



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

ISSN: 1851-6114

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Martínez-Cabrera, Ileana; Padrón-Collazo, María de los Ángeles; Wheeler, Jun X; Pérez-Quiñoy, José Luís; García Imia, Luis; González, Yamisley; Acosta, Michel; Cabrera-Arias, Rubén Adonis; Año, Gemma; Cedré, Bárbara; Valmaseda, Tania; Aranguren, Yisabel; Alvarez, Maydelis; Serrano-Hernández, Daily; Milián, Ernesto; Fariñas, Mildrey; Talavera-Coronel, Arturo; García Sánchez, Hilda; Riverón-Martínez, Luis; Sierra González, Victoriano Gustavo; Jones, Christopher

Una vacuna de vesículas de membrana externa de *Vibrio cholerae* es aún una promesa: Caracterización proteómica

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 53, núm. 1, 2019, -Marzo, pp. 43-51

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53559114025>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Una vacuna de vesículas de membrana externa de *Vibrio cholerae* es aún una promesa: Caracterización proteómica*

- Ileana Martínez-Cabrera^{1,2a*}, María de los Ángeles Padrón-Collazo^{3a}, Jun X Wheeler^{4b}, José Luís Pérez-Quiñoy^{1a}, Luis García Imia^{5a}, Yamisley González^{3a}, Michel Acosta^{6a}, Rubén Adonis Cabrera-Arias^{7a}, Gemma Año^{4a}, Bárbara Cedré^{4a}, Tania Valmaseda^{7a}, Yisabel Aranguren^{8a}, Maydelis Alvarez^{9a}, Daily Serrano-Hernández^{9a}, Ernesto Milián^{9a}, Mildrey Fariñas^{10a}, Arturo Talavera-Coronel^{4a}, Hilda García Sánchez^{5a}, Luis Riverón-Martínez^{1a}, Victoriano Gustavo Sierra González^{11c}, Christopher Jones^{4b}

¹ Doctor/a en Ciencias Farmacéuticas.

² Doctora en Ciencias Médicas Básicas.

³ Máster en Ciencias.

⁴ Doctor/a en Ciencias.

⁵ Doctor/a en Ciencias de la Salud.

⁶ Ingeniero Informático.

⁷ Máster en Ciencias Bioquímicas.

⁸ Licenciada en Farmacia.

⁹ Técnico en Química.

¹⁰ Médico Veterinario.

¹¹ Doctor en Ciencias Médicas.

^a Instituto Finlay de Vacunas. Ave. 27, No 19805, La Lisa, La Habana, Cuba.

^b *National Institute for Biological Standards and Control del Reino Unido.*

^c BioCubaFarma. Grupo de las Industrias Biotecnológicas y Farmacéuticas de Cuba, La Habana, Cuba.

* Autor para correspondencia.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

Las epidemias de cólera afectan a un gran número de países africanos, asiáticos y del Caribe. Los cambios climatológicos y las constantes migraciones hacen que esta enfermedad se extienda, por lo que resulta necesario disponer de vacunas protectoras. En el presente trabajo se caracterizó una nueva vacuna de vesículas de membrana externa (VMEs) obtenidas de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor serotipo Ogawa cepa C7258, en el Instituto Finlay de vacunas (Cuba), a través de métodos proteómicos. Se identificaron 53 proteínas presentes en las VME (4 proteínas por banda electroforética) separadas por electroforesis unidimensional (1D) y digeridas con tripsina. Los fragmentos obtenidos fueron separados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masa, secuenciados e identificados mediante bases de datos de proteínas Swiss-Prot y TrEMBL. El patrón proteico obtenido presentó algunas de las proteínas (12 proteínas citoplasmáticas y 5 proteínas de membrana externa) sugeridas dentro del proteoma de buena calidad para candidatos vacunales. Se estudiaron las mejores condiciones para la separación de las proteínas a través de electroforesis bidimensional. Las VME evaluadas cuentan con una composición fundamentada en proteínas necesarias para garantizar una respuesta inmune que proteja contra *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor serotipo Ogawa.

Palabras clave: *Vibrio cholerae* * métodos proteómicos * vacunas * proteínas de membrana externa

Outer membrane vesicle vaccine from Vibrio cholerae is still a promise: Proteomic characterization

Abstract

Cholera epidemics affect a large number of African, Asian and Caribbean countries. The climate changes and the constant migrations cause this disease to spread, making it is necessary to obtain protective vaccines. In the present work, a new vaccine of outer membrane vesicles (OMV) from V.

cholerae O1 El Tor biotype Ogawa serotype strain C7258 at Finlay Institute of vaccines (Cuba) was characterized by proteomic methods. A total of 53 proteins present in the OMV (approximate ratio of 4 proteins by electrophoresis band) were identified, separated by one dimension electrophoresis and digested by trypsin method. The fragments were separated by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry, sequenced and identified, using Swiss-Prot and TrEMBL protein databases. The pattern showed some proteins (12 cytoplasmic proteins and 5 outer membrane proteins) suggested within the highest quality proteome for vaccine candidate. The best conditions for proteins separation by two dimension electrophoresis were studied. The OMV composition was based on proteins described to the immunity response and protection against *V. cholerae* O1 El Tor biotype Ogawa serotype.

