

# Influencia de adyuvantes en la capacidad de los anticuerpos anti-Tbps de bloquear la unión de transferrina, la asimilación de hierro y el crecimiento en *Neisseria meningitidis*

Carlos Ferreirós, Nuria Ferreiro y M.T. Criado

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. La Coruña. España.

**OBJETIVO.** Analizar el efecto de cinco adyuvantes en la capacidad de los sueros anti-TbpA/B para bloquear la asimilación de hierro en *Neisseria meningitidis*.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Se han ensayado 5 formulaciones de adyuvantes para obtener, en ratones, sueros específicos contra los complejos proteicos de unión de transferrina (TbpA/B) purificados de una cepa de *N. meningitidis* y analizar la influencia del adyuvante en la capacidad de los anticuerpos generados de bloquear la unión de transferrina y, en consecuencia, la asimilación de hierro y el crecimiento de los meningococos.

**RESULTADOS.** Todos los sueros fueron capaces de inhibir de manera significativa la unión de transferrina, la consiguiente asimilación de hierro y el crecimiento en la cepa homóloga, aunque se observó un claro incremento en los títulos de anticuerpos cuando se emplea RAS como adyuvante (1/3.125 frente a 1/125 con los otros adyuvantes). El efecto de estos sueros en una cepa heteróloga, con una TbpB de isotipo diferente al de la cepa inmunizante, fue casi nulo, lo que concuerda con la división descrita para el meningococo en 2 grupos en función de la TbpB que posean (isotipos I y II).

**CONCLUSIONES.** Contrariamente a lo ya demostrado para otra importante proteína meningocócica (FbpA), el uso de diferentes adyuvantes en la inmunización de ratones con los complejos TbpA/B no ofrece diferencias en la respuesta inmunitaria producida, excepto en lo relativo al título de anticuerpos.

**Palabras clave:** Adyuvantes. *Neisseria meningitidis*. Proteínas de unión a transferrina.

Influence of adjuvants on the ability of anti-Tbp antibodies to block transferrin binding, iron uptake and growth of *Neisseria meningitidis*

**OBJECTIVE.** To evaluate the effect of five adjuvants on the ability of specific anti-TbpA/B to block iron uptake in *Neisseria meningitidis*.

**MATERIAL AND METHODS.** Transferrin binding complexes (TbpA/B) purified from a TbpB isotype II *Neisseria meningitidis* strain were used to obtain sera with five different adjuvant formulations in mice in order to test the effect of the adjuvant on the ability of specific anti-TbpA/B antibodies to block transferrin binding, iron uptake and growth by meningococci.

**RESULTS.** Levels of anti-TbpA/B antibodies were relatively low (1:125 in most cases), the highest being obtained with the RAS adjuvant (1:3125). Despite the relatively low responses, all sera were able to significantly inhibit transferrin binding, iron uptake and growth in the homologous strain. Nevertheless, the effect on a strain with a TbpB isotype different from that of the immunizing strain was almost nil, a result in keeping with the described division of the meningococci into at least two TbpB groups (isotypes I and II).

**CONCLUSIONS.** In contrast to previous results for another important meningococcal protein, FbpA, the use of various adjuvants in the immunization of mice with TbpA/B complexes did not produce differences in the immune responses elicited, except in relation to antibody titers.

**Key words:** Adjuvants. *Neisseria meningitidis*. Transferrin-binding proteins.

## Introducción

Las actuales vacunas polisacáridicas antimeningocócicas utilizadas para controlar los serogrupos epidémicos A, C, W135 e Y ofrecen una protección de corta duración, restringida al serogrupo, y con una muy pobre respuesta en niños menores de 2 años. Por lo tanto, el logro de vacunas alternativas, efectivas contra todos los serogrupos y serotipos de *Neisseria meningitidis*, capaces de inducir una inmunidad a largo

