

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología e Inmunología



DESARROLLO DE VACUNAS BASADAS EN
BACTERIAS LACTICAS: Expresión de Antígenos del VIH
en *Lactococcus lactis* para Inducir Inmunidad en Mucosas.

POR
Q.B.P. ITZA ELOISA LUNA CRUZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

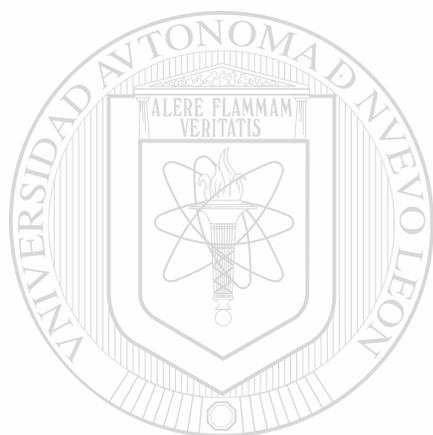
San Nicolás de los Garza, N. L.

Enero 2002

TM
RC607
.A26
L8
2002
c.1



1080124388



UANL

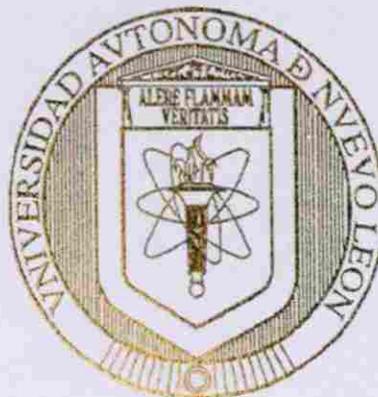
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología e Inmunología



**DESARROLLO DE VACUNAS BASADAS EN BACTERIAS LÁCTICAS:
Expresión de Antígenos del VIH en *Lactococcus lactis* para
Inducir Inmunidad en Mucosas.**

UANL

PRESENTADA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Q.B.P. ITZA ELOISA LUNA CRUZ ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

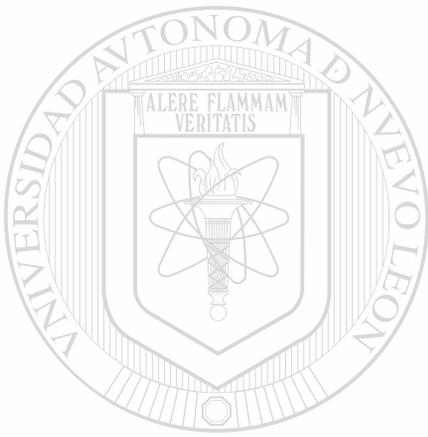
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA.**

San Nicolás de los Garza, N.L.

Enero del 2002



TM
RC607
•A26
L8
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología e Inmunología



COMISIÓN DE TESIS:



Director
Dra. Cristina Rodríguez Padilla



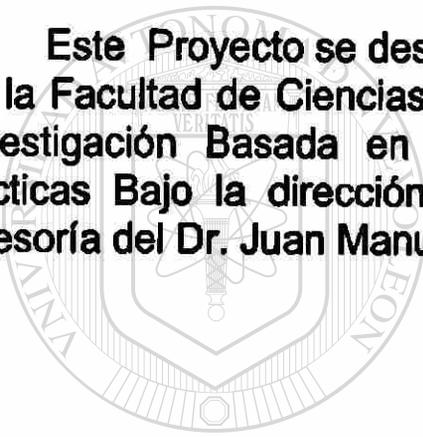
Secretario
Dr. Juan Manuel Alcocer González



Vocal
Dr. Roberto Montes de Oca

LUGAR DE TRABAJO

Este Proyecto se desarrollo en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y Pertenece a la Línea de Investigación Basada en la producción de Vacunas utilizando Bacterias Lácticas Bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y con la Asesoría del Dr. Juan Manuel Alcocer González.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A el Dr. Reyes Tamez Guerra y la Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Agradezco por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, en el laboratorio de Inmunología y virología, y por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A el Dr. Juan Manuel Alcocer González

Gracias por su valioso apoyo, tiempo dedicado a este trabajo, por ser un buen asesor del cual he aprendido mucho y finalmente por la amistad brindada

A la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Gracias por el apoyo y amistad brindados incondicionalmente durante todo este tiempo

A el Dr. Roberto Montes de Oca

Gracias por su apoyo.

Agradezco igualmente a mis amigos y compañeros de laboratorio, por su apoyo y amistad brindada durante la realización de este trabajo: **Rosa Nelly González, Martha Garza, Alberto Valadez, Irma Martínez, Laura Hernández, Angel Ruvalcaba, Sigifredo Lazcano, Gerardo Alfano**, y a todos los que colaboran en el laboratorio de inmunología y virología.

Agradezco profundamente a mis grandes amigas **Cristina Roa, Mónica Guajardo y Gaby Cantú, Raúl Flores, Elda García, Elva Arechiga** así como a mi gran amiga **Verónica Ortega**, por creer en mi, por los momentos buenos y malos que superamos juntas, por enseñarme a ver la vida de otra manera y finalmente agradezco a **Ernesto Sandoval** por su apoyo, gran paciencia, dedicación, cariño y pequeños detalles que continuamente me brindo durante este tiempo, gracias por ser como son, nunca los olvidaré.

DEDICATORIA

A TI SEÑOR

Por ser la Luz, que me da Fe y Esperanza.

A MIS PADRES

*Sr. Pedro Luna Cabriales
Sra. Fausta Cruz de Luna*

Gracias por brindarme la oportunidad de obtener una profesión, por el apoyo y ejemplo que me dieron, por que nunca escatimaron en esfuerzos. Gracias por darme la libertad de tomar mis propias decisiones.

A MIS HERMANOS:

*Claudia Y. Luna Cruz
Pedro I. Luna Cruz
Alan Axel Luna Cruz*

Motivo de mi superación

INDICE GENERAL

PORTADA	I
COMISION DE TESIS	II
LUGAR DE TRABAJO	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
INDICE GENERAL	VI
INDICE DE FIGURAS	XI
INDICE DE TABLAS	XIII
ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	1
CAPITULO 1	
INTRODUCCION	
1.1 Aspectos Generales del VIH	5
1.2 Distribución Geográfica del VIH	8
1.3 Organización Genómica del VIH	9
1.3.1 Proteínas estructurales principales (gag,env)	9
1.3.2 Proteínas regulatorias (tat y rev)	10
1.3.3 Proteínas accesorias (vpu, vpr, vif y nef)	10
1.4 Ciclo de Replicación del VIH	12
1.5 Características de la gp120 del VIH	14
1.6 Papel de la gp120 en Patogénesis	21
1.7 Principales Antígenos del VIH	
1.7.1 Glicoproteínas de envoltura del virion	22
1.7.2 Proteínas internas del virion	22

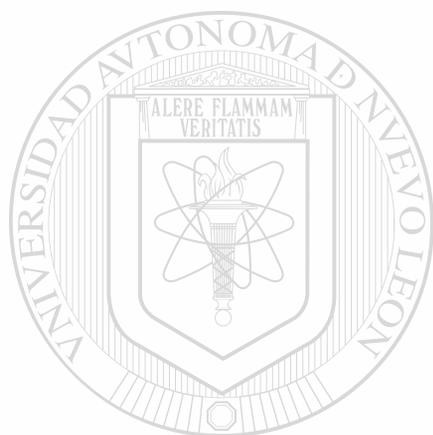
1.8 Respuesta Inmune Contra el VIH	22	
1.8.1 Respuesta inmune humoral	23	
1.8.2 Respuesta inmune celular	23	
1.9 Vacunas contra el VIH	23	
1.9.1 Vacunas de proteínas y subunidades peptídicas	24	
1.9.2 Vacunas de virus vivos atenuados	25	
1.9.3 Partículas o vacunas completas inactivadas	25	
1.9.4 Vacunas de vectores vivos recombinantes	26	
1.9.5 Vacunas de ADN	27	
CAPITULO 2		
2.1 Inmunidad en las Mucosas	30	
2.1.1 La mucosa como primer defensa	31	
2.1.2 Respuesta inmune humoral	31	
2.1.3 Respuesta inmune celular	32	
2.2 Interacciones de las Bacterias con el Epitelio Gastrointestinal	35	
2.3 El Papel de la Mucosa del Tracto Gastrointestinal en la Transmisión del VIH	36	
CAPITULO 3		
3.1 Uso de Bacterias como Vehículos para Vacunas	38	
3.1.1 Patógenos atenuados	39	
3.1.2 Bacterias comensales	44	
3.1.3 Bacterias ácido lácticas	45	
CAPITULO 4		
4.1 Expresión de Proteínas Heterólogas en Bacterias Lácticas	49	
CAPITULO 5	IMPORTANCIA	52
CAPITULO 6	HIPOTESIS	53
	OBJETIVOS	53

CAPITULO 7 MATERIAL Y METODO

7.1 Construcción del Plasmido Recombinante p59gp120	
7.1.1 Diseño de oligonucleotidos	54
7.1.2 Amplificación del gen de la proteína gp 120	54
7.1.3 Clonación en el vector p GEM-T	55
7.1.4 Subclonación del gen de la gp 120 en el vector PIL252:P59:emm6 (pVE5508).	56
7.2 Transformación de <i>Lactococcus lactis</i>	
7.2.1 Preparación de las células competentes de <i>L.Lactis</i>.	56
7.2.2 Transformación de <i>L. lactis</i> por electroporación.	56
7.3 Detección de la Expresión de la Proteína gp120 del VIH en <i>L.lactis</i> por Western Blot	57
7.4 Detección de la Expresión en la Superficie Externa de la Proteína gp120 del VIH en <i>L.lactis</i>.	
7.4.1 Análisis de whole- cell ELISA	58
7.4.2 Análisis por inmunofluorescencia	58
7.5 Grupos Experimentales	58
7.6 Obtención de Muestras	59
7.6.1 Heces	59
7.6.2 Suero	59
7.6.3 Lavado de mucosa intestinal y estomacal	59
7.6.4 Bazo	59
7.6.5 Histología	60
7.7 Inducción de Inmunidad Humoral y Celular en Mucosas Contra el VIH con la Administración Oral de <i>L. lactis</i> Recombinante.	
7.7.1 Medición de anticuerpos IgG e IgA en lavado estomacal, intestinal heces y suero contra gp 120 por ELISA	
7.7.1.1 Medición de anticuerpos por un kit comercial (Vironostika)	60
7.7.1.2 Medición de anticuerpos IgG e IgA por whole-cell ELISA	60
7.7.2 Obtención del antígeno VIH-1	

7.7.2.1 Purificación del antígeno VIH-1	61
7.7.2.2 Detección del antígeno VIH-1 por western blot	61
7.7.3 Evaluación de la respuesta inmune celular	
7.7.3.1 Análisis de proliferación celular en linfocitos de bazo	61
7.8 Análisis Histológico de los Epitelios en Estomago e Intestino Delgado	62
7.9 Detección de la Expresión de CD4 y Mac en la Mucosa del Estómago e intestino Delgado por Inmunohistoquímica	62
CAPITULO 8 RESULTADOS	
8.1 Construcción del Plasmido Recombinante	63
8.1.1 Amplificación del gen de la proteína gp 120 del VIH	63
8.1.2 Clonación del gen de la gp120 del VIH	66
8.2 Subclonación del gen de la gp 120 del VIH en el Vector de Expresión de <i>L.lactis</i> .	68
8.3 Detección de la Expresión de la Proteína gp120 del VIH en <i>L.lactis</i> por western blot	70
8.4 Detección de la Expresión en la Superficie Externa de la Proteína gp120 del VIH en <i>L.lactis</i> .	
8.4.1 Análisis de whole- cell ELISA	72
8.4.2 Análisis de inmunofluorescencia	76
8.5 Inducción de Inmunidad Humoral y Celular en Mucosas Contra VIH con la Administración Oral de <i>L. lactis</i> Recombinante.	79
8.5.1 Medición de anticuerpos IgG e IgA en lavado estomacal, intestinal heces y suero contra gp 120 por ELISA	
8.5.1.1 Anticuerpos en lavado estomacal	79
8.5.1.2 Anticuerpos en lavado intestinal	82
8.5.1.3 Anticuerpos en heces	85
8.5.1.4 Anticuerpos en suero	88
8.5.2 Obtención del antígeno VIH-1	
8.5.2.1 Detección del antígeno VIH-1 por western blot	91
8.5.3 Evaluación de la respuesta inmune celular	

8.5.3.1	Análisis de proliferación celular en linfocitos de bazo	92
8.5.4	Análisis histológico de los epitelios en estomago e intestino delgado	97
8.5.5	Detección de la expresión de CD4 y Mac en la mucosa del estomago e intestino por inmunohistoquímica	100
CAPITULO 9	DISCUSIONES	105
CAPITULO 10	CONCLUSIONES	111
CAPITULO 11	PERSPECTIVAS	112
CAPITULO 12	BIBLIOGRAFIA	113