Keywords: *Vibrio cholerae* * proteomics * vaccines * outer membrane proteins

Uma vacina de vesículas da membrana externa de *Vibrio cholerae* ainda é uma promessa: Caracterização proteômica

Resumo

As epidemias de cólera afetam um grande número de países africanos, asiáticos e caribenhos. As mudanças climáticas e as constantes migrações fazem com que esta doença se espalhe, portanto é necessário ter vacinas protectoras. No presente trabalho, uma nova vacina de vesículas de membrana externa (VMEs) obtidas de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor sorotipo Ogawa cepa C7258, no Instituto de Vacinas Finlay (Cuba), através de métodos proteômicos. Foram identificadas 53 proteínas presentes nas VME (4 proteínas por banda eletroforética) separadas por eletroforese unidimensional (1D) e digeridas com tripsina. Os fragmentos obtidos foram separados por cromatografia de alta resolução (HPLC) acoplada a espectrometria de massa, sequenciados e identificados usando bancos de dados de proteínas Swiss-Prot e TrEMBL. O padrão proteico obtido apresentou algumas das proteínas (12 proteínas citoplasmáticas e 5 proteínas de membrana externa) sugeridas dentro do proteoma de boa qualidade para candidatos vacinais. As melhores condições para a separação de proteínas através de eletroforese bidimensional foram estudadas. As VME avaliados possuem uma composição baseada em proteínas necessárias para garantir uma resposta imune que proteja contra *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor sorotipo Ogawa.

Palavras chave: *Vibrio cholerae* * métodos proteômicos * vacinas * proteínas da membrana externa

Introducción

La bacteria *Vibrio cholerae* serogrupo O1 es una de las causas fundamentales de las epidemias y pandemias de cólera y puede clasificarse como el biotipo Clásico o El Tor (1) (2). El cólera es una enfermedad aguda con una alta incidencia en África subsahariana desde hace más de 35 años. Esto junto con la aparición de nuevas cepas que provocan serias condiciones clínicas, el incremento de la resistencia a antibióticos y los cambios climáticos son algunas de las causas por las que esta enfermedad podría persistir indefinidamente (3). El hecho de que muchos de los genes presentes en el genoma de *V. cholerae* sean similares a los encontrados en *Escherichia coli* (4) resulta ser atractivo para el diseño de una nueva vacuna contra enfermedades entéricas. Algunos informes refieren que los mayores brotes de cólera han estado localizados en Asia y África pero, adicionalmente, existen altas incidencias en regiones del mar Caribe como Haití. Sin embargo, el mapa de distribución de la enfermedad podría extenderse si otros países no tomaran medidas como Cuba, que eliminó completamente el brote procedente de Haití.

Los impresionantes cambios climáticos contribuyen a la diseminación de la enfermedad (5) (6).

Tres vacunas de uso oral (obtenidas a partir de células enteras muertas) diseñadas para la protección contra el cólera han sido calificadas como seguras por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y se encuentran en uso: Dukoral, Shanchol y Euvichol. La evaluación de la vacuna Euvichol (EuBiologics, República de Corea) mostró resultados similares a los descriptos para Shanchol™, con un 65% de protección contra el cólera durante 5 años después de iniciada la vacunación en zonas endémicas (7).

La tecnología de vesículas de membrana externa (VME) es de gran interés para la obtención de una vacuna protectora contra esta enfermedad. Estas estructuras son una de las formas que tienen las bacterias para colonizar el intestino; de tal manera que a través de estos sistemas pueden transportarse las enzimas proteolíticas y de degradación de hidratos de carbono (además de moléculas de ADN, toxinas e inmunomoduladores) hacia la superficie de algunas bacterias que no son capaces de producirlas y son “prestadas” por otras. La acción de las

toxinas está asociada con algunos tipos de estas vesículas (8) y en el caso de *E. coli* y *V. cholerae*, estas toxinas se transportan de manera natural formando parte de VME (9). Las VME de *V. cholerae* obtenidas a partir de diferentes tecnologías han inducido inmunidad protectora en animales de experimentación (10-12) y por estas razones se continúa profundizando en esta metodología.

El objetivo de este trabajo fue la caracterización proteómica de una nueva vacuna de vesículas de membrana externa contra *V. cholerae* (*Vibrio cholerae*, O1 biotipo El Tor, serotipo Ogawa, cepa C7258), obtenida por Pérez *et al* (10) en el Instituto Finlay de vacunas (Cuba) a través de una plataforma proteómica (electroforesis unidimensional, digestión con tripsina acoplada a HPLC y espectrometría de masa para la identificación de las proteínas componentes, utilizando bases de datos internacionales) así como el estudio de las mejores condiciones para la utilización de la electroforesis bidimensional.

