 80, 10: PBS.

La Figura 4 muestra los resultados obtenidos en la determinación del título de anticuerpos vibriocidas. Se observó una elevada respuesta de anticuerpos vibriocidas en los sueros correspondientes a las preparaciones obtenidas con SDS (5%), SDS (15%) y Tween 80 (15%), entre los que no se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$). Se observó un nivel de respuesta significativamente menor ($P < 0,05$), en los sueros correspondientes a las preparaciones obtenidas con SDS (10%) y Tween 20 (15%) y no se observó respuesta de anticuerpos vibriocidas en ninguno de los sueros correspondientes al resto de las preparaciones en estudio.

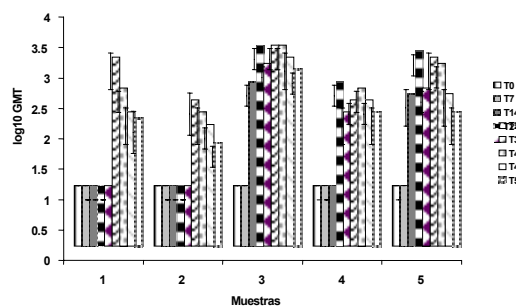


Figura 4: Actividad vibriocida de los sueros. 1:5% SDS, 2: 10% SDS, 3: 15% SDS, 4:15% Tween 20, 5:15% Tween 80.

Los sueros de ratones inoculados con PBS y con las preparaciones obtenidas utilizando DEO y Triton X-100, mostraron títulos de anticuerpos vibriocidas < 20 y no se muestran en la Figura.

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos, cuando la preparación que se obtuvo con el SDS al 15% fue aplicada en columna cromatográfica empaquetada con Sephacryl S-1000 y eluida con 30 mM Tris-2mM EDTA-0,5% de SDS pH 8,5. Se observaron dos picos cromatográficos totalmente resueltos. El V_e/V_t del pico 1 (P1) fue 0,34 y se le estimó un tamaño molecular de 150-200 nm, mientras que el V_e/V_t del pico 2 (P2) fue 0,69 y se estimó de 50-80 nm.

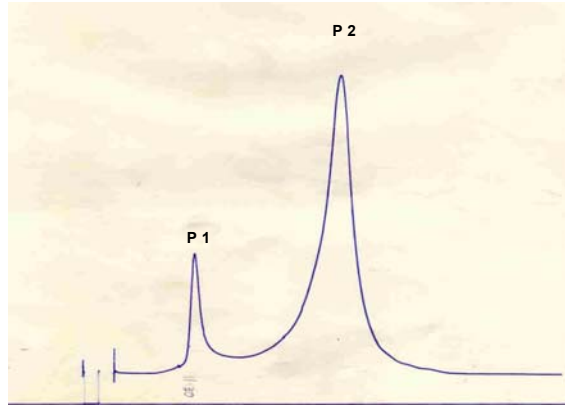


Figura 5. Cromatografía en columna XK16/100, empaquetada con sephacryl S 1000 y eluida con solución tampón 30 mM Tris - 2 mM EDTA - 0,5% de SDS ph 8,5. La elusión se realizó a 0,4mL/min. y fue registrada a 0,5 como máximo del rango de absorbancia. V_e/V_t P1: 0,34 (150-200 nm), V_e/V_t P2: 0,69 (50-80 nm).

Discusión

En este estudio, mediante el uso de diferentes detergentes (DEO, SDS, Tritón, Tween 20 y Tween 80), se han obtenido diferentes preparaciones antigénicas a partir de la superficie externa de la cepa salvaje C7258, *V. cholerae* O1, El Tor Ogawa, las cuales están constituidas fundamentalmente por PME y LPS de la pared celular. Cada una de estas preparaciones se evaluaron preliminarmente desde el punto de vista físico-químico y se ensayó la inmunogenicidad utilizando el modelo de la IN en ratones adultos, para determinar respuesta de anticuerpos IgG anti-LPS Ogawa y título de anticuerpos vibriocidas.