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS

1. Estructura del VIH	7
2. Distribución Geografica del VIH	9
3. Organización Genómica del VIH	11
4. Ciclo de Replicación del VIH	13
5. Glicoproteínas de la Envoltura del VIH	14
6. Asociación e Interacción de al gp120/gp41 con CD4	16
7. Núcleo de la gp120	17
8. Residuos de Asparagina	18
9. Sistema Inmune en Mucosas	34
10. Tropismo Intracelular de Vectores Bacterianos	43
11. Sistemas de Expresión de Proteínas en Bacterias Lácticas	46
12. Estructura de la Proteína de Anclaje M6	51
13. Proceso de Translación y Anclaje a la Superficie de la proteína M	51
14. Caracterización del gen de la gp 120 en el Plasmido pSFV-1	64
15. Gradiente de Temperaturas para la Amplificación por PCR del gen de la Proteína gp 120 a partir del ADN del Plasmido pSFV-1.	65
16. Clonación de la gp120 en el Vector pGEM-T.	67
17. Purificación del Plasmido pGEMTgp120 por Maxi-Prep.	67
18. Caracterización del Plasmido pGEMTgp120	68
19. Detección de la gp120 en Transformantes de <i>Lactococcus lactis</i> por PCR en Colonia	69
20. Detección de la Expresión de la Proteína gp120 del VIH en <i>L. lactis</i> por Western Blot	71
21. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en <i>L. lactis</i> por Wole-Cell ELISA	73
22. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en <i>L. lactis</i> por Wole-Cell ELISA	74
23. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH	

en <i>L. lactis</i> por Wole-Cell ELISA	75
24. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en <i>L. lactis</i> por Inmunofluorescencia	77
25. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en <i>L. lactis</i> por Inmunofluorescencia	78
26. Niveles de Anticuerpos en Lavado Estomacal con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis	80
27. Niveles de Anticuerpos en Lavado Estomacal con 10^9 Bacterias en Tres Dosis	81
28. Niveles de Anticuerpos en Lavado Intestinal con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis	83
29. Niveles de Anticuerpos en Lavado Intestinal con 10^9 Bacterias en Tres Dosis	84
30. Niveles de Anticuerpos en Heces con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis	86
31. Niveles de Anticuerpos en Heces con 10^9 Bacterias en Tres Dosis	87
32. Niveles de Anticuerpos en Suero con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis	89
33. Niveles de Anticuerpos en Suero con 10^9 Bacterias en Tres Dosis	90
34. Detección del antígeno VIH-1	91
35. Ensayo de Proliferación de Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 10 días Después de la Inmunización con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis	93
36. Ensayo de Proliferación con Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 18 días Después de la Inmunización con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis	94
37. Ensayo de Proliferación con Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 24 días Después de la Inmunización con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis	95
38. Ensayo de Proliferación con Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 7 días Después de la Inmunización con 10^9 Bacterias en tres Dosis	96
39. Cortes Histológicos de la Mucosa del Estómago teñidos con	

Hematoxilina y Eosina	98
40. Cortes Histológicos de la mucosa del Intestino Delgado teñidos con Hematoxilina y Eosina	99
41. Detección de la expresión de CD4 por Inmunohistoquímica en la Mucosa del Estómago	101
42. Detección de la expresión de CD4 por Inmunohistoquímica en la Mucosa Intestinal	102
43. Detección de la expresión de Mac por Inmunohistoquímica en la Mucosa del Estómago	103
44. Detección de la expresión de Mac por Inmunohistoquímica en la Mucosa Intestinal	104

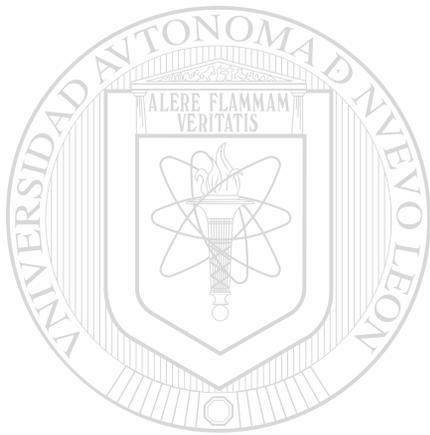
INDICE DE TABLAS

1.- Distribución Geográfica del VIH	8
2.- Epítopes Conservados para la Neutralización de Anticuerpos en el Núcleo de la gp120.	19
3.- Candidatos a Vacunas para VIH que están en Evaluación	29
4.- Proteínas Heterólogas Expresadas en Bacterias Lácticas para Vacunas	48
5.- Reacción de Amplificación del gen de la gp 120 por PCR	54
6.- Condiciones para la Amplificación del gen de la gp 120 por PCR	55

ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ADE	Anticuerpos Dependientes de Anticuerpos
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CCR	Receptor de Quimiocinas
Co A	Concanavalin A
CTL	Linfocito T citotóxico
DAP	Diaminopimelico
ECM	Proteínas Extracelulares de Matriz
ELISA	Análisis Inmuno Absorbente Ligado a Enzima
EPEC	<i>E.coli</i> Enteropatógena
FHA	Filamentos de Adhesión
GALT	Tejido Linfoides Asociados a Intestino
IEL	Linfocitos Intraepiteliales
IL-	Interleucina
INF- γ	Interferon gamma
KD	Kilodaltons
LP	Lámina Propia
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PP	Placas de Peyer
RRE	Elemento de Respuesta a rev
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
SIgA	Inmunoglobulina A Secretoria

TAR	Elemento de Respuesta a Transcripción
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante beta
TLPs	Receptores Parecidos a Toll
TR	Transcriptasa Reversa
VLP	Partículas Pseudovirales
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VIS	Virus de la Inmunodeficiencia del Simio



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DESARROLLO DE VACUNAS BASADAS EN BACTERIAS LÁCTICAS :

Expresión de Antígenos del VIH en *Lactococcus lactis* para Inducir Inmunidad en Mucosas.

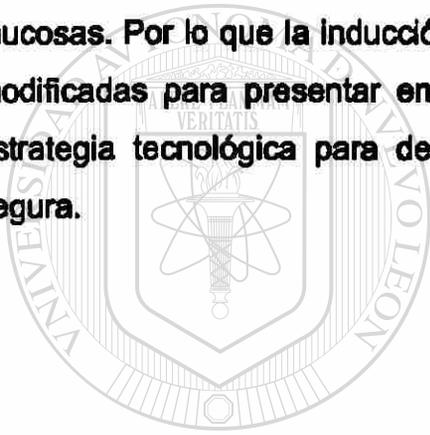
RESUMEN

La epidemia de VIH/SIDA es el problema de salud pública más complejo en la actualidad, y cuyo impacto se refleja en la vida social y económica del mundo. En México, como en otros países, el SIDA se ha convertido en un complejo de grandes problemas psicológicos, sociales, éticos, políticos, etc. que trascienden de un foco común del problema de la salud. El número de casos diagnosticados de VIH en el mundo por ONUSIDA hasta el 30 de Septiembre 2000 son de 36.1 millones. En México, hasta el 30 de Septiembre del 2000 es de 50,713 (Secretaría de Salud). México ocupa 13th lugar globalmente y tercero en América en el número total de casos reportados. Para nuestro país y otros en Latinoamérica es urgente el desarrollo y aplicación de una vacuna que disminuya las tasas de morbilidad y mortalidad de esta infección. En la actualidad virtualmente todas las infecciones por el VIH tienen como puerta de entrada las superficies de mucosas, ya sea la mucosa genital para los casos de transmisión heterosexual, la mucosa gastrointestinal para los casos de transmisión vertical en el útero o después del parto por medio de la leche materna infectada, así como para los casos de transmisión homosexual por contacto oral-genital o anal-genital. El tejido de la mucosas cuenta con un sistema inmune local con propiedades y funciones que en muchos aspectos están separados del sistema inmune sistémico, por tal motivo, para este virus y otros patógenos es necesario desarrollar vacunas que induzcan inmunidad o protección en las mucosas que son el sitio primario de entrada. Los esfuerzos para el desarrollo de una vacuna para prevenir la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) están enfocados sobre la inducción de un anticuerpo neutralizante y la respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos contra la glicoproteína gp 120 y el asa V3 de la gp 120 (sitio principal de neutralización por participar en la infectividad, tropismo, y respuesta específica de CTL). Diversas estrategias para desarrollar vacunas (virus muertos, vacunas de subunidades peptídicas, inmunización con ADN y otras) han tenido dificultades en inducir la respuesta celular y humoral en mucosas al mismo tiempo. Por lo que es necesario encontrar nuevas vías y nuevos sistemas eficaces y seguros, los cuales induzcan

ambos mecanismos de inmunidad en la mucosa gastrointestinal y vaginal, al mismo tiempo. El propósito de la presente investigación fue desarrollar bacterias ácido-lácticas modificadas genéticamente para generar vacunas basadas en vectores bacterianos vivos, seguros e inocuos capaces de inducir inmunidad humoral y celular contra el VIH en las mucosas. Las bacterias ácido lácticas son microorganismos comensales de la mucosa intestinal y genital, además se han utilizado por muchos años en la industria de alimentos lácteos y por ende son bacterias comestibles, inocuas y amigables en la flora intestinal y vaginal. Estas bacterias son los vectores ideales para expresar antígenos heterólogos en mucosas. Para desarrollar nuestra estrategia, se planteo el siguiente objetivo: Inducción de inmunidad contra VIH utilizando *L. lactis* como vector de expresión del antígeno gp 120 en mucosas. Para lo cual se diseñaron iniciadores específicos para amplificar por PCR el gene de la gp120 del VIH-1 (Gene Bank KO3455) a partir del plasmido pSFV1 que contiene dicho gen, el producto fue purificado por el sistema Gene-Clean II y subclonado utilizando el sistema pGEM-T. El gene de la gp 120 fue liberado con Apa I y Xho I del vector pGEM-T y subclonado en el vector de expresión pIL1252:P59:emm6, este vector contiene el promotor P59 el cual es específico para *L.lactis* . Posteriormente se transformó a *L. lactis* con el vector por electroporación. El análisis de la proteína recombinante gp 120 producida en *L. lactis* se llevo acabo por Western Blot , Whole cell ELISA y por Inmunofluorescencia. Se inmunizaron 3 grupos de ratones cada uno con 1×10^9 bacterias a una sola dosis y un cuarto grupo con de ratones a tres dosis a los 0,14 y 28 días con 1×10^9 bacterias recombinantes, cada grupo inmunizado tenia un control (bacteria sin expresión de la gp 120). Se obtuvieron las siguientes muestras de los ratones inmunizados: Bazo, Suero, Heces y lavados estomacal e intestinal, a los 10,18 y 24 días de inmunización para los grupos de una dosis y a los 7 días de inmunización para los de 3 dosis, en las cuales se midieron los niveles de anticuerpos anti-IgG y anti-IgA por ELISA usando un sistema comercial contra el VIH y utilizando la bacteria recombinante como antígeno, Así mismo se analizo la respuesta de proliferación celular al estímulo con antígenos del VIH. Los resultados obtenidos son: la construcción del vector pGEMTgp120 y selección por PCR de varias clonas de *L. Lactis* transformadas con el vector de expresión de la gp120 (p59Mgp120. En dichas clonas se verifico que eran capaces de expresar la gp120 por Western Blot, por medio de las técnicas de Whole-Cell ELISA e Inmunofluorescencia. Determinamos que la gp120 esta anclada en la superficie externa

de la bacteria en una conformación adecuada. Cuando administramos la bacteria recombinante por vía oral se encontró que los niveles de IgG presentes en estomago, fueron significativamente altos a los 10 días después de la inmunización con respecto a los otros tiempos en ambos sistemas, de igual manera los niveles de IgG fueron significativamente altos en los lavados de ratones inmunizados con 3 dosis de 10^9 bacterias. Respecto a los niveles de IgA monomérica en estomago, no se encontraron diferencias significativas con respecto al control en los lavados de ratones inmunizados con 1 sola dosis, ni con 3 dosis de bacteria. En intestino se detectaron niveles significativos de IgG a los 10 y 18 días después de la inmunización con 1 dosis de bacteria en el ELISA comercial, mientras que en el ELISA con *L. lactis* la IgG se encuentra elevada solamente a los 10 días después de la inmunización con la bacteria. Los niveles de IgA en intestino son significativamente altos a los 24 días después de la inmunización en el ELISA comercial, sin embargo son significativos solamente a los 10 días después de la inmunización con la bacteria recombinante en el ELISA con *L. lactis*, mientras que en los lavados de ratones inmunizados con 3 dosis solamente hay diferencias significativas en los niveles de IgG. En cuanto a los niveles de anticuerpos en heces aparentemente solo la IgG parece tener valores significativos a los 10 días después de la inmunización, mientras que en las muestras de ratones inmunizados con 3 dosis no hay niveles significativos con respecto al control ni de IgG, ni de IgA. Con respecto a los niveles de anticuerpos en suero, la IgG e IgA se encuentran elevados a los 10 días después de la inmunización con la bacteria en el ELISA comercial; mientras que en el sistema con *L. lactis* los niveles de IgG están elevados con respecto al control a los 24 días después de la inmunización. Los niveles de IgA en suero aparentemente se encuentran ligeramente elevados a los 10 y 18 días después de la inmunización. En lo que respecta al nivel de anticuerpos en suero de ratones inmunizados con 3 dosis de bacterias recombinante, solamente la IgG presenta niveles significativos con respecto al control. En los ensayos de incorporación de timidina tritiada se encontró que la estimulación específica con dos concentraciones de antígeno del VIH induce la proliferación específica de linfocitos de bazo obtenidos a los 10, 18 y 24 días después de la inmunización y que el número de clones de linfocitos sensibles o específicos al antígeno disminuye considerablemente en el tiempo. Sin embargo no se observaron diferencias significativas con el control en los niveles de proliferación de ratones inmunizados con 3 dosis de 10^9 bacterias. Por otra parte el análisis histológico de las

mucosas del estomago e intestino a los 10, 18 y 24 días despues de la inmunización oral de 10^9 bacterias, indicó que no existen diferencias histológicas en los epitelios, que sean indicativas de daño o alteraciones donde se administraro la bacteria normal y recombinante. También realizamos la detección por inmunohistoquímica de la expresión de marcadores de linfocitos T(CD4) y macrófagos o monocitos (Mac), encontrando que hay un incremento en la expresión de CD4 y Mac en la mucosa del estomago e intestino de los ratones inmunizados con *L.Lactis* recombinante a los 10 días, en comparación con la expresión en las mucosas de los ratones a los que se les administro la *L.Lactis* control (normal). Estos datos en conjunto indican que la administración oral de *L. lactis* modificada para expresar la gp120 Induce anticuerpos específicos en mucosas y en suero, así como la inducción de linfocitos específicos contra el VIH y se asocia a un incremento en la expresión de CD4 y Mac en las mucosas. Por lo que la inducción de inmunidad en mucosas usando bacterias lácticas modificadas para presentar en mucosas antígenos del VIH puede representar una estrategia tecnológica para desarrollar una vacuna contra el SIDA más efectiva y segura.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS GENERALES DEL VIH

El SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Humana) es causado por el VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana). Fue reconocido como una nueva y distinta entidad clínica en 1981.(Gottlieb M,S. 1981.) los primeros casos fueron reconocidos por un grupo de enfermedades inusuales como las causadas por bacterias comunes, levaduras y virus que ordinariamente no causan enfermedades severas que se presentaron en hombres homosexuales además que fue observado un patrón de inmunodeficiencia clínica, ya que el SIDA es el estado final y más serio de la enfermedad. (Stites, D,P. 1994).