Correspondencia: Prof. C. Ferreirós.  
Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Santiago de Compostela.  
15782 La Coruña. España.  
Correo electrónico: mpcfytc@usc.es

Manuscrito recibido el 22-01-2002; aceptado el 14-05-2002.

plazo y efectiva en todas las edades, especialmente en inferiores a 4 años, es actualmente un objetivo prioritario para la Organización Mundial de la Salud. Recientemente se ha ensayado una vacuna conjugada proteína-polisacárido frente al serogrupo C con muy buenos resultados<sup>1</sup>, y es probable que otras vacunas conjugadas estén disponibles en breve contra los serogrupos A, W135 e Y; sin embargo, no es predecible a corto plazo una vacuna conjugada efectiva contra el serogrupo B debido a la particular naturaleza de su cápsula polisacárida. Por ello, la búsqueda de moléculas alternativas, como proteínas expuestas o lipooligosacáridos, y de adyuvantes más eficaces, especialmente en lo que se refiere a la generación de respuestas de memoria, sigue centrando la atención de muchas investigaciones centradas en el diseño de vacunas contra el serogrupo B.

Las condiciones de cultivo *in vitro* que semejen el ambiente en el que crecen los meningococos durante la infección pueden ser fundamentales en la búsqueda de nuevos antígenos para incluir en estas futuras vacunas. El hierro, esencial para la actividad de muchas proteínas, es insoluble en condiciones fisiológicas y se encuentra en los fluidos extracelulares del organismo quelado por distintas proteínas secuestradoras de hierro, siendo las más relevantes la transferrina (Tf) y la lactoferrina (Lf). La primera de ellas es absolutamente esencial para los meningococos durante la etapa de invasión y proliferación en el organismo.

*N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* evolucionaron hacia la producción de receptores específicos para estas proteínas quelantes de hierro cuya síntesis se ve favorecida por las condiciones limitantes de hierro<sup>2-5</sup>. Los componentes de estos receptores, cuya función es esencial para el metabolismo del meningococo *in vivo* y para el crecimiento, están siendo considerados candidatos para ser incluidos en una futura vacuna. Los anticuerpos dirigidos contra el complejo receptor de Tf (*transferrin binding proteins A/B; TbpA/B*) son protectores, y su capacidad para bloquear la unión de transferrina y la consiguiente asimilación de hierro puede desempeñar un papel importante en esa protección<sup>6-8</sup>. Sin embargo, las respuestas inmunitarias anti-TbpA/B son hasta cierto punto deficientes, y es por lo tanto necesario buscar soluciones para mejorar esta respuesta. Ninguno de los adyuvantes de uso común posee todas las características deseables para considerarlo un adyuvante ideal y el mejor sería aquel capaz de desarrollar un efecto rápido y de larga duración, además de modular de manera selectiva tanto la respuesta humoral como la celular.

En este trabajo se analiza el efecto de 5 adyuvantes diferentes (que tienen una gran influencia en el tipo y efectividad de la respuesta inmunitaria inducida) en las características de los sueros anti-TbpA/B, sobre todo en lo que concierne al bloqueo de la unión de transferrina y la asimilación de hierro, y en el consiguiente efecto que pueda tener en el crecimiento meningocócico cuando la transferrina es la única fuente de hierro.