Los detergentes empleados en este estudio aparecen relacionados por la Boehringer-Mannheim, como ampliamente utilizados para solubilizar proteínas de membrana (21). En un estudio inicial, se evaluaron diferentes concentraciones de DEO, SDS, Tritón y Tween (20, 40, 60 y 80) y los mejores resultados en cuanto a extracción de proteínas se logró con: DEO (15%), Tween 20 (15%) y Tween 80 (15%), así como con SDS y Tritón X-100, preparados al 5, 10 y 15% (datos no presentados). Por tanto con estos detergentes, preparados a estos porcentajes, realizamos el estudio que ahora describimos en este trabajo.

Al analizar los diferentes perfiles electroforéticos (Figura 1), se observó que solo las preparaciones obtenidas con el SDS contenían una proteína con peso molecular próximo a los 40 kDa. Esta proteína, bien pudiera ser la *OmpU* (38 kDa), una PME descrita para

V. cholerae O1, que participa activamente en la patogenia del microorganismo (22) y por tanto de interés vacunal. Se ha demostrado, además, que *OmpU* media la adherencia a las células epiteliales humanas *in vitro* y que genera anticuerpos en voluntarios infectados experimentalmente con *V. cholerae* O1 (23). También se ha demostrado que *OmpU* fue fuertemente reconocida por el suero de voluntarios en fase convaleciente de una infección experimental con cepas virulentas de *V. cholerae*, lo que indica que es inmunogénica y producida *in vivo* (24). Por otra parte, en el análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos, se observó también una tendencia en las preparaciones resultantes del uso de Tritón X-100 y SDS, a que las diferencias en cuanto al tipo de proteínas constituyentes de cada preparación, estuviera marcada por el tipo de detergente utilizado y no por la concentración utilizada, al menos para el rango evaluado (5-15%). Esta es una observación que merece ser estudiada más profundamente, pues sería muy positivo para el escalado productivo de cualquiera de estas preparaciones, tener bien definido un rango de concentraciones del detergente, en el que los resultados que se obtengan no sean significativamente diferentes tanto desde el punto de vista de la composición de la preparación como de su respuesta inmune.

La estructura del LPS consta de tres regiones químicamente definidas: el lípido A, el núcleo oligosacárido y el antígeno O. El lípido A forma parte de la bicapa lipídica de la membrana externa, el núcleo se une al lípido A, a través de una molécula conocida como KDO (*keto-3-deoxy-d-manose-octulosónico acid*) (25). La determinación de KDO ha sido ampliamente utilizada para la cuantificación de LPS (26), pero este método no es aconsejable para la cuantificación del LPS de *V. cholerae*, porque para ello se requieren primero métodos de hidrólisis fuertes, que permitan exponer la molécula de KDO, muy interna en la estructura de este LPS (25). Por esta razón, se decidió estimar la cantidad de LPS en cada preparación, por determinación de las unidades endotóxicas utilizando el ensayo del *Limulus* (16) con 1 mg de LPS purificado (cuantificado por peso seco) como referencia para la estimación. Este ensayo ha sido previamente utilizado para la cuantificación del LPS de *V. cholerae* (27, 28).

Los detergentes utilizados en este estudio, difieren entre sí en cuanto a su estructura y composición química, lo que define el grado y tipo de interacción con las membranas celulares (21).

El DEO es un detergente iónico, ampliamente utilizado para el aislamiento y purificación de complejos de proteínas de membrana, tiene una elevada capacidad para dispersar agregados de proteínas, es considerado un detergente de moderada interacción con la membrana celular y no produce desnaturalización proteica (21).

El Tritón X-100, el Tween 20 y el Tween 80, se clasifican como detergentes no iónicos, que a diferencia de los iónicos, solubilizan proteínas de membrana más gentilmente, permitiéndoles retener su estructura de subunidades nativas y su actividad biológica, generalmente no rompen interacciones proteína-proteína y son ideales para aislar complejos funcionales compuestos de múltiples proteínas (21). En cambio, el SDS es un detergente iónico de muy elevada interacción con las membranas celulares, al punto de que es

capaz de producir la total disrupción de una membrana y la disociación de todos los componentes proteicos en sus subunidades monoméricas (29).