El VIH pertenece al grupo de los lentivirus y presenta dos variedades: VIH-1 y VIH-2, siendo el VIH-1 el principal agente causal de la enfermedad. Esta clasificado dentro de la familia de los retrovirus, llamado así por su habilidad de transformar su información genética de ARN a ADN. Este paso es por medio de una enzima llamada transcriptasa reversa (TR), la cual es codificada por un gen dentro del genoma viral, el gen *pol* y otros dos *gag* y *env*, son las principales regiones codificantes de las proteínas estructurales necesarias de los retrovirus para su ciclo de vida. (Fig. 1). Los genes accesorios presentes en el VIH son LTR, *vif*, *vpr*, *nef*, *tat*, *rev* y *vpu* para VIH-1 o *vpx* para VIH-2.

La característica dominante inmunitaria de infección por VIH, es la eliminación progresiva del subgrupo CD4, de los linfocitos T, y por lo tanto revierte la proporción normal CD4: CD8 y agrava la inmunodeficiencia, esto es debido al tropismo del VIH por éstas y otras células que poseen el receptor CD4, ya que la superficie de esta molécula funciona como entrada para el virus. Ciertas células como fibroblastos y células gliales derivadas del encéfalo que no presentan molécula de CD4, también pueden ser infectadas por VIH. Estas células poseen otras moléculas que pueden actuar como receptores para VIH, incluyendo al galactosil ceramida en las células derivadas del encéfalo. (Klatzmann D, 1984).

El VIH ha sido encontrado en sangre, semen, saliva, lagrimas, tejido del sistema nervioso, leche materna y secreciones del tracto genital femenino; sin embargo sólo la sangre, semen, secreciones del tracto genital femenino, y leche materna han sido probados que transmiten la infección.

La transmisión del virus ocurre a través de: contacto sexual, incluyendo sexo oral, vaginal y anal; vía sanguínea, a través de transfusiones o agujas contaminadas; y de una mujer embarazada al feto o de una madre lactante a su bebe. En hombres, la fuente principal de transmisión ha sido la sexual (homosexual y heterosexual) y sólo secundariamente a través de transfusiones. En mujeres, la principal fuente de transmisión ha sido por transfusión, pero actualmente la principal es por contacto heterosexual. Los casos pediátricos iniciales (menores de 15 años) la transmisión fue por vía sanguínea, sin embargo actualmente ha cambiado a una transmisión perinatal con pocas incidencias de transmisión sexual (Magis-Rodríguez C, 1998). Otros métodos de transmisión son raros e incluyen picaduras de agujas accidentalmente, inseminación artificial por donadores de semen, transplante de riñón por un donador infectado. El patrón global de transmisión de VIH varia por región y país, siendo influenciados por cultura, valores, condiciones sociales, dinámica sexual, y situación socioeconómica (CONASIDA. México, 1997).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

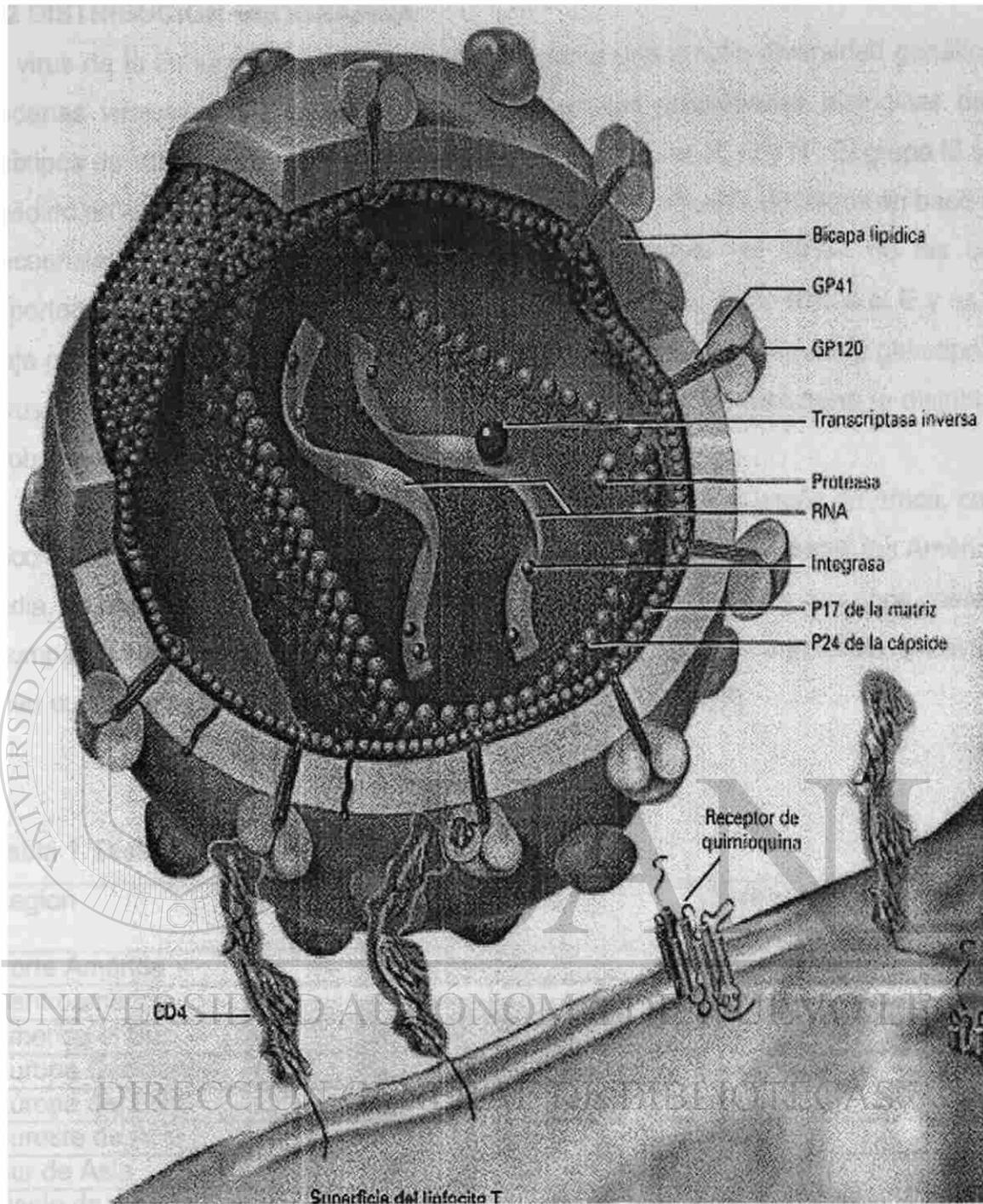


Fig 1. Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA

El virus de la inmunodeficiencia humana presenta una amplia diversidad genética de cadenas virales, con importantes diferencias en las propiedades biológicas de los subtipos de VIH-1. El VIH -1 es dividido en tres grupos , el M, O y N . El grupo M se ha dividido en varios subtipos que van de la A a la J, originalmente definidos en base a las secuencias de los genes gag y env. Aproximadamente el 50% de las cepas reportadas pertenecen al subtipo B, 16% al subtipo A , 9% al C, 10% a el E y en muy baja proporción las subtipos F,G y H. La distribución de estos diferentes genotipos del virus a nivel global es muy amplia, en la siguiente tabla se menciona la distribución global de los subtipos por regiones. (Fig.2)

En el caso del VIH-2 aparentemente esta confinado al oeste de África, con un foco en Angola y Mozambique y algunos casos reportados en Europa, las Américas e India. La prevalencia del VIH-2 es más baja que el VIH-1 donde los dos tipos coexisten. Comparado con en VIH-1, el VIH-2 aparentemente es menos transmisible a través del inter curso sexual, su esparcimiento es lento.(Vincent,T.1997)

Tabla 1. Distribución Geográfica del VIH

Region	Alta prevalencia	Baja prevalencia
Norte América	B	A,C,D,E,O
Centroamérica	B	
América el Sur	B	F,C
Europa Occidental	B	A,C,D,F,G
Europa del Este	B	A,C,D,F,G
Sureste de Asia	E	B,C
Sur de Asia	C	A,B,E
Oeste de Asia	C	
África del Oeste	A	C,D
África Central	A	B,C,D,E,F,G,H,O
África del este	A	D
Sud África	C	B,D
Australia	B	

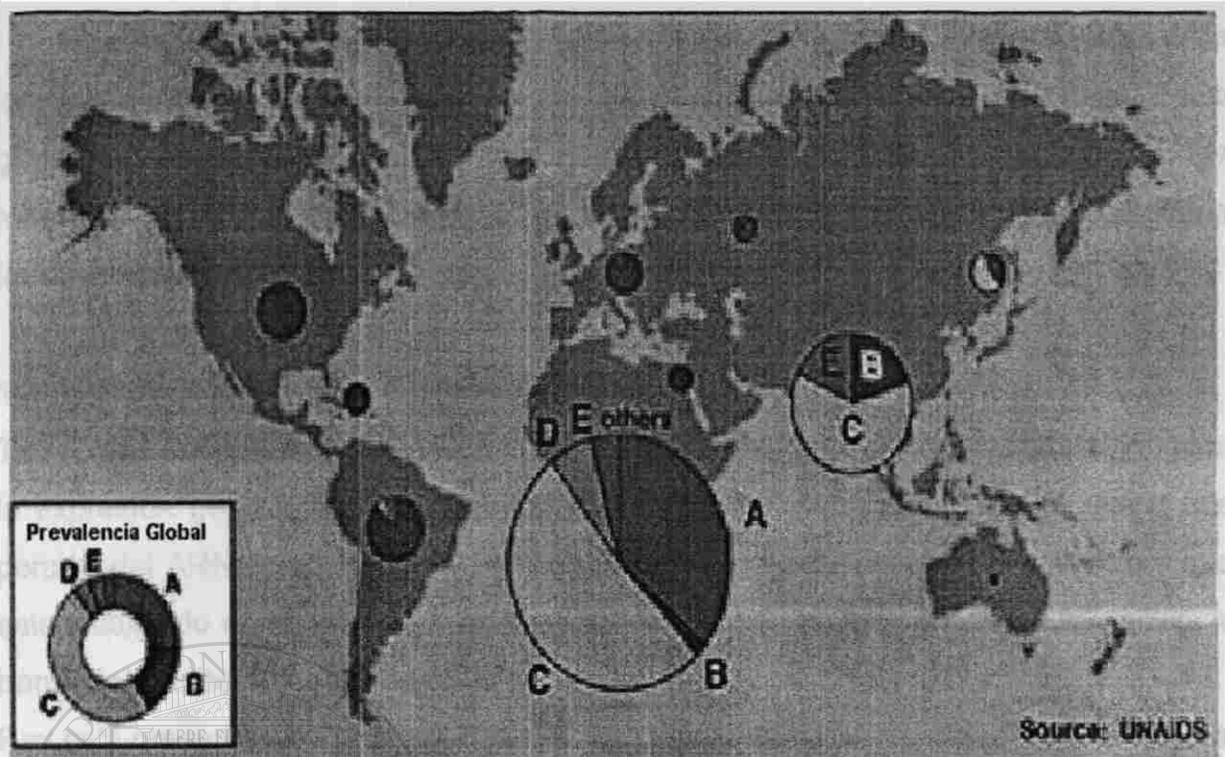


Fig 2. Distribución Geografica del VIH

1.3 ORGANIZACIÓN GENOMICA DEL VIH-1.

La forma integrada del VIH es de aproximadamente 9.8 Kilobases. Ambos extremos están flanqueados por una secuencia repetida conocida como LTR. Los genes del VIH están localizados en la región central del ADN proviral y codifican por lo menos 9 proteínas (Muesing MA, 1985), las cuales son divididas en tres clases:

1.3.1 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES PRINCIPALES (Gag, Pol y Env)

Las proteínas de la capsida son codificadas por la región *gag*. El precursor es la proteína p55 de 55 Kilo daltons, la cual es modificada durante el proceso de maduración viral en 4 proteínas designadas como MA (matriz, p 17), CA (capsida, p24), NC (nucleocapsida p9), y p6. (Fig. 3).

La proteasa viral (pro, p10), integrasa (In, p31), RNAsa H (p15) y el homodímero de la transcriptasa reversa (RT, p66-p51) son expresadas en el contexto de un precursor *gag-pol*, producidas como una poliproteína Gag-pol (p160), las cuales son procesadas por la proteasa viral, estas enzimas son necesarias para la replicación viral.

La región genómica *env* codifica las proteínas de la capsida, responsables de la infectividad de la partícula viral por su unión al receptor específico celular. Estas glicoproteínas son producidas como un precursor gp160 (160Kd). Una proteasa celular rompe la gp 160 para generar la glicoproteína externa (gp120) y la glicoproteína transmembranal (gp41). (Fig.3).