## Material y métodos

### Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

La cepa de *N. meningitidis* GLD (C:2aP1.5; TbpB isotipo II) fue donada por el Dr. Aldeen (Universidad de Nottingham, Reino Unido) y la cepa V002 (B:15; TbpB isotipo I) fue aislada en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico-Universitario de Santiago de Compostela. Las cepas se mantuvieron a -80 °C y se recuperaron para su uso por cultivo en placas con medio Choc-Iso (Biolife S.R.L., Italia) incubadas durante 24 h a 37 °C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos para los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente<sup>8</sup>, utilizando 2 ml de una suspensión bacteriana (crecida en medio Mueller-Hinton [MH] hasta una A<sub>549</sub> entre 1,6-1,8) para la inoculación de Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 100 ml de MH (con suficiencia de hierro) o MH con ácido etilendiaminodihidroxifenilacético 39 µM (MH-EDDA; en restricción de hierro). Los frascos se incubaron durante 14 h en un baño de agua a 37 °C con agitación constante de 100 rpm. Los experimentos de asimilación de hierro, se llevaron a cabo en el medio modificado de Morse y Barstein<sup>9</sup> y en medio desferrado como se describió anteriormente (mMBDM)<sup>10</sup> en lugar de MH-EDDA, utilizando un inóculo crecido en MH-EDDA durante 12 h. Después de un crecimiento durante 6 h en un baño a 37 °C con agitación constante de 100 rpm para eliminar el hierro intracelular, las bacterias se recogieron por centrifugación a 10.000 × g durante 10 min y se resuspendieron en medio mMBDM fresco hasta una densidad de 10<sup>10</sup> UFC/ml para la realización de los ensayos. La viabilidad se ensayó según se ha descrito previamente<sup>8</sup>.

### Inmunización y caracterización de los sueros

Todos los sueros usados en el estudio se obtuvieron y caracterizaron previamente<sup>11</sup>. Resumidamente, se inmunizaron intraperitonealmente ratones Balb/C con 10 µg de complejos de TbpA/B purificados en columnas de afinidad a transferrina suspendidos en 0,1 ml de adyuvante en los días 0, 15 y 30. En el caso del adyuvante de Freund, en las inyecciones de los días 15 y 30 se empleó adyuvante incompleto y en el caso del RAS se omitió el MPL y el TDM en esos mismos días. Los ratones fueron sangrados el día 37; los sueros se obtuvieron por centrifugación a 2.000 × g durante 10 min y se conservaron en alícuotas a -20 °C.

### Inhibición de la unión de transferrina

Los ensayos de unión de transferrina y su inhibición se llevaron a cabo siguiendo un método ya descrito<sup>12</sup> en el que el botón celular obtenido a partir de cultivos en MH-EDDA en fase exponencial de crecimiento, se lavó 2 veces y se resuspendió en TBS-Tween hasta una densidad de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Se mezclaron 100 µl de esta suspensión y el mismo volumen de las diluciones de antisuero en pocillos de placas de filtración Multi-Screen-HV (membranas de PVDF de 0,45 µm; Millipore, EE.UU.) previamente bloqueados con TBS-Tween. La mezcla se incubó toda la noche a 37 °C en cámara húmeda. El medio de la suspensión se extrajo por filtración y las células se lavaron 5 veces con TBS-Tween. Se añadieron entonces 100 µl de transferrina acoplada a peroxidasa (HRP-Tf; 125 µg/ml en TBS-Tween-seroalbúmina bovina) y se continuó la incubación durante 2 h a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con TBS-Tween, la transferrina unida a peroxidasa se visualizó con ácido 5-aminosalicílico, la reacción se detuvo con NaOH 0,3 M y se leyó la absorbancia de la fase líquida a 450 nm con un lector de placas de microtitulación.

### Bloqueo de la asimilación de hierro

La transferrina acoplada a <sup>55</sup>Fe<sub>2</sub> (<sup>55</sup>Fe-Tf) se preparó mezclando 0,0075 µmol de <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub> (1,5 µCi/µg de hierro; Amersham, Bucks, U.K.) y 0,075 µmol de citrato sódico por miligramo de apo-Tf, incubando dicha mezcla a temperatura ambiente durante 30 min y, finalmente, dializándola contra medio mMBDM durante 6 h<sup>13</sup>. La capacidad del suero anti-TbpA/B para bloquear la asimilación de hierro a partir de