Materiales y Métodos

Preparación de las muestras en el Instituto Finlay

La metodología para la obtención de las VME, a partir de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor, serotipo Ogawa, cepa C7258 fue establecida a escala piloto por Pérez *et al* (10) en el Instituto Finlay de vacunas (Cuba). El proyecto para la obtención de una vacuna de VME contra el cólera fue aprobado por el Comité Ético y Científico del Instituto Finlay (2002), a partir de las normas GMP. La cepa fue cultivada en medio peptona-triptona, con agitación rotacional (200 rpm), a 37 °C, con pH controlado. El resto del procedimiento está descrito por Pérez *et al* (10), al que se incluyó sólo el tratamiento del sedimento con SDS al 15% (0,25 mL/g de célula) en un baño de hielo con agitación lenta, durante 1 h, en lugar del resto de los detergentes. A continuación, se realizó una centrifugación a 17.700 x g, a 4 °C, durante 30 min. Se incluyó el tratamiento de los sobrenadantes con DNasa – RNasa (0,1 mg/ 20 mL), a 37 °C, 1 h, los cuales se centrifugaron a 17.700 x g, a 4 °C. Posteriormente, los sobrenadantes se centrifugaron a 65.000 x g durante 8 h, a 4 °C. Las proteínas de membrana externa sedimentadas se resuspendieron en Tris 30 mM EDTA 2 mM pH 8,5 y se filtraron a través de los filtros Minisart-Plus 0,2 µm (Sartorius). El filtrado se precipitó con etanol (hasta un 80%) y el precipitado fue conservado a –20 °C hasta su caracterización.

Electroforesis en geles de poliacrilamida unidimensional (1D) con un sistema macro electroforético en el Instituto Nacional para Estándares Biológicos y Control (NIBSC, Reino Unido)

El procedimiento utilizado fue el mismo descrito por Padrón *et al* (13) para la separación de las proteínas de

las VME obtenidas de *Shigella sonnei* (cepa A04,) aplicadas en paralelo en el mismo gel, con la incubación de las muestras con el tampón de lisis (con diferentes detergentes), a 100 °C. Se aplicaron 3 lotes de VME y las bandas fueron reveladas con el sistema Coomassie, se escanearon en un densitómetro SI Scanner (Molecular Dynamics 375, Amersham-Pharmacia) y fueron cortadas para su posterior digestión e identificación de las proteínas componentes.

Digestión del gel, análisis por espectrometría de masa y búsqueda en bases de datos realizados en el NIBSC

Las bandas electroforéticas de las VME de *V. cholerae*, obtenidas por electroforesis 1D y teñidas con el sistema Coomassie fueron cortadas y digeridas con tripsina. Los fragmentos se separaron e identificaron por espectrometría de masa acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-EM), a través de la secuenciación peptídica y el análisis de la información acerca del proteoma completo de *V. cholerae* (bases de datos de proteínas Swiss-Prot y TrEMBL). Las secuencias de aminoácidos generadas y cotejadas en las bases de datos permitieron identificar el tipo de proteína de *V. cholerae*, sin necesidad de utilizar anticuerpos monoclonales específicos.

Electroforesis bidimensional en gel (2D), realizada en el NIBSC

La focalización isoelectrica (FI) se llevó a cabo utilizando tiras de poliacrilamida e inmobilinas y un sistema IPGphor II System (Amersham, EE.UU.), en similares condiciones a las descritas por Padrón *et al.* (13) para aplicación (tiras de 13 cm, 18 cm o 24 cm) y rehidratación con tampón de lisis (que contenía azul de bromofenol): 325, 450 o 600 µL, respectivamente. Las condiciones para la separación fueron: tiras de pH 3-11 NL: **a)** 13 cm de largo, aplicación en gel, 45 KVh; **b)** 13 cm, aplicación anódica en copa, 45 KVh; **c)** 24 cm, aplicación en gel, 60 KVh; **d)** 24 cm, aplicación en gel, 100 KVh. Las muestras (40 y 100 µg de proteínas) previamente tratadas con el tampón de lisis, según las condiciones propuestas por Padrón *et al* (13) se aplicaron de varias formas: directamente en tampón de lisis (variante en gel), con aplicación anódica con copa o aplicación catódica con copa. Las proteínas se revelaron con el sistema de tinción con plata.

Resultados

Proteínas componentes de las VME, separadas por SDS-PAGE unidimensional: identificación proteómica

Las condiciones para la identificación del contenido proteico de las VME obtenidas de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor, serotipo Ogawa (cepa C7258), se establecie-

ron a partir de su extracción con SDS, en paralelo a la caracterización de las VME de *Shigella sonnei* realizada por Padrón *et al* (13). El tratamiento con el mismo tampón de lisis [urea 7 M; tiourea 2 M; 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) al 2%; Tritón X-100 al 0,5%; glicerol al 15%; ditiotreitól (DTT) al 1%; Pharmalyte al 3-10 al 1% con inhibidor de proteasas] e incubación a 100 °C permitió detectar 13 bandas electroforéticas (Figura 1): 18,2; 21,6; 24,7; 26,5; 28,8; 35,2; 37,8; 42,3; 46,0; 50,3; 56,4; 58,6; 73,3 kDa, en los tres lotes de VME. Los tamaños moleculares de las bandas se determinaron utilizando patrones de referencia con una regresión: $\text{Log}_{10} \text{ MW vs Rf: } y = -0,1421x + 5,0839, r^2 = 0,9888$.

La identificación de las proteínas se realizó a partir de los fragmentos resultantes de la degradación proteica de las bandas con tripsina, separación de los mismos y su secuenciación. A partir de la información generada de la secuenciación de al menos dos fragmentos por proteína y su comparación con las bases de datos de proteínas Swiss-Prot y TrEMBL para el proteoma de *V. cholerae*, se identificaron 53 proteínas (con una relación aproximada de 4 proteínas localizadas por banda electroforética), según muestra la Tabla I.