1.3.2 PROTEÍNAS REGULATORIAS (Tat y Rev)

Tat (Trans activador transcripcional) es un importante factor de la regulación viral para la expresión génica de VIH, presente en el núcleo y el nucleolo, tat se une a una porción del ARN conocida como TAR (elemento de respuesta a la transactivación) que esta localizado en el extremo 5' terminal del ARN viral, la unión de tat a TAR activa la transcripción del VIH al menos 100 veces.

Rev está presente en el núcleo, nucleolo y es un puente entre el núcleo y el citoplasma, rev induce la transición de la expresión de proteínas tempranas a tardías, también actúa uniéndose a RRE (elemento de respuesta a Rev, promoviendo el transporte de ARN del núcleo al citoplasma.

1.3.3 PROTEÍNAS ACCESORIAS (Vpu, Vpr, Vif y Nef)

Vpu (proteína viral U) es una proteína integral de membrana de VIH-1 de 16Kd con dos funciones biológicas: la degradación del CD4 en el retículo endoplasmico y el incremento en la liberación de los viriones en la membrana plasmática de la célula infectada.

Vpr (proteína viral R) proteína de 14Kd del núcleo que promueve la localización nuclear del complejo de preintegración e inhibe la división celular

Vif (factor de infectividad viral) es una proteína básica del citoplasma, de 23Kd que promueve la infectividad, pero no la producción de partículas virales.

Nef es una proteína multifuncional de la membrana plasmática y del citoplasma, de 27Kd que actúa en la regulación de los linfocitos CD4, incrementa la infectividad viral, necesaria para el mantenimiento de la producción de virus. En cuanto a los genes accesorios, LTR (largas regiones terminales repetidas) son importantes regiones regulatorias para la transcripción inicial y poliadenilación. (Kober B, 1998). (Fig.3).

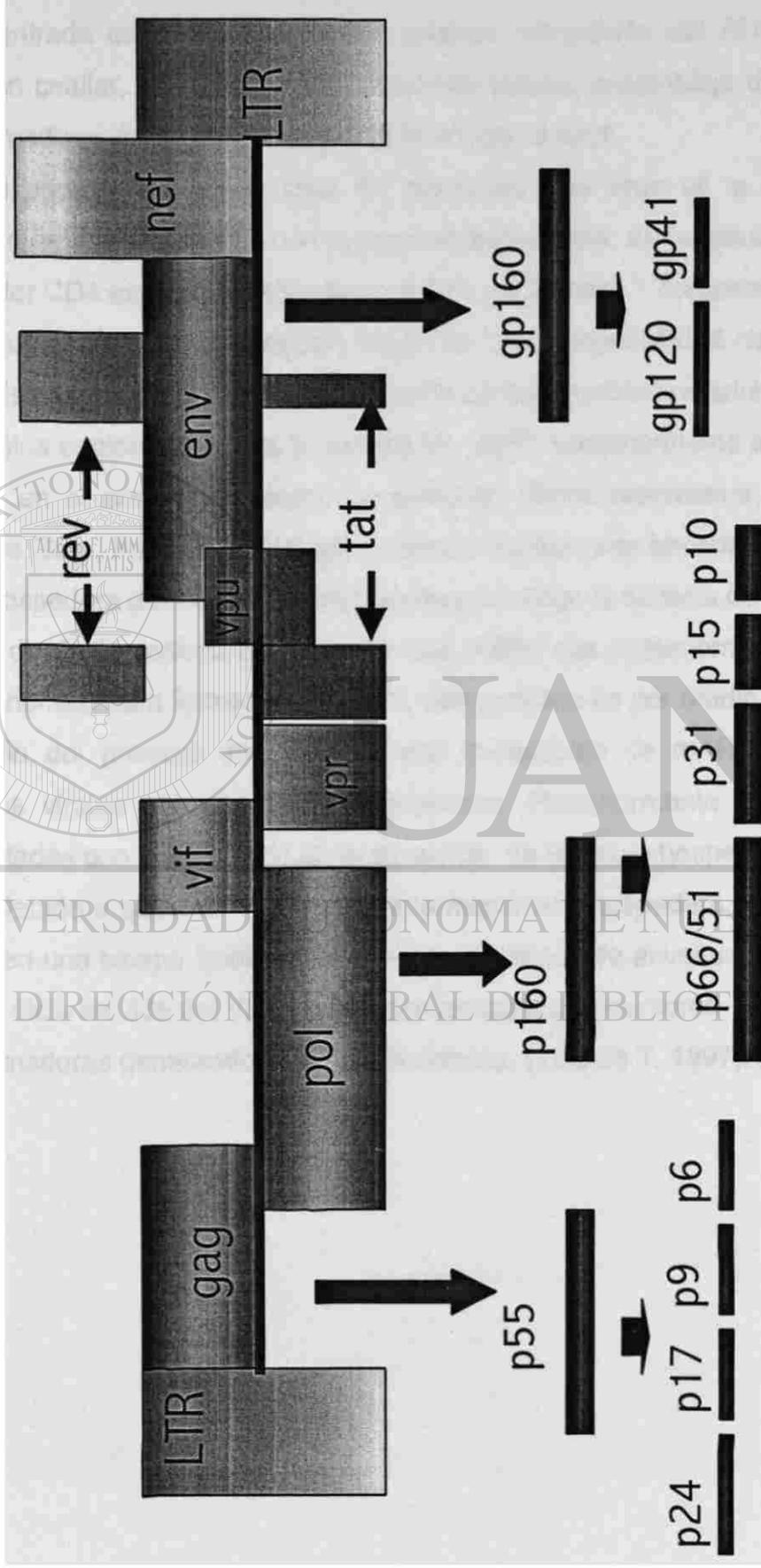


Fig 3. Organización Genómica del VIH.

1.4 CICLO DE REPLICACION DEL VIH

Los eventos moleculares en el ciclo de replicación del VIH-1, incluyen los siguientes pasos: entrada del virus, transcripción reversa, integración del ADN viral en el ADN genómico celular, expresión de las proteínas virales, ensamblaje del virus, salida del virion y maduración de las proteínas de la envoltura viral.

El primer paso en el ciclo de replicación del virus es la interacción de las proteínas de envoltura (env) con receptores específicos de la célula hospedera como el receptor CD4 expresado sobre la superficie del linfocito T cooperador y otros factores accesorios, incluyendo al complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II (Grassi F, 1991). Estas interacciones llevan a la fusión de las membranas celular y viral por medio de cambios conformacionales (Kowalski M, 1987), posteriormente el core del virion es liberado en el citoplasma como un complejo ribonucleoproteína, este complejo de proteínas Gag, Pol y ARN viral genómico es rápidamente transportado al núcleo de la célula hospedera donde la transcriptasa reversa dirige la síntesis de una copia de ADN proviral de doble cadena del genoma viral (ARN) que posteriormente se incorpora al ADN genómico para formar un provirus, este proceso es por medio de la integrasa. La expresión del provirus integrado genera transcritos de mRNA que codifican las proteínas virales estructurales y regulatorias. Posteriormente estas proteínas son ensambladas con el ARN viral en la superficie de la célula hospedera para generar un virion. Debido a que salen a través de la membrana hospedera, las partículas virales adquieren una bicapa lipídica que contiene proteínas de envoltura virales. Como paso final del ciclo de vida del VIH, la proteasa rompe los precursores gag y gag-pol en sus formas maduras generando viriones infecciosos. (Vincent T. 1997). (Fig.4).

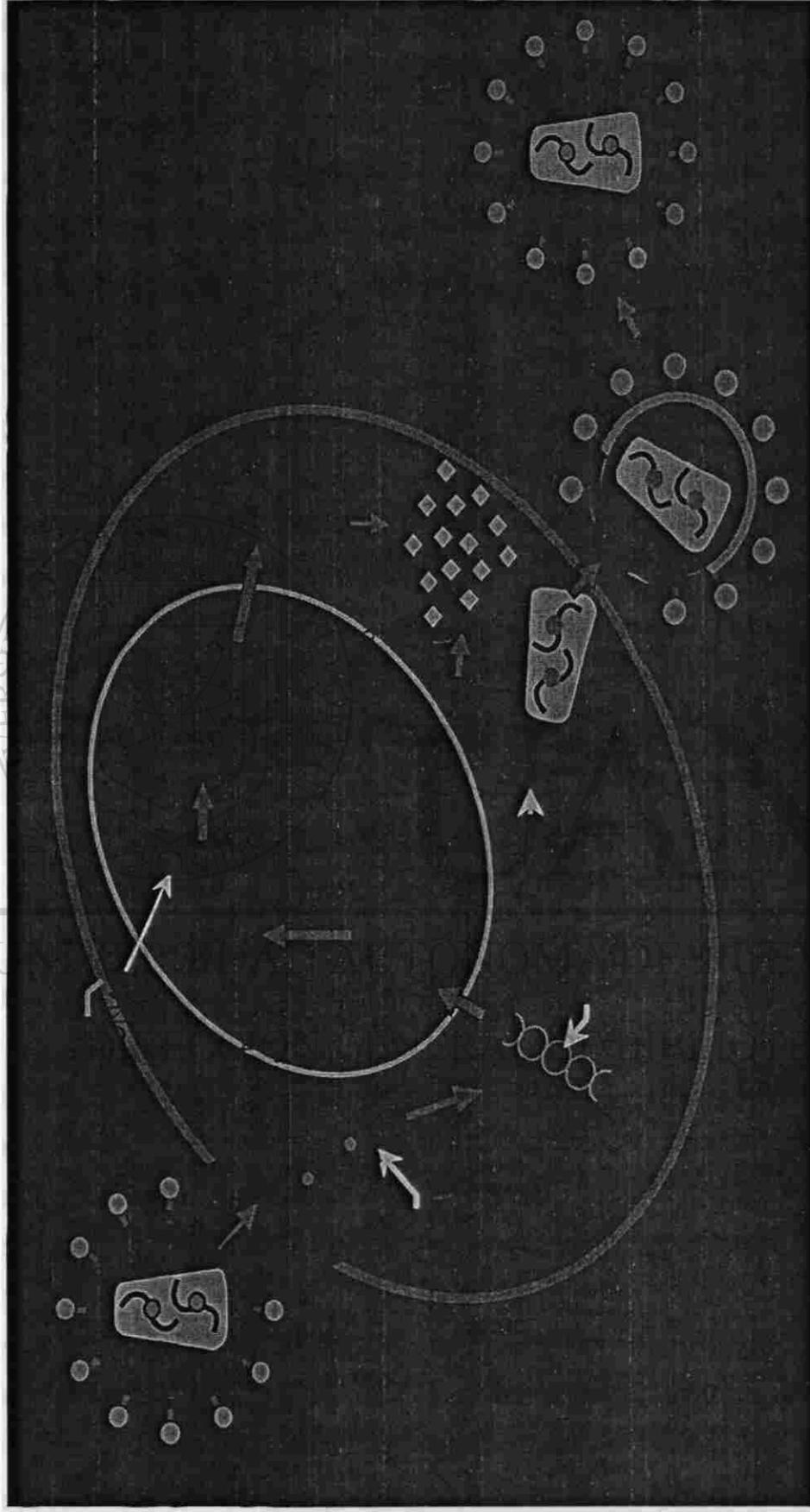


Fig 4. Ciclo de Replicación del VIH.

1.- Reconocimiento de receptores y fusión a la célula blanco, 2.- Transcripción inversa; el RNA viral se convierte en DNA de cadena simple, 3.- Integración al genoma de la célula blanco, 4.- Transcripción de los RNAs mensajeros virales, 5.- Traducción en ribosomas de los RNAs mensajeros virales, 6.- Ensamble de las proteínas virales para formar partículas virales, 7.- Liberación de las partículas virales por gemación a través de la membrana celular.

1.5 CARACTERÍSTICAS DE LA gp120 DEL VIH

El virión maduro del HIV es una partícula icosaédrica con un diámetro aproximado a los 110 nm. La envoltura externa tiene 76 picos formados por dímeros o trímeros de complejos de gp 160. Las proteínas de la envoltura del HIV son codificadas por el gene *env*, el cual contiene regiones conservadas, variables e hipervariables. El gene *env* codifica un polipéptido de 88 kd con un residuo de 21 cisteínas, la cual a través de enlaces disulfuro juega un papel esencial en la determinación de la conformación tridimensional de las proteínas de la envoltura externa. La caracterización bioquímica de la gp120 muestra que 18 cisteínas son utilizadas para formar 9 enlaces disulfuro como se representa en la figura 5. Además, hay 16 sitios de glicosilación asociados a ésta molécula. El polipéptido de la envoltura es procesada siguiendo la traducción, empezando en el retículo endoplásmico donde la molécula precursora es dividida hacia un sitio endoproteolítico dando lugar a la gp160. La división de esta proteína es requerida para la infectividad del VIH.