Las características estructurales diferenciales de estos detergentes y sus mecanismos de interacción con la membrana, pueden explicar la diversidad en cuanto a la composición de cada preparación antigénica en este estudio. El extracto PME-LPS obtenido cuando se utilizó el SDS al 15%, desarrolló los más elevados niveles de anticuerpos IgG anti-LPS Ogawa (3,821) y vibriocidas (3,307) en este estudio. Estos valores de respuesta inmune son comparables con los obtenidos en un reciente estudio de reto experimental en humanos inoculados con la cepa atenuada 638, *V. cholerae* O1, El Tor Ogawa (11). En este estudio, el logaritmo del GMT de anticuerpos vibriocidas, 14 días posteriores a la inmunización con la cepa vacunal fue 3,264. El estudio demostró que la cepa candidato vacunal, generó una respuesta inmune que neutralizó la excreción de la cepa de reto 3008 (cepa salvaje, *V. cholerae* O1, El Tor Ogawa) y protegió significativamente contra la infección.

Los resultados en la Tabla 1 muestran que el extracto PME-LPS obtenido con el SDS al 15%, presenta la menor relación PME: LPS (4,61:1), seguida por la preparación obtenida con el Tween 20 al 15% (5,72:1), Tween 80 al 15% (5,77: 1) y SDS al 5% (5,86:1), respectivamente, que son las preparaciones con las que se lograron los más altos niveles de inmunogenicidad en el estudio. En contraste, con el Tritón X-100 (5, 10 y 15%) y con el DEO al 15%, se obtuvieron las preparaciones con las más elevadas proporciones de PME: LPS (Tabla 1) y desarrollaron los más bajos niveles de respuesta en los ensayos de inmunogenicidad. No está claro, ni se ha reportado que exista una relación óptima entre las PME y el LPS en una preparación dada, de manera que desarrolle una eficiente respuesta inmune contra *V. cholerae*. De acuerdo con nuestros resultados, la preparación obtenida con el SDS al 15%, muestra la mejor relación entre estos antígenos, para lograr una efectiva respuesta contra cólera.

Diferentes estudios han demostrado que la respuesta inmune protectora contra cólera, es fundamentalmente antibacteriana y dirigida contra el LPS y algunas PME (30). La respuesta de anticuerpos vibriocidas, es el único tipo de respuesta inmune contra *V. cholerae*, que ha logrado ser correlacionada con la protección en humanos (30). Sin embargo, *V. cholerae* no atraviesa el epitelio intestinal durante la infección, por tanto el papel que juegan los anticuerpos vibriocidas del suero en la protección contra cólera en la superficie mucosal, no está claro aún. Una posibilidad es que la respuesta de anticuerpos vibriocidas correlacione con la respuesta IgA secretoria específica en la superficie intestinal ó con otro tipo de respuesta inmune mucosal que sea un mediador primario de la inmunidad protectora (30).

Los resultados que se muestran en la Figura 5, sugieren que el extracto obtenido con el SDS al 15% está compuesto por PME-LPS estructuradas en forma de vesículas de membrana externa (VME) de diversos tamaños moleculares, que pueden ser agrupadas en el rango de 150-200 nm (P1) y de 50-80 nm (P2), considerando como referencia los estudios realizados con el proteoliposoma de VA-

MENGO-C-BC[®]. Estas VME podrán ser consideradas proteoliposomas, una vez que avancemos en su caracterización y conozcamos si contienen fosfolípidos de membrana.

De acuerdo con nuestros resultados en este estudio, una preparación antigénica obtenida a partir de la superficie de *V. cholerae* O1, utilizando el SDS al 15%, puede ser utilizada para desarrollar elevados niveles de anticuerpos IgG anti-LPS y vibriocidas, por estimulación del sistema inmune mucosal.

Nos proponemos en lo adelante, profundizar en los estudios de caracterización de la preparación obtenida con el SDS al 15%, establecer las concentraciones de SDS próximas al 15% (rango de estabilidad), que nos puedan proporcionar resultados no significativamente diferentes a los obtenidos con 15%, con vistas a ir estudiando la factibilidad de un escalado productivo y finalmente nos proponemos estructurar esta preparación en forma de coqueatos, para poder evaluarla por vía oral en humanos como posible candidato a vacuna por subunidades contra el cólera.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a Gustavo Falero Díaz, por su gentileza en suministrarnos el anticuerpo monoclonal anti-LPS Ogawa (2B4G5) utilizado en estos estudios.