la transferrina se ensayó siguiendo una modificación de la técnica descrita por Simonson et al<sup>14</sup>. Para ello, se incubaron alícuotas de 100  $\mu$ l de suero inmunitario inactivado por calor, diluido en medio desferrado mMBDM, con igual volumen de una suspensión bacteriana ( $10^9$  UFC) durante 60 min a 37 °C en tubos Eppendorf de polipropileno. Se añadieron entonces 100  $\mu$ l de  $^{55}\text{Fe}$ -Tf y esta mezcla se incubó de nuevo durante 60 min a temperatura ambiente. Las bacterias se lavaron 2 veces en medio desferrado mMBDM y se suspendieron finalmente en 200  $\mu$ l de agua destilada. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido, utilizándose controles con suero no inmune para calcular la reducción de la asimilación. La significación de las diferencias se calculó con el test de Student<sup>15</sup>.

### Ensayo de inhibición de crecimiento

Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo una técnica descrita previamente<sup>8</sup>. Las bacterias cultivadas durante 12 h en medio MH-EDDA se subcultivaron durante 6 h en medio mMBDM. Posteriormente, se depositaron alícuotas de 100  $\mu$ l del cultivo diluido hasta una DO de 0,05 a 540 nm en pocillos de placas de microtitulación (Nunc, Dinamarca) conteniendo bien 100  $\mu$ l de mMBDM con transferrina 30  $\mu\text{M}$  o bien mMBDM sin fuente de hierro. Se añadieron entonces a estos pocillos 100  $\mu$ l de los diferentes sueros inmunes en mMBDM (excepto en los controles) y las placas se incubaron durante 20 h a 37 °C en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. El crecimiento bacteriano se monitorizó con un lector de microplacas a 492 nm.

## Resultados

El bloqueo de la unión de transferrina se evaluó mediante ensayos de ELISA con células enteras vivas y HRP-Tf como marcador, mientras que la asimilación de

hierro y su bloqueo con sueros anti-TbpA/B se midió en ensayos en suspensión con bacterias vivas y empleando transferrina acoplada a  $^{55}\text{Fe}_2$  como única fuente de hierro y la inhibición del crecimiento se midió en cultivos realizados en medio líquido definido con transferrina como única fuente de hierro y en presencia de los distintos sueros. La figura 1 muestra el efecto de distintos sueros, obtenidos empleando los diferentes adyuvantes, en la unión de transferrina a la cepa homóloga (aquella a partir de la que se purificaron los complejos TbpA/B). Como puede observarse, todos los sueros bloquearon esta unión a un nivel similar (cercano al 80% de bloqueo a diluciones de los sueros de 1/5) sin que se hallan detectado diferencias significativas entre ellos. La comparación de estos datos con el efecto en la asimilación de hierro a partir de la transferrina y el bloqueo del crecimiento de la cepa cuando la transferrina es la única fuente de hierro se muestra en la figura 2A. Como puede verse, se producen bloqueos en estos últimos 2 parámetros que son estadísticamente significativos y que están altamente correlacionados entre sí, con la única excepción del suero obtenido utilizando como adyuvante QuilA, en el que se produce una inhibición prácticamente total de la asimilación de hierro sin que el bloqueo de unión de transferrina o la inhibición del crecimiento presenten diferencias significativas respecto a los sueros obtenidos con los otros adyuvantes.

La figura 2B muestra los resultados obtenidos para experimentos similares realizados utilizando la cepa *N. meningitidis* V002, heteróloga y perteneciente al otro isótipo de TbpB. Como puede observarse, en la mayoría de los casos, la inhibición de unión de transferrina no es significativa, excepto para el suero obtenido con el adyuvante de Freund = s, aunque incluso en este caso el límite de inhibición no se alcanza el 50%, nivel establecido para considerar que esta inhibición pueda ser efectiva. En consecuencia, y como puede también observarse, ni la asimilación de hierro ni el crecimiento de la cepa se ven afectados de manera significativa.