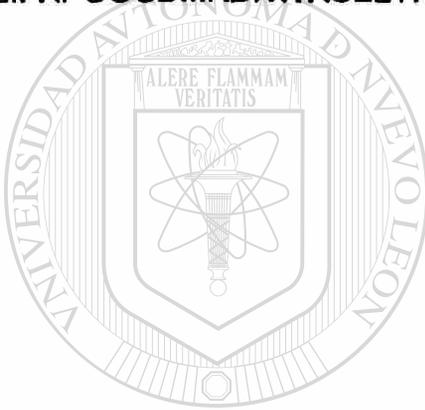
Fig 5. Glicoproteínas de la envoltura del VIH. Las regiones en negro y blanco son las regiones variables y conservadas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La transferencia del precursor de los sitios asociados a la glicosilación en el polipéptido naciente también ocurre en el retículo endoplásmico. Subsecuentemente el complejo de oligosacáridos son generados en una ruta de "adorno" donde la glicosidasa I y II actúan para remover los residuos de glucosa. En el aparato de Golgi, la manosidasa I remueve 4 residuos de manosa, seguido por la adición de n-acetilglucosamina y se remueven residuos de manosa por la manosidasa II. Estudios bioquímicos recientes han demostrado que los sitios de glicosilación son utilizados, con 15 complejos y 9 residuos altos de manosa en gp120. El entendimiento de las modificaciones post-traduccionales de las glicoproteínas de la envoltura ha dejado varias oportunidades terapéuticas para SIDA. Por ejemplo, la desglicosilación completa de la gp120 decrece su capacidad de unirse al receptor de la célula hospedera. En efecto, la inhibición de la manosidasa I en el aparato de Golgi por 1-desoximanoymiricina decrece la infectividad

del HIV *in vitro*, los residuos de manosa sugieren que son importantes para la infectividad. La secuencia de la glicoproteína es:

TEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWA THACVPTDPN
PQEVVLVNVTFENFMWKNM VEQMHEDIIS LWDQSLKPCV
KLTPLCVSLKCTDLGNATNTNSSNTNSSSG EMMMEKGEIK NCSFNISTS
RGKVQKEYAFFYKLDIIPID NDTTSYTLTS CNTSVITQAC PKVSFEPIPI HYCAPAGFAI
LKCNNKTFNG TGPCTNVSTV QCTHGIRPVV STQLLNGS AEEEVVIRSA
NFTDNAKTII VQLNQSVEIN CTRPNNNTRK SIRIQRGPGR AFVTIGKIGN
MRQAHCNISR AKWNATLKQI ASKLREQFGN NKTIIFKQSS GGDPEIVTHS
FNCGGEFFYC NSTQ FNSTW FNSTWSTEGS NNTGSDTIT LPCRIKQFIN
MWQEVGKAMY APPISGQIRC SSNITGLLLT RDGGNNNGS
EIFRPGGGDMRDNRSELYK YKVVKIEPLG VAPTKAKRRV VQREKR

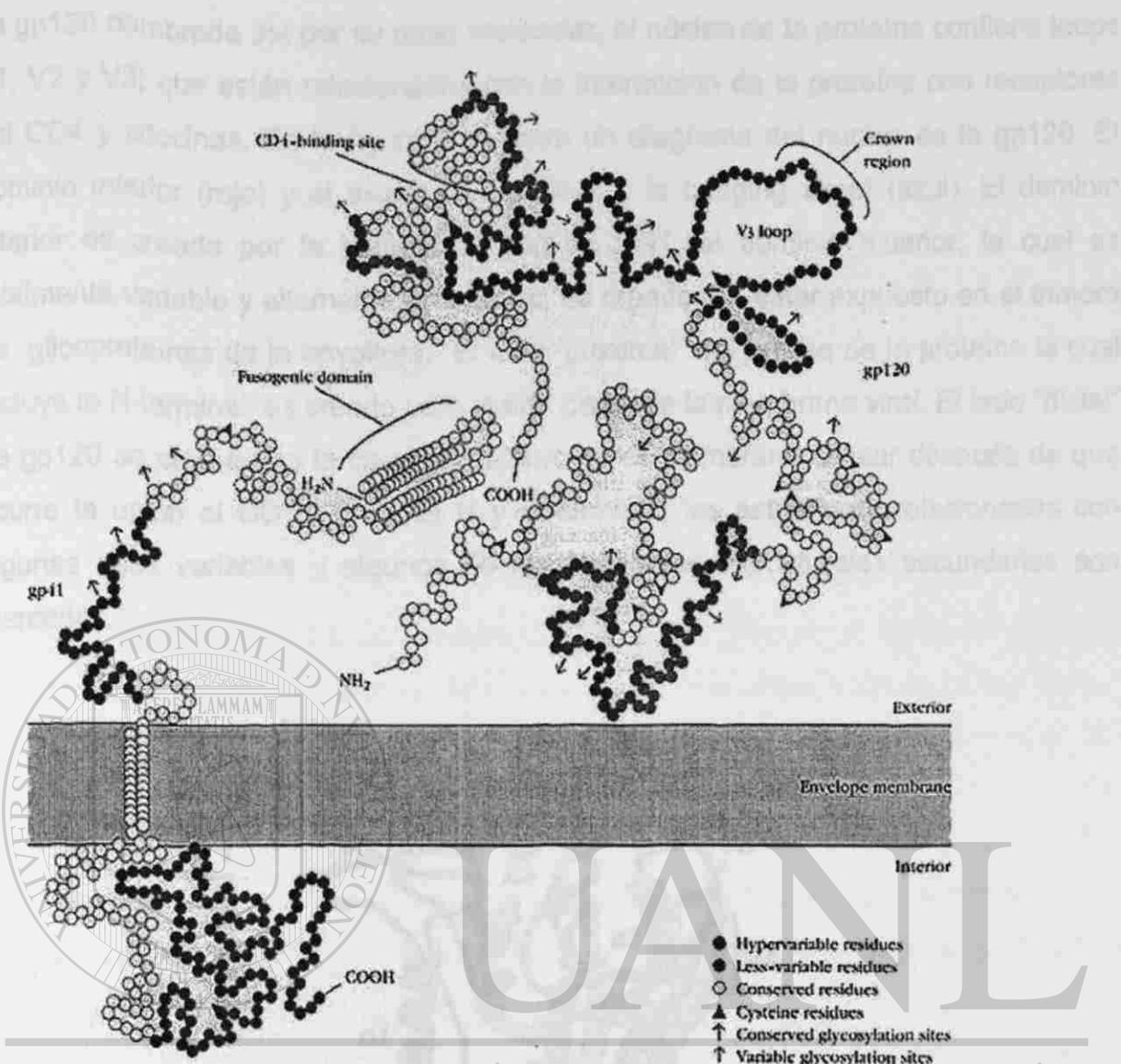


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig 6. Asociación e Interacción de la gp120/gp41 con CD4.

Fig 7. Núcleo de la gp120; dominio interno (rojo), dominio exterior (amarillo), unión de unión (azul).

La gp120 nombrada así por su peso molecular, el núcleo de la proteína contiene loops V1, V2 y V3; que están relacionados con la interacción de la proteína con receptores del CD4 y citocinas. En la figura 7 muestra un diagrama del núcleo de la gp120. El dominio interior (rojo) y el externo (amarillo), y la bridging sheet (azul). El dominio interior es creado por la interacción con la gp41, el dominio exterior, la cual es totalmente variable y altamente glicosilada; es creado por estar expuesto en el trimero de glicoproteínas de la envoltura. El lado "proximal" del núcleo de la proteína la cual incluye la N-terminal, es creado para residir cerca de la membrana viral. El lado "distal" de gp120 se cree que es la cara del objetivo de la membrana celular después de que ocurre la unión al CD4.(Fig.6). El N y C terminal, las estructuras relacionadas con algunas asas variables y algunos de los elementos estructurales secundarios son marcados.

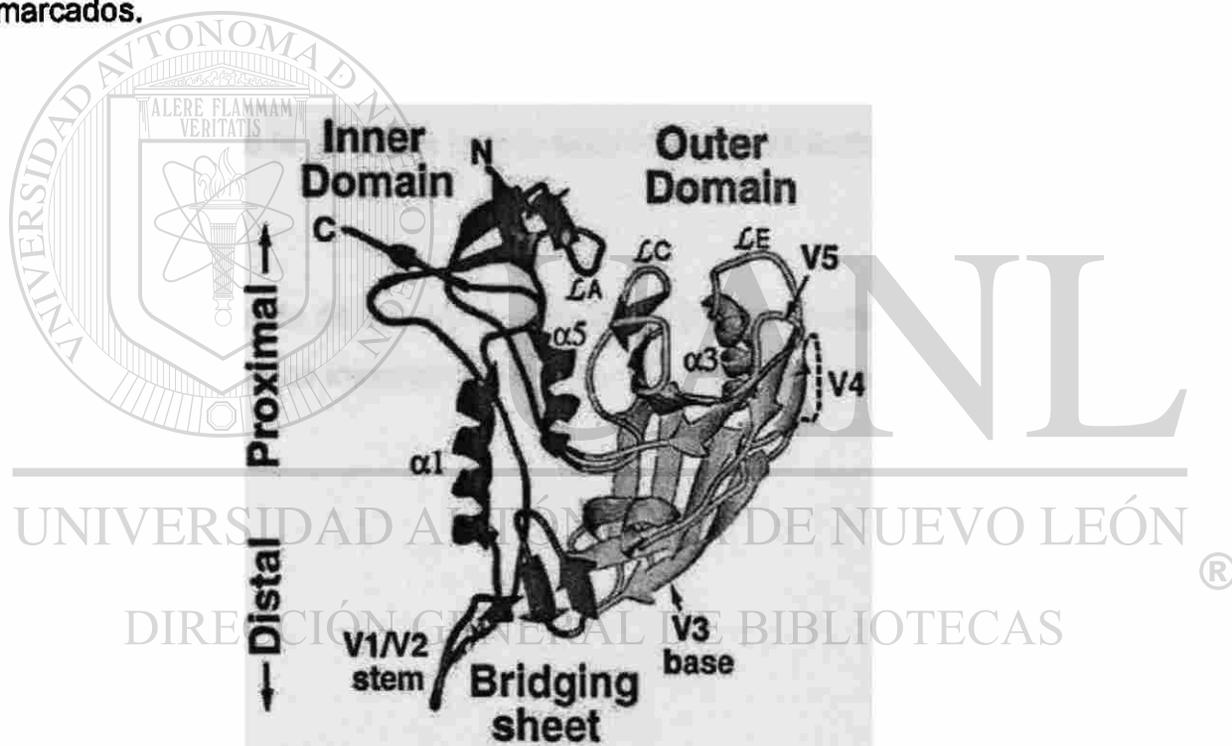


Fig 7. Núcleo de la gp120 ; dominio interno (rojo), dominio externo (amarillo), puente de unión (azul).

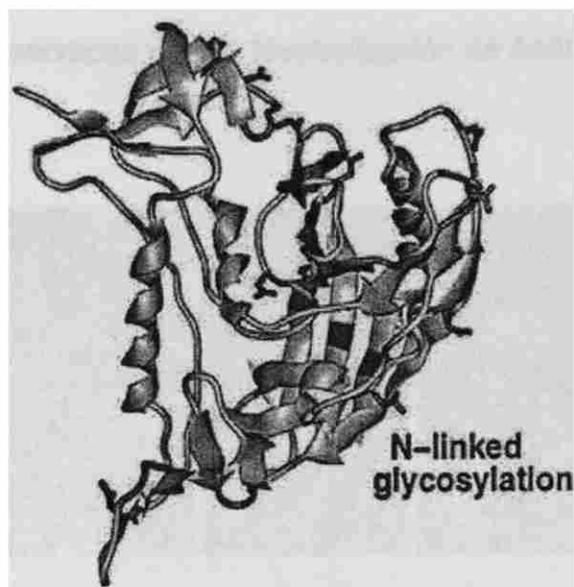


Fig 8. Imagen que muestra los residuos de asparagina (incluyendo cadenas laterales) modificadas por N glicosilación en azul. Se cree que la concentración de glicosilación en la superficie de la gp120 es la cara externa en los vértices de la glicoproteína de la envoltura.

Una parte importante de la estructura de la gp120 es la localización de algunos epitopes conservados importantes para la neutralización de anticuerpos en la gp120 (Tabla No. 2)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 2. Epitopes Conservados para la Neutralización de Anticuerpos en el Núcleo de la gp120

GRUPO	EJEMPLOS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	AMINOÁCIDOS DE LA GP120	MECANISMO PROBABLE DE LA NEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS	PROPIEDADES
Sitio de unión al CD4 (CD4BS)	F105 15e 21h 1125h 448D 39.3 IgG1b12 830D	Asn88(13), Asp113(50), Lys117(25) Ser256(75) Thr257(75) Asn262(63) Ala266(13) Asp368(100) Glu370(100) Tyr384(13) Lys421(50) Trp427(25) Asp457(13) Pro470(25) Asp474(13) Met475(13) Asp477(63) Asp/Leu/Tyr 482/483/484 (25)	Interferencia con la unión gp120-CD4	Los anticuerpos CD4BS compiten con anticuerpos en contra de epitopes CD4-i

<p>Epitopes inducidos de CD4 (CD4-i)</p>	<p>17b 48d</p>	<p>Asn88,Lys117, Lys121, Lys207, Ser256, Thr257, Asn262, ΔV3, Glu370, Glu381, Phe382, Arg419,Ile420,Lys421, Gln422, Ile423, Trp427, Tyr435, Pro438, Met475</p>	<p>Interferencia con la unión al receptor de citocinas</p>	<p>La unión al CD4 incrementa la exposición de los epitopes como resultado del movimiento del loop V2</p>
--	-------------------------	--	--	---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2G12

2G12

Asn295,

Desconocido

La unión del

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Thr297,

anticuerpo

Ser334,

depende de la

Asn386,

propiedad de

Asn392,

asociación a la

Asn397

glicosilación

1.6 PAPEL DE LA gp120 EN PATOGÉNESIS

La gp120 se une al CD4 expresado en linfocitos T, macrófagos y células dendríticas. Infección a macrófagos/monocitos. También expresan CD4. Pocos monocitos infectados se encontrarán en circulación son relativamente resistentes a los efectos del VIH. Funcionan como reservorios del virus en tejidos específicos. Pueden infectar células T a través de una unión célula-célula. Los antígenos de VIH están presentes a través de la red de células dendríticas, la cual funciona también como reservorio del virus. Hay niveles altos significativos de expresión del VIH en el tejido linfático, la replicación en el tejido linfático durante todas las etapas de la enfermedad, aún cuando el virus no es detectable en células mononucleares en sangre periférica (PBMCs).