Algunas de las proteínas presentes en las VME ca-

racterizadas en el presente estudio (Tu-A, Tu-B, OmpU, AhpC, OmpV, Catalasa/peroxidasa, proteína de la familia HesB, OmpK y flagelina B) fueron predichas por Heidelberg *et al* (4), en el estudio del genoma de *V. cholerae*. Posteriormente, fueron obtenidas en el proteoma determinado por Altindis y Mekalanos (9), como parte de los estudios de inducción de la virulencia en presencia de bicarbonato para el establecimiento de condiciones óptimas en la obtención de VME.

Evaluación de las condiciones para la separación bidimensional de las proteínas componentes de las VME

La electroforesis 2D es uno de los métodos de mayor resolución para la separación de las proteínas, dentro de la plataforma proteómica. Sin embargo, requiere una adecuada optimización para lograr la ausencia de fondos durante la separación proteica. En el presente trabajo se evaluaron diferentes condiciones en cuanto a cantidad de proteína en las muestras tratadas con tampón de lisis, tamaño de las tiras electroforéticas, modo de aplicación en las tiras y tiempo de focalización.

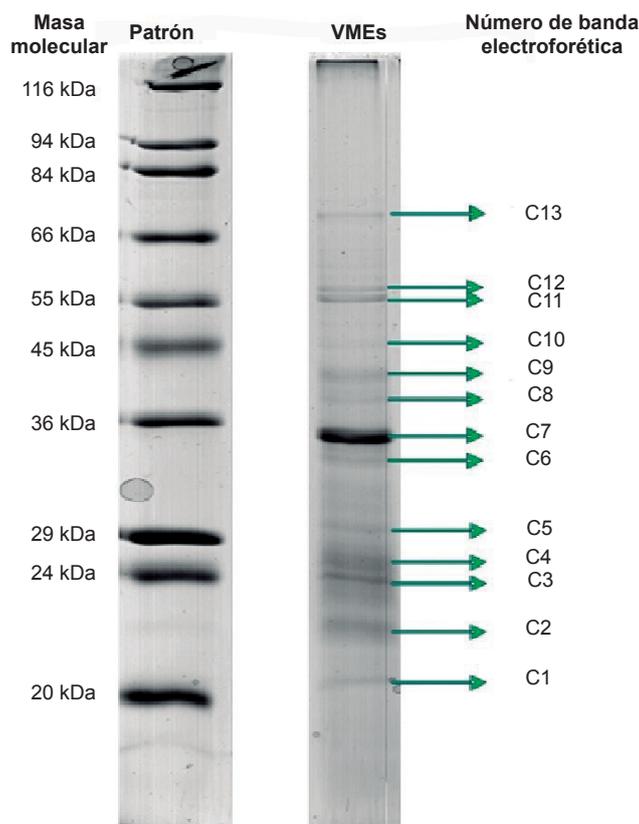


Figura 1. Separación de las proteínas presentes en las VME de *V. cholerae*, O1 biotipo El Tor, serotipo Ogawa, a través de electroforesis unidimensional SDS-PAGE (Gel 12%; 1,5 mm x 12 cm x 15,5 cm; 40 mA; 13 °C). Tinción con el sistema Coomassie.

Tabla 1. Identificación de las proteínas de las VME de *V. cholerae* a partir de su separación por electroforesis unidimensional, tratamiento enzimático de las bandas, separación y secuenciación de los fragmentos proteicos por HPLC-espectrometría de masa y la comparación de la información con bases de datos sobre el proteoma completo de *Vibrio cholerae* (bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL)

Banda	Nombre de la proteína	Número de acceso	Tamaño molecular kDa (1D-SDS-PAGE)	Banda	Nombre de la proteína	Número de acceso	Tamaño molecular kDa (1D-SDS-PAGE)
01	Factor de elongación Tu-A Factor de elongación Tu-B Proteína L6 de subunidad ribosomal 50S ADN polimerasa III, subunidades gamma y tau Proteína de quimiotaxis aceptora de metilo	Q9KV37 Q9KUZ6 Q9KNZ9 Q9KT51 Q9KN97	18,2	09	Maltoporina Proteína de membrana externa U	Q56652 P97085	46,0
02	Antioxidante, familia AhpC/Tsa Superóxido dismutasa, Fe Oxidorreductasa, familia deshidrogenasa de cadena corta/reductasa	Q9KTZ9 Q9KQF3 Q9KRP5	21,6	10	Proteína de membrana externa tolC Flagelina D Enolasa Flagelina C Proteína hipotética Probable exo desoxirribonucleasa-9 Deshidratasa del ácido Delta-aminolevulínico	Q9K2Y1 Q9KQ61 Q9KPC5 O34221 O68336 Q9KTK4 Q9KVN6	50,3
03	Proteína chaperonina 60 kDa- 1 Proteína de membrana externa (OmpV) Transportador de maltosa ABC, proteína periplasmática que une maltosa Catalasa/peroxidasa Fosforilasa purino nucleósido (DeoD) tipo 1 Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa Proteína hipotética VC0183 Uridina fosforilasa	Q9KNR7 P06111 Q9KLO5 Q9KRS6 Q9KPM0 Q9KQJ8 Q9KVG3 Q9KT71	24,7	11	Glucosa-6-fosfato isomerasa ADN- dirigida ARN polimerasa, cadena beta	Q9KUY4 Q9KV30	56,4
04	Proteína de membrana externa (OmpK) Probable lipoproteína de unión a D-metionina-MetQ Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa Proteína de unión a la penicilina 2	Q9KPR1 Q9KTJ7 Q9KQJ8 Q9KTF2	26,5	12	Transportador ABC, proteína de unión a oligopéptido periplasmático oppA	Q9KT14	58,6
05	Probable lipoproteína de unión a D-metionina- MetQ Factor de elongación Tu-A Aldehído deshidrogenasa Proteína S3 de la subunidad ribosomal 30S	Q9KTJ7 Q9KV37 Q9KR28 Q9KNZO	28,8	13	ADN polimerasa III, subunidades gamma y tau Proteasa de zinc, familia de insulina Arginina descarboxilasa biosintética AraC/XylS familia de reguladores transcripcionales	Q9KT51 Q9KRD3 Q9KLD1 Q9KQC0	73,3