## Discusión

El principal obstáculo existente para lograr una protección efectiva contra la meningitis meningocócica radica en la ineficacia de las vacunas antimeningocócicas actuales contra los serogrupos A y C en niños menores de 2 años y en la carencia de vacunas efectivas contra el serogrupo B, todo ello consecuencia de que el antígeno empleado hasta la fecha ha sido exclusivamente el polisacárido capsular de estos microorganismos. Esta ineficacia obliga a la búsqueda de formulaciones alternativas de vacunas, como serían las vacunas conjugadas polisacárido-proteína contra el serogrupo C que ya están siendo utilizadas, o a la investigación de antígenos más eficaces (como pueden ser las proteínas de membrana externa) capaces de inducir buenas respuestas y de provocar mecanismos de memoria inmunológica en el huésped. De entre ellas, las proteínas del complejo de unión a transferrina, TbpA y TbpB son dos de las más atractivas por su implicación en la asimilación *in vivo* del hierro, necesario para el crecimiento y el asentamiento de la infección meningocócica en el organismo. Estas

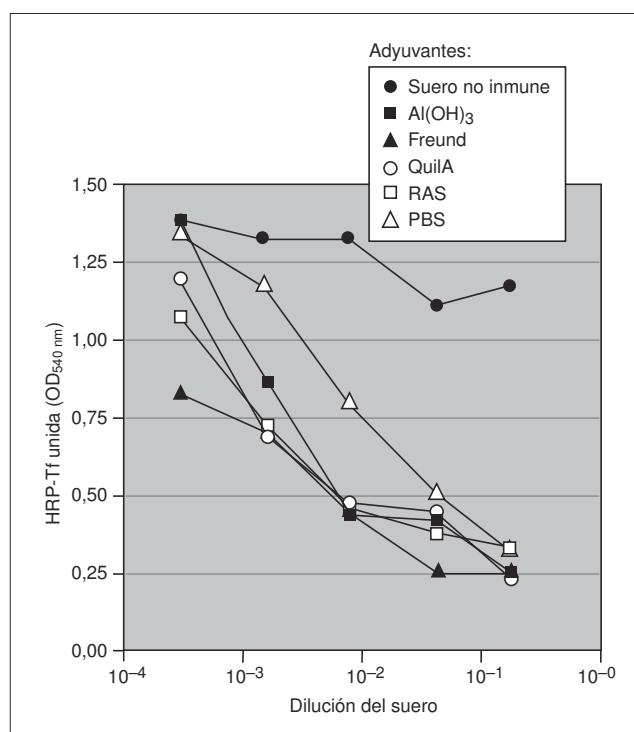


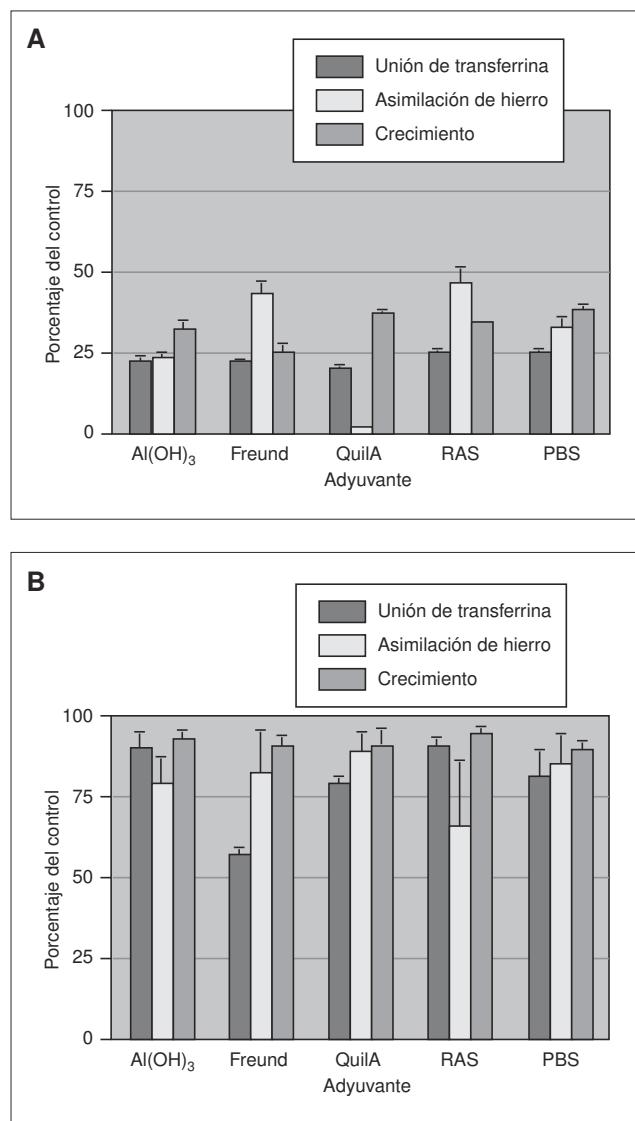
Figura 1. Inhibición de la unión de transferrina por sueros específicos obtenidos en ratón inmunizados con proteínas de unión a transferrina, obtenidas de la cepa *N. meningitidis* GLD usando diferentes adyuvantes.