El proceso de infección empieza cuando la gp120 se une al principal receptor de la célula que es el CD4. Esto induce un cambio conformacional con la proteína inducida por la interacción de la gp120 con los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4. Este cambio expone a la gp41 permitiendo que se inicie la fusión de las membranas. El material genético contenido en un núcleo proteico es liberado dentro de la célula huésped. Ocurre una desnudez parcial del núcleo viral para exponer el RNA viral. Una vez en el citoplasma, la conversión del RNA viral entra en la doble cadena de DNA y comienza la actividad de la transcriptasa reversa. La transcriptasa reversa sintetiza una doble cadena de DNA copia de una cadena sencilla de RNA viral generando un provirus. El DNA viral migra y entra al núcleo de la célula huésped (proceso facilitado por las proteínas vpr y MA) y se integra al genoma celular con la ayuda de la integrasa. El provirus permanece latente o inactivo, generando productos para las nuevas generaciones de viriones. Dentro del núcleo, la RNA polimerasa II transcribe el DNA viral a RNAm. El RNAm viral deja el núcleo. La transcripción del RNAm resulta en la síntesis de tres polipéptidos: env, gag p55 y p160.

Las proteínas de la envoltura (gp160) pasan a través del retículo endoplásmico y aparato de golgi para ser procesadas la gp120 y gp41. Durante el movimiento a través del aparato de golgi, ocurre la glicosilación de la gp120. La gag se asocia con la superficie de la membrana plasmática interna e interactúa con la gp41. El virus sale de la célula, adquiere una capa lipídica, llevando la gp120 y gp41. El virus es secretado en el espacio extracelular en estado inmaduro. Durante la gemación de las nuevas partículas virales de la membrana de la célula huésped, la proteinasa en p160 empieza a activarse, resultando en el ensamblaje de p160 y p56 dentro de varias subunidades y

generando así VIH maduros. Este proceso de p160y p56 por la proteínasa es esencial para la generación de virus infecciosos.

1.7 PRINCIPALES ANTIGENOS DEL VIH

Los principales inmunógenos del virus de la inmunodeficiencia humana son:

1.7.1 GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA DEL VIRION (ENV)

Principalmente las proteínas virales de envoltura gp120, su loop V3 o la gp 160 han sido más comúnmente utilizadas como inmunógenos en las primeras vacunas experimentales contra el VIH-1. Se consideran importantes por el hecho de contener varios epítopes funcionales de células T y B, incluyendo al menos cinco dominios neutralizantes y otros para actividad CTL o de citotoxicidad mediada por células pero dependiente de anticuerpos (ADCC). Las glicoproteínas de envoltura también pueden contener epítopes potencialmente indeseables, tales como el supresor de células T, en la gp41, reconocido por las personas infectadas.

1.7.2 PROTEÍNAS INTERNAS DEL VIRION

Otros inmunógenos son los productos del gen gag, los cuales contienen secuencias de aminoácidos altamente conservadas o de poquísima variabilidad, también contienen epítopes reconocidos por Th y CTLs. Los epítopes para CTL están también localizados dentro de dominios relativamente conservados en otros productos de genes del VIH-1, tales como aquellos codificados por los genes nef y el de la polimerasa pol. Cerca de 70 al 85% de las personas infectadas con el VIH-1 presentan anticuerpos anti-proteína nef, pero no se conoce el papel de ellos en el control de la infección.

1.8 RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VIH

La respuesta temprana al VIH es similar a la respuesta frente a otros virus, siendo eficaz para destruir virus presentes en la sangre, sin embargo es evidente que la respuesta es incapaz de erradicar los virus y la infección termina superando al sistema inmunitario. En parte esto se debe a que las células necesarias para montar la respuesta inmune son destruidas o inactivadas por el virus. Además el virus muestra una gran variabilidad genética, produciendo variaciones antigénicas que lleva a la evasión del sistema inmune del huésped.

1.8.1 RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Se han observado respuestas específicas humorales y celulares para productos génicos virales en pacientes infectados por VIH. La mayoría de las moléculas inmunogénicas del VIH parecen ser glicoproteínas de su envoltura, encontrándose títulos elevados de anticuerpos anti-gp120 y anti-gp41 en la mayoría de los individuos infectados. Otros anticuerpos encontrados con frecuencia en suero de los pacientes son anticuerpos contra p24, transcriptasa inversa, y productos de gag y pol. (Abul K. ABBAS 1999). También se han encontrado anticuerpos contra la región V3 de la gp 120 y se ha postulado que estos anticuerpos inhiben la infección del VIH (neutralizantes) por medio de la prevención de la maduración de la gp 120, previniendo un cambio conformacional en la gp 120 que es necesario para la entrada del virus a la célula hospedera o para su fusión a ella, sin embargo estos anticuerpos anti-V3 son específicos de cepas de virus por ser una región variable. Sin embargo en general, los niveles de anticuerpos de todas las proteínas disminuyen a medida que la infección VIH progresa a SIDA. (Vincent T 1997).

1.8.2 RESPUESTA INMUNE CELULAR

La respuesta inmune celular es esencial para el control de la infección viral. Las células T CD4 (cooperadoras) son requeridas para la producción de anticuerpos por las células B, se han identificado respuesta de Células T cooperadoras, células citotóxicas (CTL) restringidas al complejo mayor de histocompatibilidad II contra varias proteínas del virus, incluyendo env, gag y pol, para CTL restringidos a MHC I se han encontrado contra gag, env, nef y pol. Los CTL juegan un papel importante en la inmunopatogénesis de la infección del VIH por su contribución a la depleción de células presentadoras de antígeno infectadas con VIH, pero a medida que la infección progresa el número de CTL disminuye.

Por otro lado las células NK que son capaces de matar células a través del fenómeno de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), ya que no esta restringida a MHC, es potencialmente importante, ya que puede eliminar células infectadas con virus. (Vincen T, 1997)

1.9 VACUNAS CONTRA EL VIH

Debido a la severidad del SIDA y que cientos de personas continúan siendo infectadas con VIH cada día, es urgente el desarrollo de una vacuna efectiva contra el virus, siendo las investigaciones científicas importantes para obtener una medida profiláctica

o curativa para dicha enfermedad. Recientemente se están evaluando más de 60 candidatos de vacunas en fase clínica I y han comenzado las primeras vacunas en fase clínica III en humanos. Sin embargo a la fecha no se tiene a la mano una vacuna efectiva. Para que una vacuna sea efectiva debe de ser segura, inmunogénica y estable, causando una fuerte y medible respuesta inmune.

El principal problema para el desarrollo de una vacuna es la capacidad del VIH para evadir la respuesta inmune, por medio de algunas proteínas virales como Nef, Tat y Vpu que han sido involucradas en la evasión del sistema inmune por medio de la regulación de la expresión de linfocitos CD4 y/o expresión de moléculas de MHC I, así como la sobre regulación del ligando FAS, específicamente las proteínas Nef y Tat sobre regulan factores celulares, incluyendo co-receptores, inhiben la transcripción de MHC clase I y promueve la apoptosis, Vpu sobre regula la expresión de CD4 y de MHC I por medio de la pérdida de nuevas cadenas alfa MHC clase I sintetizadas endógenamente.

Por lo tanto es de gran importancia, la selección y purificación de un antígeno apropiado para estimular la respuesta inmune y la selección de un adyuvante apropiado (Understanding Vaccines. 1998).

Las vacunas propuestas para el virus de la inmunodeficiencia humana, pueden ser divididas ampliamente en cuatro categorías de acuerdo al método de producción: péptidos sintéticos o subunidades peptídicas, vectores recombinantes vivos, vacunas atenuadas vivas, partículas completas inactivadas y vacunas de DNA (The Jordan Report. 1998).

1.9.1 VACUNAS DE PROTEÍNAS Y SUBUNIDADES PEPTIDICAS

Actualmente, los principales candidatos para el desarrollo de una vacuna son los productos génicos que codifican para las proteínas de envoltura viral, otros que también se utilizan son los productos de los genes gag, pol, o ambos. Estas vacunas constan de pequeñas proteínas o porciones de péptidos del virus patogénico. Pueden ser hechas por ingeniería genética con bacterias, levaduras, o células de mamíferos para producir dichas subunidades antigénicas.

Las proteínas de envoltura del VIH son el blanco más importante ya que son el sitio de unión a la célula y permiten la entrada viral, generalmente se utiliza la proteína gp 120 o gp160 producida en bacterias, levaduras o células de mamíferos.

Las subunidades peptídicas, pueden ser producidos por síntesis química y estos incluyen ambos epítopes de células B y de células T, también pueden estar conjugados con lípidos para estimular linfocitos citotóxicos. Actualmente están en evaluación: las subunidades gp 160, gp120, p24 y péptidos sintéticos de V3 (sólo o acoplado con PPD o toxina A de *Pseudomonas*, p24) (Achour A, 1996). Al menos 13 diferentes vacunas basadas en las proteínas de envoltura han sido evaluadas en humanos. Todas estas vacunas inducen virtualmente anticuerpos neutralizantes contra los virus aislados de laboratorio, pero no inducen respuesta citotóxica por los CTL. (Klein M. 2001). Además que una de las principales desventajas de estas vacunas es el costo de producción y purificación de la subunidad proteica.

1.9.2 VACUNAS DE VIRUS VIVOS ATENUADOS

Estas vacunas son producidas por mutaciones o deleciones hechas en los genes del virus atenuándolo. Se están convirtiendo en las vacunas virales más efectivas, utilizan virus vivos que han sido modificados o atenuados para producir un virus menos virulento, induciendo ambas inmunidades, celular y humoral, generalmente requieren solo una o dos inmunizaciones, así la respuesta inducida por vacunas de atenuados vivos es duradera. Debido a causas de las consideraciones de seguridad las vacunas de VIH de atenuados vivos no han sido probadas en humanos, ya que existe la posibilidad de que algunas vacunas puedan causar SIDA, por el revertimiento del virus de tipo silvestre atenuado o que la infección de largo término pueda causar enfermedades auto inmunes o enfermedades malignas.

Los estudios de las vacunas de virus vivos atenuados son dirigidas al uso de VIS en simios. Sin embargo una de estas vacunas en altas dosis, ha causado muerte en simios neonatos y en algunos individuos juveniles o adultos que pueden ser susceptibles a la enfermedad de esa vacuna. Las investigaciones están determinando el mecanismo responsable para la protección contra VIH con vacunas de vivos atenuados y encontrar una vía segura para la administración de estas vacunas (Altmeyer R, 1994. Charbit A. 1993. Lubeck MD, 1997. Trauger R, 1994).

1.9.3 PARTICULAS O VACUNAS COMPLETAS INACTIVADAS

Las vacunas completas inactivadas son preparadas de virus patogénicos disponibles o capaces de replicarse, usualmente son hechas por un tratamiento químico. Ejemplos de este tipo de vacunas son: partículas de VIH completo inactivado, V3: Ty-VLP (V3 mas un producto transposon de levadura), P55 Gag, pseudoviriones

VIH-env ,gag y pol. Estas " vacunas muertas" son potencialmente más seguras que las vacunas de virus atenuados; sin embargo las vacunas muertas completas a menudo pierden la potencia en comparación con la inmunogenicidad del virus vivo que es larga, esto es debido al tratamiento usado para inactivar o destruir, ya que altera importantes antígenos protectivos. Para sobrellevar algunos de estos obstáculos, se han producido vacunas experimentales para SIDA de partículas parecidas a virus (VLP) o " pseudoviriones" por tecnología recombinante, expresando todos o una porción de uno o mas genes estructurales de VIH o VIS para mimetizar la expresión natural de la proteína viral. Sin embargo el pseudovirion no contiene el genoma de VIH, así que no puede producir progenie viral. La manufactura de estas VLP es compleja, y dada la variabilidad genética de VIH, estas vacunas pueden necesitar incluir productos génicos de múltiples cepas de VIH.

A la fecha, las vacunas de VIH completas muertas no tienen inmunidad en chimpancés contra la infección con el virus. Sin embargo los simios fueron protegidos contra VIS al ser inmunizados, con VIS inactivados, la protección fue debida a anticuerpos de líneas celulares humanas xenoantígenos presentes en la preparación de vacuna. Solo una vacuna de SIDA experimental de VLP ha sido probada, esta contiene solo una porción del core, sin envoltura, por lo que es mas parecida a una subunidad que a una partícula completa de VIH, bajos niveles de anticuerpos de unión específica VIH y respuesta celular de T de memoria fueron generados en los voluntarios después de tres o cuatro inmunizaciones. Sin embargo poca actividad de células citotóxicas específicas a la proteína gag fueron observadas (Adams SE,1987.Barnett,SW 1997. Kingsman AJ, 1995. Klein MR, 1997).

1.9.4 VACUNAS DE VECTORES VIVOS RECOMBINANTES

Las vacunas de vectores vivos recombinantes representan una estrategia nueva para el desarrollo de vacuna para VIH. Estas vacunas son producidas por ingeniería genética viral o de genomas bacterianos para expresar los antígenos deseados de VIH. Los vectores virales pueden ser construidos conteniendo uno o más genes virales para expresar la proteína codificada en forma nativa en las células infectadas. Estas proteínas son entonces presentadas al sistema inmune por la misma vía en que las proteínas de una célula infectada por virus son presentadas e induciendo ambas respuestas inmunes, celular y humoral.