Referencias

1. Mintz ED, Tauxe RV and Levine MM. The global resurgence of cholera. In Noah N, and O'Mahony M. (ed), Communicable disease: epidemiology and control. John Wiley & Sons, Chichester, England. 1998:63-104.
2. Tacket CO, Cohen MB, Wasserman SS, Losonsky G, Livio S, Kotloff K, Edelman R, Kaper JB, Cryz SJ, Giannella RA, Schiff G, and Levine MM. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentered trial of the efficacy, of a single dose of live oral cholera vaccine CVD103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba three months after vaccination. Infect. Immun 1999; 67:6341-6345.
3. Sack D, Sack RB, Nair GB, Nair AK, and Siddique AK. Cholera. Lancet 2004; 363:223-233.
4. Levine MM and Kaper JB. Live oral cholera vaccine: from principle to product. Bull. Inst. Pasteur 1995;93:243-253.
5. Taylor DN, Killen KP, Hack DC, Kenner JR, Coster TS, Beatle DT, Ezzell J, Hyman T, Trofa AF, Sjogrem MH, Friedlander A, Mekalanos JJ, and Sadoff JC. Development of a live oral attenuated vaccine against El Tor cholera. J Infect Dis 1994;170:1518-1523.
6. Robert A, Silva A, Benitez JA, Rodriguez BL, Fando R, Campo J, Sengupta DK, Boesman-Finkelstein M and Finkelstein RA. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain disruption of its hemagglutinin / protease gen using a novel reporter enzyme: Clostridium thermocellum endoglucanase A. Vaccine 1996;14:1517-1522.
7. Burgos JM., Pérez JL, García L, Sierra G, Benitez JA, Galindo F, Silverstein C, and Ibarra C. Diarrheagenicity evaluation of attenuated *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains in the human intestine *ex vivo*. Vaccine 1999;17:949-956.
8. Valle E, Ledón T, Cedré B, Campos J, Valmaseda T, Rodríguez BL, García L, Marrero K, Benítez J, Rodríguez S and Fando R. Construction and Characterization of a Nonproliferative El Tor Cholera Vaccine