proteínas son inmunógenas tanto en animales como en el hombre<sup>16,17</sup>. Además, los anticuerpos anti-TbpA/B son bactericidas y capaces de impedir la unión de transferrina y, por consiguiente, bloquean la asimilación de hierro y el crecimiento bacteriano de las cepas que tienen TbpB de isotipos similares al de la cepa usada para la inmunización<sup>8</sup>. Sin embargo, presentan algunas desventajas como la dificultad para detectar anticuerpos dirigidos contra la TbpA, la ya mencionada heterogeneidad antigenica y bioquímica de la TbpB<sup>18,19</sup> y la probable existencia de epitopos conformacionales en los complejos receptores de membrana externa (TbpA/B), como sugieren los datos de estudios previos realizados utilizando anticuerpos monoclonales<sup>8</sup>.

Los experimentos previos llevados a cabo para comparar la eficacia de los sueros anti-bpA/B obtenidos con complejos purificados o con vesículas de membrana externa, mostraron que las respuestas contra el complejo son mucho mayores en el último caso, lo que apoya la hipótesis de la existencia de importantes epitopos conformacionales contra los que los adyuvantes utilizados habitualmente (hidróxido de aluminio y Freund = s) no son capaces de inducir una buena respuesta<sup>8,16,19</sup>, y ésta es muy variable, sobre todo en la distribución de los isotipos de las inmunoglobulinas generadas y en su eficiencia, dependiendo de la especie del huésped empleada para la obtención de los sueros<sup>17,20</sup>.

A tenor de lo que hasta aquí expuesto, en este trabajo se ha analizado el efecto de otros adyuvantes que podrían inducir diferentes respuestas de anticuerpos contra las proteínas del complejo de unión de transferrina con el objetivo de averiguar si, al igual que ocurre con otros antígenos, puede variarse la respuesta con una selección adecuada del adyuvante. En este estudio se ha analizado el hidróxido de aluminio (ampliamente utilizado en vacunas para humanos), el adyuvante de Freund = s (que genera muy buenas respuestas de anticuerpos en ratones), la saponina Quil = A® (utilizada frecuentemente en vacunas veterinarias) y el sistema RAS (un nuevo adyuvante sintético con pocos efectos secundarios y un alto poder inmunogénico)<sup>21</sup>. Estudios previos sobre la antigenicidad de la proteína meningocócica de captación de hierro, FbpA, demostraron importantes diferencias en el suero obtenido con hidróxido de aluminio frente a los obtenidos con otros adyuvantes<sup>22</sup>. En contraste, cuando el antígeno ensayado es el complejo de unión de transferrina únicamente se encontraron diferencias relativas en los títulos de inmunoglobulinas y en los isotipos inducidos, pero sin que estas diferencias tengan incidencia en la actividad bactericida de los sueros<sup>11</sup>.