Tabla I. (Continuación).

Banda	Nombre de la proteína	Número de acceso	Tamaño molecular kDa (1D-SDS-PAGE)	Banda	Nombre de la proteína	Número de acceso	Tamaño molecular kDa (1D-SDS-PAGE)
06	Putativa OmpA familia de porina de membrana externa Piridoxina 5'-fosfato sintasa Malato deshidrogenasa	O31154 Q9KPB5 Q9KUT3	35,2				
07	Proteína de membrana externa (OmpU) Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa Proteína de la familia HesB Defosfocoenzima A quinasa Fosfoenolpiruvato carboxilasa Transportador de amino ácidos ABC, proteína periplasmática de unión a aminoácidos	A5F934 Q9KQJ8 Q9KTY0 Q9KPE3 Q9KNT4 Q9KS97	37,8				
08	Proteína de membrana externa U Valina-ARNt sintetasa Proteína hipotética Sensor sensorial de la caja histidina quinasa	P97085 Q9KP73 Q9KLL5 Q9KMOV7	42,3				

La conservación de las muestras en el *buffer* de rehidratación evitó la influencia de posibles interacciones entre las proteínas de membrana externa con los lípidos de membrana, fenómeno descrito por Uli *et al* como un efecto *streaking* (cola, fondo o sombreado) en el método bidimensional para este tipo de proteínas. En la Figura 2 se muestran las mejores condiciones de separación proteica obtenidas en el presente trabajo, a través de la electroforesis 2D.

La utilización de tiras IPG 3-11 NL, 24 cm, aplicación en gel, con tiempo de focalización de 60 kWh, resultó ser la mejor combinación que garantiza una buena resolución de las proteínas. En esta variante se incrementó el tamaño de las tiras y se compararon los resultados cuando se aplicó en una tira de menor dimensión y aplicación catódica. La variante seleccionada (Figura 2B) permitió separar un mayor número de manchas (241 manchas); mientras que en la variante de

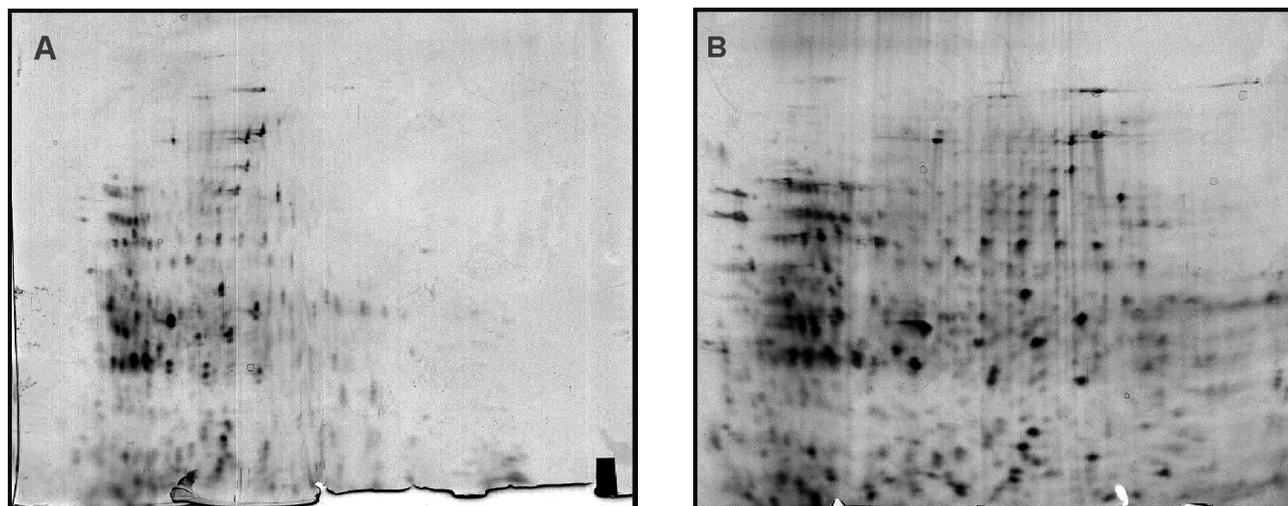


Figura 2. Electroforesis 2D de las VME de *V. cholerae* tratadas con tampón de lisis y detección a través del sistema de tinción con plata (Gel 12% de 1,5 mm x 12 cm x 15,5 cm), 40 mA, 13 °C.