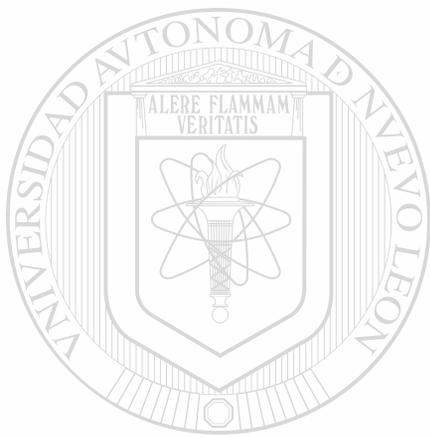
Los poxvirus (NYVAC, ALVAC, fowlpox, canarypox (Belshe R,1998) recombinantes fueron los primeros en utilizarse en primates no humanos, principalmente se ha utilizado al virus recombinante de vaccinia-VIH gp160 , canarypox -VIH gp 160 y canarypox -VIH gp 120. Muchos de estos virus han sido seleccionados por sus propiedades adyuvantes, tales como la expresión de citocinas pro-inflamatorias, que pueden aumentar la presentación antigénica y reconocimiento, estos virus inducen anticuerpos neutralizantes anti- VIH, sin embargo su eficacia ha sido evaluada pre-clínicamente en simios, donde se ha visto la existencia de un incremento en la inmunidad humoral y celular, pero la protección fue solo temporal. Por lo que se han buscado otras estrategias como la utilización de otros virus como: vaccinia (Belyakov I, 1998), influenza virus (Muster T, 1995), mengovirus, rinovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la polio, elegido por sus características biológicas inertes, la patogénesis del virus esta bien estudiada, el virus es naturalmente transmitido por vía feco-oral y es estable a las condiciones severas del tracto gastrointestinal, segundo estimula ambas respuestas inmunes, humoral y celular y tercero que las cepas atenuadas de poliovirus son seguras para humanos (Morrow CD, 1994). También se han utilizado bacterias vivas atenuadas como *Salmonella*, BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) y *Listeria*. (Aldovini A, 1990. Aldovini A, 1991. Burke KL, 1991. Caley IJ, 1997. Cooney EL,1991. Fleury B, 1996). Ambas respuestas humoral y celular han sido demostradas con este tipo de vectores, sin embargo recientemente se ha utilizado a bacterias comensales como *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* para la expresión de genes deseados, induciendo una buena respuesta inmune humoral y celular, con la característica principal de ser seguras.

1.9.5 VACUNAS DE ADN

En la inmunización con ADN, el hospedero es inmunizado por la administración directa de genes virales; estos genes codifican para los antígenos que normalmente pueden ser producidos por la célula infectada con el virus. Diversos experimentos de vacunas con ADN para VIH han sido producidos y probadas en animales pequeños y primates no humanos. En general, los resultados de estos estudios han sido prometedores. Las vacunas de ADN intramusculares o por un gen disparado han mostrado inducir respuesta inmune humoral y celular. El desarrollo de nuevos sistemas de expresión con promotores más potentes, con genes de citoquinas inmunomodulatorias, o moléculas coestimuladoras y con adyuvantes, están siendo evaluadas. Ejemplos de estas

vacunas son: gp160+ rev ADN, gag + pol ADN, gp 120 ADN y gp 160 ADN (Bagarazzi ML, 1997. Boyer JD,1997. Coney L, 1994. Fuller DH, 1996).

La siguiente tabla resume los candidatos a vacunas para VIH que estan siendo evaluados.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 3. Candidatos a Vacunas para VIH que Estan en Evaluación .

Candidato a vacuna	Desarrollada por:	Lugar	Fase
Subunidades			
rgp160	MicroGeneSys	USA	I
rgp160	Immuno AG	USA	I
rgp160	Pasteur-Merieux-Connaught	Francia	I
rgp160	U Libre de Bruxelles	Belgica	I
rgp120 (env 2-3)	Biocine	USA, Suiza	I
rgp120	SmithKline Beecham	Reino Unido	I
rgp120	Genetech/Vax Gen	USA, Tailandia	I, II, III
rgp120	Biocine/Chiron Vaccines	USA, Tailandia	I, II
Peptidos			
V3-MAPS, gag-lipopeptido	United Biomedical	USA, Tailandia, China, Australia	I
V3-PPD conjugado	Serum and Vaccine Institut	Suiza, Israel	I
V3-toxin-A-P.aeruginosa	Serum and Vaccine Institut	Suiza	I
HGP-30	Viral Technologies	USA, Reino Unido	I
V3, V3-p24(CLTB-36)	Pasteur-Merieux-Connaught	Francia	I
Mixed env	U Libre de Bruxelles	Bélgica	I
rV3 secuencias en simple peptido	Cuba	Cuba	I
rp24	Chiron Vaccines	USA	I
Partículas/Pseudoviriones			
Ty.24.VLP	British Biotechnology	USA, Reino Unido	I
Vectores vivos			
Vaccinia-rgp160	Institute Jaques Monod	Francia	I
Vaccinia-rgp160	Bristol-Myers Squibb	USA	I
Vaccinia-env/gag/pol	Therion Biologics	USA	I
Canarypox-rgp160	Pasteur-Merieux-Connaught	USA, Francia	I
Canarypox-env/gag/pol	Pasteur-Merieux-Connaught	USA	I
Canarypox-env/gag/proteasa	Pasteur-Merieux-Connaught	USA, Francia	II
ADN			
Env/rev	Apollon	USA	I
Gag/pol	Wyeth		I

CAPITULO 2

2.1 INMUNIDAD EN LAS MUCOSAS

La superficie de la mucosa en el tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital representa un área de amplia exposición a microorganismos. El tejido de la mucosa es defendido por un sistema inmune local con propiedades y funciones que en muchos aspectos están separados del sistema inmune sistémico (Holmgren J, 1992).

Un mayor entendimiento de los factores celulares y moleculares involucrados en la regulación de la inmunidad en mucosas, podría ayudar en el diseño de una vacuna en mucosas, que sea segura y que obtenga un efecto protector apropiado de la respuesta inmune a un patógeno dado. Las ventajas de la administración por mucosas son: más aceptables, no requiere un riguroso criterio aplicable para vacunas inyectables, los problemas de almacenaje pueden ser simplificados y grandes poblaciones de individuos pueden ser inmunizados simultáneamente sin la asistencia de personal especializado de salubridad (Mestecky J, 1992). Por lo que una vacuna disponible que induzca inmunidad o protección en mucosas e inmunidad sistémica a patógenos son de gran interés para combatir enfermedades infecciosas (Boyaka PN, 1999). También hay una gran necesidad por desarrollar estrategias para identificar adyuvantes que despierten una mayor respuesta inmune en mucosas (Osek J, 1995. McGhee JR, 1993).

El desarrollo de vacunas orales contra infecciones entéricas como las causadas por *Escherichia coli*, *Shigella* y rotavirus, están en progreso. Recientemente una vacuna oral eficiente que induce inmunidad pro SigA intestinal contra el cólera, se ha desarrollado, las dosis repetidas de la vacuna a menudo son requeridas para lograr una respuesta inmune protectora. (Holmgren J. 1999)

Sin embargo la eficiencia de inducción de una buena respuesta humoral en mucosas a través de una vacuna oral es dependiente de las propiedades fisicoquímicas del antígeno, el ambiente gastrointestinal, la presencia de adyuvantes, y el modo de liberación. El entendimiento de como estos factores interactúan es crítico para el desarrollo de nuevas vacunas orales (Shalaby WS. 1995).

2.1.1 LA MUCOSA COMO PRIMER DEFENSA

El epitelio mucoso es el sitio principal de entrada de antígenos inhalados o ingeridos, a pesar de consistir de una sola capa celular el epitelio intestinal debe controlar el acceso de antígenos potenciales y patógenos; y al mismo tiempo funcionar en la absorción digestiva de nutrientes. El epitelio intestinal también tiene adaptaciones protectoras especializadas que no se encuentran en otros sitios, las cuales incluyen péptidos antimicrobianos (Defensinas) (Ayabe, T. 2000), Inmuno-globulina A secretoria (Macpherson, A.J. 2000) , mucinas y péptidos trefolies. (Podolski, D.K. 1999). La superficie apical del enterocito, la cual da al lumen intestinal, esta situada para la digestión final de nutrientes debido a una densa capa de microvillis absorbentes. En la punta de estos microvillis, una capa de glicoproteínas forman el glucocalix. La existencia de una célula epitelial especializada llamada célula M utiliza el transporte vesicular transepitelial para llevar microbios a las células presentadoras de antígeno (APC) en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Las células M están contenidas en sitios inductivos en el GALT, conocidos como placas de Peyer, las cuales son agregaciones de folículos linfoides encontrándose principalmente en el ileon del intestino delgado (Nagler 2001), los antígenos son transportados de la mucosa a los nódulos linfáticos y presentados a las células T en los nódulos. Las células sensibilizadas por el antígeno migran fuera del nódulo por vasos linfáticos eferentes y entran a circulación sistémica a través del conducto torácico, generando así una respuesta inmune. (Fig. 9).

2.1.2 RESPUESTA INMUNE HUMORAL

La IgA secretoria (SIgA) es la inmunoglobulina predominante en la mucosa, y los anticuerpos IgA generados en la mucosa gastrointestinal, respiratorio o genitourinario pueden conferir protección contra infecciones originadas en ese sitio. La producción de Inmunoglobulinas típicamente requiere células T cooperadoras, estas células están divididas en dos sub-grupos funcionales sobre la base del patrón de secreción de citocinas. En general las células Th1 producen Interferón- γ (INF- γ), el cual es importante para la respuesta inmune mediada por células e inflamación. Las células Th2 secretan interleucina (IL) 4, IL-5, y IL-13, e inducen la activación y diferenciación de células B. Otro factor importante es el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y su receptor tipo II sobre las células B, el cual es vital para el cambio de clase a IgA. En conclusión las citocinas Th2 controlan la diferenciación de células B en células

plasmáticas para la producción e anticuerpos (Van Ginkel, F.W. 1999). El papel de la IgA secretoria es excluir antígenos del epitelio, recientemente se ha sugerido el papel de que la IgA utiliza el pIgR para transportar activamente antígenos fuera de la lamina propia a la superficie apical del enterocito. (Robinson J.K. 2001).

Recientes reportes muestran que la administración pasiva de anticuerpos IgG neutralizantes previenen la transmisión del VIH en simios y en simios neonatos, sugiriendo una estrategia clínica contra la transmisión del virus por medio de la madre al infante. (Marjorie,R. 2000). En un estudio similar se muestra la protección de simios contra la transmisión vaginal de un virus quimérico VIH-1 /VIS por medio de la administración pasiva de anticuerpos neutralizantes. (Mascola,J.R. 2000).

2.1.3 RESPUESTA INMUNE CELULAR

El sistema inmune celular de la mucosa intestinal esta compuesto de 3 áreas linfoides principalmente, 1) los LP (linfocitos de lámina propia), los cuales se encuentran por debajo de la membrana basal, estos linfocitos son células plasmáticas secretorias de IgA y células T efectoras de memoria. 2) el compartimiento intraepitelial, que contiene los linfocitos intraepiteliales (IEL), localizados en la membrana basal y entre la columna de células epiteliales y 3) Placa de Peyer (PP), nódulos linfoides embebidos en la pared intestinal, los cuales presentan células B y centros germinales que están rodeados por linfocitos T, separados de las IEL y los LP. (Fig.9). Los LP y PP contienen grandes cantidades de células B, el resto de linfocitos T invariablemente son predominantemente CD4+. En contraste las IEL son predominantemente CD8+. Estas poblaciones linfoides (IEL,LP,PP) forman un complejo interconectado que responden inmunológicamente en el intestino.

Los linfocitos de LP y PP continuamente recirculan en la sangre y en el sistema linfático, de este modo hay un cambio considerable entre los linfocitos intestinales y el sistema linfoide periférico. Por el contrario los IEL sufren una mínima recirculación, sugiriendo que su función es limitada al área (Poussier,1992).

Un aspecto interesante es que los linfocitos de lámina propia expresan marcadores de superficie asociados con un estado activado, también se ha visto que producen cantidades significantes de interleucina (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-10 e Interferón γ . Por otro lado se ha descubierto un grupo de progenitores de células T, a lo largo del intestino delgado y grueso en las criptas de la lámina propia, sugiriendo que el epitelio

intestinal puede ser único en su habilidad para funcionar como un importante sitio para la maduración extratímica de una población de células T. (Suzuki,K.2000).

Estas criptas son indispensables para el desarrollo independiente de timo de los linfocitos intraepiteliales (IEL), una subpoblación de células que reside entre las células epiteliales por encima de la base de la membrana, esta maduración pudiera ser dada por medio de la secreción de IL-7 que producen los enterocitos. Otra característica importante es la expresión preferencial del homo dímero $CD8\alpha\alpha$, en las células T, en lugar del hetero dímero $CD8\alpha\beta$ que es expresado por las células $CD8+$ en otros sitios, lo cual los identifica como IEL derivados extratímicamente, sin embargo no se ha obtenido evidencia del papel funcional de estos IELs.

Recientes estudios han mostrado que las células de memoria efectoras $CD8+$, generadas como el resultado de infección bacteriana o viral, se acumulan en tejidos no-linfoides, particularmente en la lamina propia, esperando el próximo reto antigénico. (Masopust,D. 2001). Estas células son distinguidas de las células de memoria central encontradas en órganos linfoides por la expresión tardía del receptor de quimosinas CCR-7. Otros trabajos identifican a otros receptores de quimosinas como TECK y CCL25 y su ligando CCR9 como reguladores de la migración específica de tejido. CCR9 esta presente virtualmente sobre todos los linfocitos $CD4+$ y $CD8+$ en el intestino delgado, sugiriendo que estos receptores dirigen la migración de los linfocitos de memoria a lamina propia del intestino delgado. Por lo que la habilidad de GALT para responder rápida y efectivamente a patógenos entéricos es aumentada por la acumulación de células T efectoras de memoria en este sitio. (Papadakis, K,A.2000).