Los complejos TbpA/B utilizados para la inmunización de ratones con los diferentes adyuvantes se purificaron a partir de la cepa GLD utilizando técnicas de afinidad. Todos los sueros fueron altamente específicos, reaccionando con las moléculas de TbpA y TbpB en la cepa homóloga, pero sólo los anticuerpos anti-TbpA reaccionaron de forma cruzada con la cepa heteróloga V002. Los niveles de anticuerpos, determinados para la cepa homóloga se corresponden con títulos de 25 para PBS, 3.152 para RAS, y 125 para los demás adyuvantes. El isotipo de inmunoglobulinas predominantes fue IgG<sub>1</sub>, excepto para el RAS en el que fueron mayoritarias las IgM. Todos los sueros mostraron una fuerte actividad



**Figura 2A y B.** Comparación de la inhibición de unión a transferrina, asimilación de hierro y crecimiento por sueros específicos de ratón inmunizados con proteínas de unión a transferrina purificadas, obtenidas de la cepa *N. meningitidis* GLD, usando diferentes adyuvantes. La asimilación de hierro y el crecimiento se evaluaron usando transferrina cargada con hierro como única fuente de hierro: A) resultados para la cepa homóloga; B) resultados para una cepa heteróloga perteneciente a diferente isotipo de TbpB.

bactericida superior al 80%, a diluciones de 1/5 con la cepa homóloga GLD, pero fueron absolutamente ineficaces frente a la cepa V002<sup>11</sup>.

Nuestros resultados confirman que hay una correlación entre la capacidad de los meningococos para unir transferrina, asimilar hierro y crecer cuando ésta es la única fuente de hierro. Además, con independencia del adyuvante utilizado, el suero específico anticomplejo TbpA/B puede inhibir el crecimiento a través del bloqueo de la unión de transferrina y la concomitante asimilación de Fe. Por lo tanto, a pesar de los bajos títulos de anticuerpos anti-TbpA/B, la actividad bactericida se ve incrementada gracias a la inhibición del crecimiento, originando una mucho mayor eficiencia de la actividad

antimeningocócica. El principal problema encontrado es que ninguno de los adyuvantes probados puede romper la barrera impuesta por las diferencias en el isotipo de las TbpB de las diferentes cepas. Solamente aquellas pertenecientes al mismo isotipo de TbpB de la cepa inmunizante se ven afectadas por el suero, con un efecto casi nulo en las pertenecientes a otros isotipos, lo que obligaría a utilizar preparaciones de complejos TbpA/B obtenidos de cepas de ambos isotipos TbpB en el caso de que se decidiera incluir estas proteínas en una formulación vacunal.

En conclusión, y en contraste con lo demostrado para la FbpA meningocócica, en la que se observaron notables diferencias entre el suero obtenido con hidróxido de aluminio y los obtenidos con los restantes adyuvantes, todos los sueros obtenidos contra los complejos TbpA/B en este estudio mostraron resultados similares, excepto en lo relativo al título de anticuerpos. Todos los sueros fueron bactericidas y capaces de inhibir la unión de transferrina, la asimilación de hierro y el crecimiento.

#### Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por el Proyecto n.º 96/1146 del Fondo de Investigación Sanitaria. Agradecemos al Dr. J. A. Gómez su asistencia técnica en este trabajo.