A. IPG pH 3 – 11 NL, 13 cm, rehidratación con tampón de lisis que contiene bromofenol azul (325 µL), 40 µg de proteína, tiempo de focalización isoelectrica 45 kWh, aplicación anódica en copa. B. IPG pH 3 – 11 NL, 24 cm, rehidratación con tampón de lisis que contiene azul de bromofenol (600 µL), 100 µg de proteína, tiempo de focalización isoelectrica 60 kWh, aplicación en gel.

la Figura 2A se separaron 173 manchas. Ambas, incluso, constituyen variantes para una mejor separación de un mayor número de proteínas al ser comparadas con la separación unidimensional abordada en este trabajo (Tabla I; 53 proteínas). Probablemente esto se debió a la abundancia de proteínas ácidas, lo cual provocó que muchas de las manchas contuvieran múltiples proteínas que pudiesen afectar la resolución.

Estos resultados podrían avalar la futura aplicación de las condiciones propuestas para la separación proteica por electroforesis 2D, digestión con tripsina, separación e identificación de los fragmentos por espectrometría de masa para completar la identidad de un mayor número de proteínas y péptidos componentes de estas VME.

Discusión y Conclusiones

Las VME son sistemas de secreción naturales que utilizan las bacterias intestinales para colonizar la mucosa. Estas estructuras pueden contener moléculas solubles en su interior como: factores de virulencia, enzimas proteolíticas inestables, moléculas no proteicas (lipopolisacáridos), todos ellos protegidos por el entorno vesicular creado y como colofón, las proteínas de membrana externa que suelen ser porinas, otros transportadores de membrana externa bacteriana y receptores, los cuales pueden interactuar con los receptores de la superficie de las células de la mucosa intestinal (9). De esta manera, las proteínas tienen papeles críticos en la colonización del huésped, en la evasión de la respuesta inmune, el consumo de nutrientes y en el daño tisular (15).

En el presente trabajo se aprovecha la metodología utilizada para la caracterización proteómica de VME de *Shigella sonnei* propuesta por Padrón *et al* (13). De hecho, las muestras fueron evaluadas en paralelo con las evaluadas y descritas previamente por estos autores para las VME de *Shigella sonnei*, en similares condiciones en cuanto a: tratamiento de las muestras, separación electroforética, digestión de las bandas, separación de fragmentos proteicos, secuenciación y comparación de los fragmentos con el proteoma de *V. cholerae*.

Si se compara el patrón de las 53 proteínas extraídas en el presente trabajo con el listado de posibles proteínas que deben aparecer en el proteoma de VME de buena calidad según Altindis y Mekalanos (9), 12 de las proteínas citoplasmáticas coincidieron con las descritas (Tabla I: Factor de elongación Tu-A, proteína L6 de la subunidad ribosomal 50S, proteína de quimiotaxis aceptora de metilo, proteína chaperonina 60 kDa-1, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, uridina fosforilasa, proteína S3 de la subunidad ribosomal 30S, enolasa y glucosa-6-fosfato isomerasa), las cuales pueden considerarse importantes para las vías de regulación genética y metabólicas de la bacteria. Por otra parte, la presencia de 5 proteínas

de membrana externa (Tabla I: proteína de membrana externa OmpK, proteína de membrana externa OmpV, putativa OmpA familia de porina de membrana externa, proteína de membrana externa U, OmpU y maltoporina); también descritas por estos autores; están relacionadas con funciones importantes en la patogénesis bacteriana. El perfil proteico de las muestras analizadas mostró una primera banda multiproteica electroforética (Tabla I) compuesta por los factores Tu-A y Tu-B que están relacionados con la promoción de la unión del aminoacil ARNt (dependiente de GTP) al sitio A de los ribosomas, durante la biosíntesis de proteínas. Estos factores han sido identificados con la regulación de la virulencia y la homeostasis de la microbiota bacteriana en la piel (16). En la bacteria *V. cholerae*, el factor Tu es altamente sensible a la degradación oxidativa en ausencia de la proteína chaperona Hsp33, la cual protege a la bacteria específicamente contra las condiciones de estrés que pueden causar desnaturalización proteica (17).

La familia de proteínas AhpC/TSA estuvo representada en la segunda banda (Tabla I), la referida a proteínas homólogas codificadas en el genoma de *E. coli* e involucradas con la resistencia antioxidante y con similitudes con la acción de la enzima glutatión peroxidasa (18). La enzima superóxido dismutasa - Fe (Q9KQF3) comparte migración electroforética con la familia de proteínas AhpC/TSA. Esta enzima comparte también un sistema de regulación (a través de una molécula de ARN regulada negativamente por la presencia de hierro en el medio de crecimiento, llamado RyHB, que regula negativamente la expresión de la enzima superóxido dismutasa) con la expresión de proteínas de membrana externa conocidas como OmpT y OmpU. A su vez, este sistema está relacionado con la homeostasis del hierro en la bacteria y la formación de la biopelícula (19).