- Candidate Derived from Strain 638. *Infect. and Immun* 2000;68:6411-6418.
9. Benítez J, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, Pérez A, Campo J, Rodríguez BL, Pérez JL, Valmaseda T, Pérez O, Pérez A, Ramirez M, Ledón T, Diaz M, Lastre M, Bravo L and Sierra G. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX Φ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect Immun* 1999;67:539-545.
 10. Pérez JL, García L, Talavera A, Oliva R, Valmaseda T, Año G, Pérez O and Sierra G. Passive protection of serum from volunteers inoculated with attenuated strain 638 of *Vibrio cholerae* O1 in animal models. *Vaccine* 2000;19:376-384.
 11. García L, Diaz Jidy M, García H, Rodríguez BL, Fernández R, Año G, Cedré B, Valmaseda T, Suzarte E, Ramirez M, Pino Y, Campos J, Menéndez J, Varela R, González D, Pérez O, Serrano T, Lastre M, Miralles F, Del Campo J, Maestre JL, Pérez JL, Talavera A, Pérez A, Marrero K, Ledón T and Fando R. The Vaccine Candidate *V. cholerae* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. *Infection and Immunity* 2005;73 (5):3018-3024.
 12. Lucas ME, Deen JL, Von Seidlein L, Wang XY, Ampuero J, Puri M, Ali M, Ansaruzzaman M, Amos J, Macuamule A, Cavailler P, Guerin PJ, Mahoudeau C, Kahozi-Sangwa P, Chaignat CL, Barreto A, Songane FF, Clemens JD. Effectiveness of mass oral cholera vaccination in Beira, Mozambique. *N Engl J Med* 2005;352 (8):757-67.
 13. Jacob A, Sinha VB, Sahib MK, Srivastava R, Kaper JB, and Srivastava BS. Identification of a 33 kDa antigens associated with an adhesive and colonizing strain of *Vibrio cholerae* El Tor and its role in protection. *Vaccine* 1993;11:179-188.
 14. Hase CC, Thai LS, Boesman-Finkelstein M, Mar VL, Burnette WN, Kaslow HR, Stevens LA, Moss J, and Finkelstein RA. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains producing inactive cholera toxin analogs. *Infect. Immun* 1994; 62:3051-3055.
 15. Lowry OH, et al. A protein measurement with the folin - phenol reagent. *Biol. Chem* 1951;193:265-275.
 16. Cooper JF and Pearson SM. Detection of endotoxin in Biological products by the Limulus test. *Develop Biol Standard* 1977;34:7-13.
 17. Lamml NK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
 18. Sambrook J, Fritsch EF Maniatis T. *Molecular cloning*. En: A laboratory manual. 2nd ed.; 1999. Cap. 18. p.18- 47.
 19. Canadian Council on Animal Care. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa, Ont.: CCAC. Vol. 2. 1984.
 20. Benítez JA, Silva A, Rodríguez BL, Fando R, Campos J, Robert A, García H, García L, Pérez JL, Oliva R, Torres C and Ledón T. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. *Arch. Med. Res* 1996;27:275-283.
 21. Boehringer Mannheim. Detergents for membrane research. Biochemica. Germany.
 22. Lang HA, Palva ET. The *ompS* gene of *V. cholerae* encodes a growth-phase-dependent maltoporin. *Mol. Microbiol* 1993;10:891-901.
 23. Sperandio V, Giron JA, Silveira WD, Michalski J, Kaper JB. 1994. Characterization of the outer membrane protein *Omp U* of *Vibrio cholerae*. In Abstracts of the 94 th General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D C; 1994.
 24. Sperandio V, Giron JA, Silveira WD and Kaper JB. The *ompU* Outer Membrane Protein, a Potential Adherence Factor of *V. Cholerae*. *Infect. Immun* 1995;63:433-438.
 25. Brade H. Occurrence of 2-keto-deoxyoctanoic acid 5-phosphate in lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae* Ogawa and Inaba. *J Bacteriol* 1985;161:795-798.
 26. Karhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ and Carlo DJ. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram negative bacteria. *Anal. Biochem* 1978;85: 595-601.
 27. Gupta RK, Szu SC, Finkelstein RA and Robbins JB. Synthesis, characterization, and some immunological properties of conjugates composed of the detoxified lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba bound to cholera toxin. *Infect. Immun* 1992;60:3201-3208.
 28. Hochstein HD. Role of FDA in regulating the Limulus amoebocyte lysate test. In: Prior RB. editor. *Clinical applications of the Limulus amoebocyte lysate test*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press;1990:38-49.
 29. Arockiasamy A and Krishnaswamy S. Purification of integral outer-membrane protein *OmpC*, a surface antigen from *Salmonella typhi* for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein. *Analytical Biochemistry*. 2000;283:64-70.
 30. Saha D, LaRocque RC, Khan AI, Harris JB, Begum YA, Akramuzzaman SM, Abu S Faruque G, Ryan ET, Qadri F and Calderwood SB. Incomplete Correlation of Serum Vibriocidal Antibody Titer with Protection from *Vibrio cholerae* Infection in Urban Bangladesh *Journal of Infectious Diseases*. 2004;189:2318-22.

Obtaining *Vibrio cholerae* O1 outer membrane extracts with different detergents

Abstract

Two oral vaccine variants have been developed to prevent cholera infection: one from genetically attenuated strains, and the other one from inactivated whole cells. A subunit vaccine could be another very attractive alternative. In this report, we describe the partial purification and preliminary characterization of *V. cholerae* O1 Outer Membrane Protein-Lipopolysaccharide (OMP-LPS) complexes, to select a proteoliposome that could be administered orally in humans as a cochleate. Preparations were obtained using different detergents. The quantity of LPS was estimated by determination of endotoxic units using Limulus test (LAL). The composition of the samples was visualized by SDS-PAGE and dot blot assay. Balb/c mice were inoculated intranasally (IN) and the immune response was evaluated using ELISA and vibriocidal antibody titer assay. The molecular size of the preparation giving the best results for immunogenicity assays was estimated by chromatography on Sephacryl S-1000. Different electrophoretic profiles were obtained according to the type of detergent used. LPS was identified in all the preparations evaluated. The preparation obtained with 15% SDS showed the lowest OMP/LPS relation, the best results for the immunogenicity assay and a similar molecular size when compared to VA-MENGOC-BC[®] proteoliposome. These results are very stimulating and constitute a very important step for research to obtain a subunit vaccine as a preventive alternative against cholera.

Keywords: Cholera, vaccines, vibriocidal response, OMP-LPS complexes.