#### Bibliografía

1. Ramsay ME, Andrews N, Kaczmarski EB, Miller E. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet* 2001;357:195-6.
2. Schryvers AB, Morris LJ. Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1988;56:1144-9.
3. Schryvers AB, Lee BC. Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family *Neisseriaceae*. *Can J Microbiol* 1989;35: 409-15.
4. Ferrón L, Ferreirós CM, Criado MT, Andrade MP. Purification of the *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein-2 (Tbp2) to homogeneity using column chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 1993;109:159-66.
5. Pettersson A, Klarenbeek V, Van Deurzen J, Poolman JT, Tommassen J. Molecular characterization of the structural gene for the lactoferrin receptor of the meningococcal strain H44/76. *Microb Pathog* 1994;17:395-408.
6. Lissolo L, Maitre-Wilmotte G, Dumas P, Mignon M, Danve B, Quentin-Millet MJ. Evaluation of transferrin-binding protein 2 within the transferrin-binding protein complex as a potential antigen for future meningococcal vaccines. *Infect Immun* 1995;63:884-90.
7. Pintor M, Ferrón L, Gómez JA, Gorringe A, Criado MT, Ferreiros CM. Blocking of iron uptake by monoclonal antibodies specific for the *Neisseria meningitidis* transferrin-binding protein 2. *J Med Microbiol* 1996a;45:252-7.
8. Pintor M, Ferrón L, Gómez JA, Powell NBL, Ala'Aldeen DAA, Borriello SP, et al. Blocking of iron uptake from transferrin by antibodies against the transferrin binding proteins in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* 1996;20:127-39.
9. Morse SA, Bartenstein L. Purine metabolism in *Neisseria gonorrhoeae*: the requirement for hypoxanthine. *Can J Microbiol* 1980;26:13-20.
10. Pintor M, Ferreiros CM, Criado MT. Characterization of the transferrin-iron uptake system in *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett* 1993;12: 150-66.
11. Gómez JA, Criado MT, Ferreiros CM. Bactericidal activity of antibodies elicited against the *Neisseria meningitidis* 37 kDa ferric binding protein (FbpA) with different adjuvants. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;20: 79-86.
12. Pintor M, Ferreirós CM, Criado MT. Energy-independent binding of iron complexed to small organic chelants by *Neisseria meningitidis*. *J Gen Appl Microbiol* 1994;40:23-4.
13. Pintor M, Ferreiros CM, Criado MT, Ferrón L. Expression levels of human transferrin receptors in *Neisseria* species. *J Microbiol Meth* 1992;15:321-6.
14. Simonson C, Brener D, DeVoe IW. Expression of a high-affinity mechanisms for acquisition of transferrin iron by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1982;36:159-66.
15. Sokal RR, Rohlf FJ. Single-classification analysis of variance. En: Sokal RR, Rohlf FJ, editors. *Biometry*, 3.ª ed. New York: WH Freeman and Company, 1995; p. 207-1.
16. Ala'Aldeen DAA, Borriello SP. The meningococcal transferrin-binding proteins 1 and 2 are both surface exposed and generate bactericidal antibodies capable of killing homologous and heterologous strains. *Vaccine* 1996;14: 49-53.
17. Ferrón L, Ferreirós CM, Criado MT, Pintor M. Reliability of laboratory models in the analysis of TbpB and other meningococcal antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994;9:299-306.
18. Rokbi B, Mazarin V, Maitre-Wilmotte G, Quentin-Millet MJ. Identification of two major families of transferrin receptors among *Neisseria meningitidis* strains based on antigenic and genomic features. *FEMS Microbiol Lett* 1993;110:51-8.
19. Ferrón L, Ferreirós CM, Criado MT, Pintor M. Immunogenicity and antigenic heterogeneity of a human transferrin-binding protein in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1992;60:2887-92.
20. Ala'Aldeen DAA, Stevenson P, Griffiths E, Gorringe AR, Irons LI, Robinson A, et al. Immune responses in humans and animals to meningococcal transferrin-binding proteins: Implications for vaccine design. *Infect Immun* 1994;62:2984-90.
21. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines current status, problems and future prospects. *Vaccine* 1995;13:1263-76.
22. Gómez JA, Hernandez E, Criado MT, Ferreiros CM. Effect of adjuvant in the isotypes and bactericidal activity of antibodies against the transferrin-binding proteins of *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 1998;16:1633-9.