En 1998 una nueva proteína denominada 60 kDa presente en *Vibrio anguillarum* fue identificada con la 60 kDa de choque térmico presente en *Yersinia enterocolitica* y con la proteína identificada como GroEL presente en *Serratia rubidaea* (20). En el presente trabajo se identificó la proteína chaperonina 1- 60 kDa (Q9KNR7) en la banda 3 (Tabla I), referida como proteína 1- GroEL, la cual evita el plegamiento erróneo y promueve el replegamiento y el ensamblaje apropiado de los polipéptidos generados en condiciones de estrés (4).

Las muestras evaluadas proporcionaron una significativa representación de proteínas de membrana externa reguladas por hierro, como: OmpK, TolC, OmpU, OmpA, maltoporina; en especial, OmpU que está representada en la banda mayoritaria 7 (A5F934). Esta proteína de membrana externa está descrita para la cepa *V. cholerae* serotipo O1 (cepa ATCC 39541/Classical Ogawa 395/O395; pero también fue detectada en este trabajo en las bandas minoritarias C8 y C9 (P97085), descrita para la cepa ATCC 39315/El Tor Inaba N16961.

OmpU está relacionada con el mecanismo de resistencia a antibióticos *in vivo* y su expresión preferencial parece jugar un papel importante en la patogenicidad en el intestino al proporcionar una vía para la importación de nutrientes (21).

Por último, los resultados obtenidos demostraron la presencia de dos proteínas de la familia de las flagelinas (FlaC y FlaD). Aunque no fue posible detectar la presencia de la proteína FlaA (la mayor de las flagelinas de *V. cholerae* requerida para la síntesis flagelar y la movilidad) se detectaron en este trabajo otras subunidades multipoliméricas como FlaC y FlaD relacionadas con la inducción de IL-8 en las células epiteliales intestinales a través de la activación de NF- κ B y MAPKs (22). De ahí que Tarahomjoo (23) sugirió la utilización de estas flagelinas para el diseño de vacunas contra la infección y para la inmunoterapia contra el cáncer.

Por tanto, la presencia de todas estas proteínas en la vacuna evaluada a través de la metodología proteómica propuesta y utilizada en este trabajo y el papel conocido o estimado que representan estas proteínas en los mecanismos de virulencia, patogenicidad y regulación transcripcional de la bacteria son elementos indispensables en el diseño de un producto con garantías en su respuesta protectora en humanos.

Acevedo *et al* (24) utilizaron preparaciones de VME extraídas con la aplicación de la metodología propuesta por Pérez *et al* (10), las cuales han sido caracterizadas en este trabajo. La administración de estas VME formando parte de colectos (AFCo2/VME) por vía intranasal en ratones (dos o tres dosis) permitió la inducción significativa de IgA en saliva y en heces mientras que en suero se obtuvo una inducción similar de IgG y respuesta de actividad vibriocida. Acevedo *et al* (25), también aplicaron estas VME solas (con un tamaño de 156,9+22,2 nm determinado por microscopía electrónica y con la presencia de las proteínas OmpU y MSHA, entre otras) en ratones BALB/c, por vía intranasal y acompañadas por el polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. Los resultados demostraron un incremento de la respuesta de IgA al polisacárido Vi cuando está acompañado de las VME de *V. cholerae*, tanto en saliva como en heces así como una respuesta significativa de IgG en suero de ratones. Por tanto, se podría afirmar el uso favorable de las VME como adyuvantes naturales, incluso, para potenciar el efecto de antígenos polisacáridicos.

Es importante el hecho de que se continúe prestando atención al desarrollo y aplicación de vacunas a partir de células enteras muertas (inactivadas con formalina y tratadas con calor), de vacunas con células atenuadas; pero resulta prometedora la posibilidad de obtener una vacuna de componentes celulares que brinde una amplia protección, seguridad y que el balance costo-beneficio sea favorable, teniendo en cuenta que las poblaciones con mayor afectación son precisamente, las de países pobres.

Por tanto, la conclusión relevante de este trabajo es que la vacuna obtenida por Pérez *et al* (10), evaluada por Acevedo *et al* (24) (25) en modelos de ratones, cuenta con una composición fundamentada en proteínas que son necesarias para garantizar una respuesta inmune que proteja contra *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, serotipo Ogawa, cepa C7258 y actúe como adyuvante natural para la protección contra otras bacterias entéricas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la *Royal Society* (Reino Unido) por la financiación concedida en 2007 para el desarrollo de la evaluación de las muestras de VME de *Vibrio cholerae* en el *National Institute for Biological Standard and Control* (Reino Unido), lo cual permitió que se llevara a cabo parte de este proyecto.

Correspondencia

Dra. ILEANA MARTÍNEZ-CABRERA
Carrer Illes Pitiuses 15, 2, 5. PALMA DE MALLORCA
07007 Illes Balears. España
Correo electrónico: ileanamart@gmail.com

Referencias bibliográficas

1. Beyhan S, Tischler AD, Camilli A, Yildiz FH. Differences in gene expression between the classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun* 2006; 74: 3633–42.
2. Dziejman M, Balon E, Boyd D, Fraser CM, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: Genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1556–61.
3. García HM, Thompson R, Valera R, Fando R, Fumane J, Jani I, *et al.* A single dose of live-attenuated 638 *Vibrio cholerae* oral vaccine is safe and immunogenic in adult volunteers in Mozambique. *Vaccinmonitor* 2011; 20: 1-8.
4. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, *et al.* DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 2000; 406: 477-83.
5. European Centre for Diseases Prevention and Control, Stockholm. Outbreak of cholera in Cuba, potential risk for European travellers. 2012. 1st Update – 18 January 2013. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-outbreak-cholera-cuba-potential-risk-european-travellers> (Fecha de acceso: 2 de enero de 2013).
6. Farmer P, Almazor CP, Bahnser ET, Barry D, Bazile J, Bloom BR, *et al.* Meeting cholera's challenge to Haiti and the world: A joint statement on cholera prevention and care. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1145.
7. OMS (Organización Mundial de la Salud). Weekly epidemiological record. Cholera, 2015. World Health Organ-

- ization 2016; 91 (38): 433–440. ISSN 0049-8114. Disponible en: <http://www.who.int/wer>. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250142/1/WER9138.pdf?ua=1>
8. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 2005; 19: 2645-55.
 9. Altindis E, Fu Y, Mekalanos JJ. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: E1548-56.
 10. Pérez JL, Acevedo R, Callicó A, Fernández Y, Cedré B, Año G, *et al.* A proteoliposome based formulation administered by the nasal route produces vibriocidal antibodies against El Tor Ogawa *Vibrio cholerae* O1 in BALB/c mice. *Vaccine* 2009; 27 205–12.
 11. Bishop AL, Tarique AA, Patimalla B, Calderwood SB, Qadri F, Camilli A. Immunization of mice with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles protects against hyperinfectious challenge and blocks transmission. *J Infect Dis* 2012; 205: 412-21.
 12. Chatterjee D, Chaudhuri K. *Vibrio cholerae* O395 outer membrane vesicles modulate intestinal epithelial cells in a NOD1 protein-dependent manner and induce dendritic cell-mediated Th2/Th17 cell responses. *J Biol Chem* 2013; 288: 4299–309.
 13. Padrón-Collazo MA, Martínez-Cabrera I, Wheeler J, Nisar S, Riverón-Martínez LA, *et al.* Caracterización proteómica de vesículas de membrana externa extraídas de *Shigella sonnei*. *Vaccimonitor* 2017; 26: 70-80.
 14. Uli L, Castellanos-Serra L, Betancourt L, Domínguez F, Barberá R, Sotolongo F, *et al.* Outer membrane vesicles of the VA-MENGOC-BC vaccine against serogroup B of *Neisseria meningitidis*: Analysis of protein components by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2006; 6: 3389–99.
 15. Amano A, Takeuchi H, Furuta N. Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions. *Microbes Infect* 2010; 12: 791–8.
 16. N'Diaye A, Mijouin L, Hillion M, Díaz S, Konto-Ghiorghi Y, Percoco G, *et al.* Effect of substance P in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* virulence: implication for skin homeostasis. *Front Microbiol* 2016; 7: 506.
 17. Wholey WY, Jakob U. Hsp33 confers bleach resistance by protecting elongation factor Tu against oxidative degradation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 2012; 83: 981-91.
 18. Rychlewski L, Zhang B, Godzik A. Functional insights from structural predictions: Analysis of the *Escherichia coli* genome. *Protein Sci* 1999; 8: 614–24.
 19. Mey AR, Craig SA, Payne SM. Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of *ryhB* in biofilm formation. *Infect Immun* 2005; 73: 5706-19.
 20. Mutharia LM, Klinck J, Yamaguchi H, Davey M. Purification, characterization and immunochemical properties of a novel 60-kDa protein of *Vibrio anguillarum* strains. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 168: 111-7.
 21. Wibbenmeyer JA, Provenzano D, Landry CF, Klose KE, Delcour AH. *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT porins are differentially affected by bile. *Infect Immun* 2002; 70: 121-6.
 22. Harrison LM, Rallabhandi P, Michalski J, Zhou X, Steyert SR, Vogel SN, *et al.* *Vibrio cholerae* flagellins induce Toll-like receptor 5-mediated Interleukin-8 production through mitogen-activated protein kinase and NF- κ B activation. *Infect Immun* 2008; 76: 5524–34.
 23. Tarahomjoo S. Utilizing bacterial flagellins against infectious diseases and cancers. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2014; 105: 275-88.
 24. Acevedo R, Callicó A, del Campo J, González E, Cedré B, González L, *et al.* Intranasal administration of proteoliposome-derived cochleates from *Vibrio cholerae* O1 induce mucosal and systemic immune responses in mice. *Methods* 2009; 49: 309–15.
 25. Acevedo R, Callicó A, Aranguren Y, Zayas C, Valdés Y, Pérez O, *et al.* Immune adjuvant effect of *V. cholerae* O1 derived proteoliposome coadministered by intranasal route with Vi polysaccharide from *Salmonella typhi*. *BMC Immunol* 2013; 14(Suppl1):S10. Disponible en: <http://www.doi.org/10.1186/1471-2172/14/S1/S10> (Fecha de acceso: 25 de febrero de 2013).

Recibido: 11 de julio de 2018

Aceptado: 18 de enero de 2019