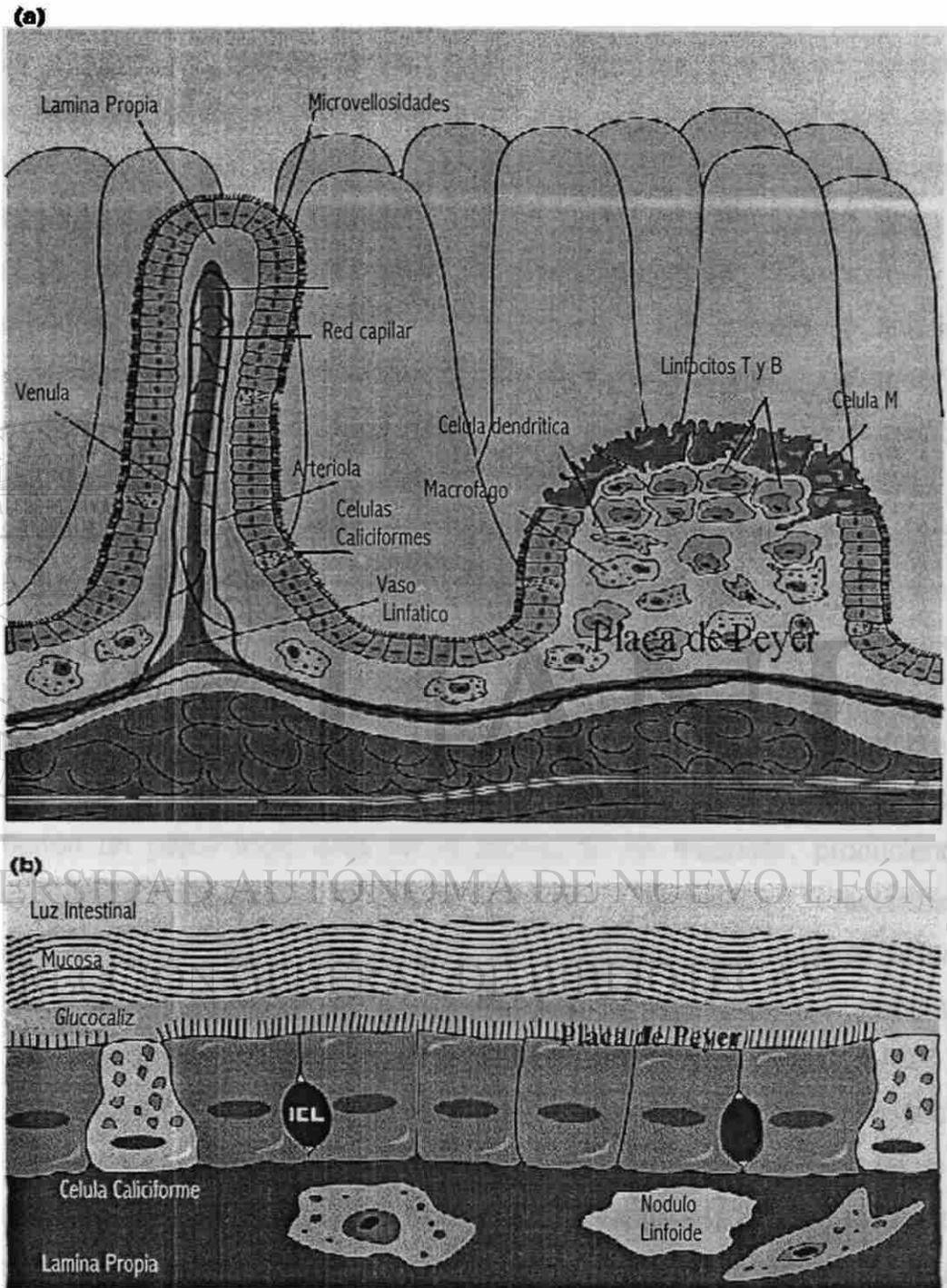


Fig 9. Sistema Inmune en Mucosas.

2.2 INTERACCIONES DE LAS BACTERIAS CON EL EPITELIO GASTROINTESTINAL

Un complejo y dinámico ecosistema microbiano habita el intestino humano, una región específica del intestino grueso puede contar con más de 400 especies bacterianas diferentes. La mucosa es sólo la primer línea de defensa y está en estrecha comunicación con el sistema Inmune sistémico. Así, los microorganismos que sobreviven a la interacción inicial con las defensas locales del hospedero usualmente activan otras defensas inmunes protectoras.

El epitelio intestinal debe ser capaz de discriminar entre flora normal y patógenos entéricos. Las bacterias patógenas poseen un proceso adaptativo altamente especializado que les permite el acceso al epitelio intestinal y causar daño, para esto un paso necesario es la colonización y la adherencia a la superficie hospedera, un ejemplo de estos son los factores de virulencia. Generalmente la adherencia de la bacteria a la superficie hospedera es necesaria para la resistencia del flujo del contenido del fluido luminal y la peristalsis de las contracciones intestinales. Esta adhesión se lleva a cabo por medio de una amplia variedad de glicoproteínas y glicolípidos presentes en la célula hospedera.

Un aspecto de gran interés es que solo por sus números la flora nativa interfiere con la colonización de patógenos, compitiendo por: nutrientes, sitios de colonización, sitios que tienen un papel importante en la protección en mucosas, produciendo componentes antimicrobianos naturales como lactocinas, lactacinas, nicinas, helveticinas, curvacinas y bifidocinas, metabolizando nutrientes en ácidos grasos volátiles, y ácidos biliares modificados químicamente que crean un ambiente local que es infavorable para el crecimiento de patógenos entericos. (Lei Lu 2001).

Sin embargo los patógenos tienen la habilidad para interactuar con la célula huésped y causar daño, esto es por medio de mecanismos específicos de cada especie, por ejemplo algunos se adhieren a células que no son fagocíticas y por medio de receptores transmiten señales que pueden romper el citoesqueleto y entrar a la célula blanco. (Fasano, A. 1998), como es el ejemplo de *E. coli* enteropatógena (EPEC) la cual se adhiere a la superficie del epitelio intestinal por la destrucción del microvilli y reareglan la actina del citoesqueleto para formar un pedestal sobre la superficie celular del hospedero. Tomando lo anterior en cuenta un aspecto importante en cuanto a la

interacción de las bacterias con el epitelio es la respuesta inmune montada contra éstas, y como GALT puede distinguir patógenos de comensales, montando una débil respuesta hospedera contra comensales y en respuesta a invasión microbiana, montar una fuerte respuesta inmune. Gran parte de esto se debe a los genes de virulencia, los cuales facilitan su colonización, invasión y subsecuente supervivencia intracelular. Las bacterias patogénicas inducen una respuesta protectora del huésped por la activación de un sistema de reconocimiento de patrones primitivos conservado evolutivamente. Una clase de sistema de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) fue identificado como el receptor Toll en *Drosophila*, su contraparte en mamíferos son los receptores parecidos a Toll (TLRs). La señalización por TLRs puede inducir la sobregulación de moléculas co-estimuladoras que proveen una segunda señal para la activación de células T. Sin embargo los elementos estructurales microbianos esenciales que son reconocidos por los TLRs son comunes en las bacterias comensales y en los patógenos. El por que las bacterias comensales no activan el sistema inmune innato, posiblemente se debe a que la mayor parte de estas bacterias no tienen acceso a las placas de Peyer, ellas permanecen atrapadas en la capa mucosa, bloqueadas por la barrera física dada por las glicoproteínas y glicolípidos (Nagler 2001).

2.3 EL PAPEL DE LA MUCOSA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL EN LA TRANSMISIÓN DE VIH.

Excluyendo las infecciones adquiridas parenteralmente, virtualmente las infecciones de VIH son adquiridas vía mucosa gastrointestinal y tracto genital. (Smith PD. 1999). Para la mayoría de las transmisiones heterosexuales, la mucosa del tracto genital es el sitio de entrada viral, para la transmisión vertical e infecciones resultantes por contacto oral-genital y anal-genital, la mucosa del tracto gastrointestinal es el portal de entrada del VIH. Durante la transmisión vertical, la mucosa gastrointestinal es el sitio de entrada del VIH como consecuencia del paso de fluido amniótico en utero, sangre infectada, secreciones cervicales Intrapartum y leche materna infectada postpartum. (Newell ML. 1998). En homosexuales, la transmisión por el contacto oral-genital ha demostrado ser mas comun que por el contacto anal-genital, sugiriendo que la mucosa del tracto gastrointestinal es el sitio mas común de entrada del VIH. En ausencia de

uno de los factores de entrada del virus en la mucosa como lesiones, traumas o infecciones, las rutas propuestas para la entrada del virus a la lamina propia, rica en células mononucleares, están las células especializadas M del epitelio, las células dendríticas y células epiteliales. En estudios recientes se demostró que las células M de ratón en un sistema ex vivo son capaces de transportar el VIH a las células mononucleares. (Amerongen HM, 1991). Por otro lado las células dendríticas son altamente eficientes presentadoras de antígeno que expresan CD4 y recientes estudios indican que las células dendríticas se unen a la glicoproteína gp 120 del VIH a través de una lecitina tipo C, permitiendo la captura del VIH (sin infección) para su subsecuente presentación a las células T y diseminación a órganos linfoides secundarios. (Geijtenbeek THB, 2000). Las células epiteliales son el linaje celular más abundante de la mucosa intestinal y del colon y son un conducto potencialmente importante para la entrada del VIH. Un reciente estudio de la translocación en mucosa del VIH usando células epiteliales mostró que el VIH puede ser translocado a través de una delgada capa de células epiteliales por una vía transitoria, a través del principal receptor expresado en estas células, el galactosil ceramida (Gal-Cer), en adición estas células también expresan el coreceptor para macrófagos CCR 5, utilizado por el VIH. (Bomsel M, 1997). Veazey et al, demostró que durante los primeros días de la infección de VIS (virus de la inmunodeficiencia en simios) en macacos, los macrófagos infectados eran raros, y que las células T infectadas eran más las presentes en la mucosa intestinal que en la sangre. Dado que el virus se replica más eficientemente en células T activadas y a la gran abundancia de células T CD4 activadas en la lamina propia que en la sangre. Después de 7-14 días de infección, las células T CD4 de la mucosa colónica e intestinal son rápidamente depletadas, probablemente a consecuencia de lisis celular y apoptosis, ocurriendo este proceso principalmente en lamina propia. Interesantemente la alta carga viral en la mucosa intestinal está asociada con la atrofia del villi y mala absorción, consistente con la enteropatía inducida por el VIS. Deduciendo que, la lamina propia es el principal sitio de replicación y amplificación del virus. Por lo que la inmunosupresión local inducida por la depleción de células T predispone a la mucosa del tracto gastrointestinal a las infecciones oportunistas, llevando a la inflamación de la mucosa y a la liberación de péptidos quimioattractantes que reclutan monocitos y linfocitos, los cuales sirven como un nuevo blanco para la perpetuación de la replicación local del virus. (Janoff, N E, 2001).

CAPITULO 3

3.1 USO DE BACTERIAS COMO VEHICULOS PARA VACUNAS

El termino vacuna refiere a la preparación de organismos vivos, atenuados o sus constituyentes antigénicos, formulados para estimular la inmunidad específica. Las vacunas usan cepas patogénicas atenuadas que producen una infección leve y monta una fuerte respuesta inmune sin los síntomas que acompañan a la infección con el agente infeccioso silvestre, como es el caso del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) derivado de una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* y es usado para la prevención de tuberculosis. Las vacunas de organismos vivos generalmente inducen una fuerte y mas duradera inmunidad que las vacunas de atenuados o subunidades. En general muchas vacunas de agentes atenuados requieren solo una dosis de inmunización para crear inmunidad. En contraste, las vacunas de subunidades o agentes muertos tienden a requerir múltiples dosis para una adecuada respuesta y dosis regulares aumentadas para el mantenimiento de la inmunidad (Pirofski, L 1998).

Una importante aspecto a considerar en el uso de vacunas con vectores vivos es el riesgo que presenta la naturaleza del organismo, mutaciones que provoquen una reversión y causar una enfermedad en el hospedero, a pesar de su eficacia, sobretodo en pacientes inmunocomprometidos, donde el sistema inmune determina la magnitud del riesgo asociado con una vacuna en particular. La posibilidad de que un patógeno vivo atenuado a reducir la función base del sistema inmune es otra importante consideración en pacientes inmuno-comprometidos. Teóricamente, la administración de una vacuna viva puede aumentar o disminuir la inmunidad persistente.

Actualmente se están utilizando organismos vivos recombinantes como vacunas para la prevención de diversas enfermedades bacterianas y vírales. Entre los virus más utilizados, están: *canary pox*, *vaccinia*, *adenovirus*, etc. también se han empleado bacterias entre las cuales destaca *Sallmonella* y *Shigella* , *E.coli*, y actualmente se han propuesto más como *Francisiella*, *Cholera*. El agente vivo más utilizado es *Sallmonella typhi* , para prevenir la fiebre tifoidea, otro ejemplo es el virus *vaccinia* que fue utilizado ampliamente para la prevención de la viruela , y esta ha sido discontinuada con la erradicación de la enfermedad. Sin embargo estos organismos no dejan de representar un riesgo, por lo cual la investigación se ha dirigido mas hacia organismos que sean inocuos o de poco riesgo para huésped como es el caso de las bacterias comensales como las bacterias lácticas (Pirofski, L 1998.).

Los vectores bacterianos presentan 6 ventajas: 1) su producción no es cara, 2) son de fácil administración, (Curtiss 1987, Hone 1991, Izhar 1990) 3) las cepas atenuadas son desarrolladas para no revertir, 4) generalmente son desarrolladas para su uso en humanos y son sensibles a antibióticos, así que si hay una reacción adversa es posible el uso de antibióticos, 5) pueden ser administrados oralmente, lo que es práctico y confiable para los programas de vacunación, 6) el tropismo de los vectores bacterianos por células dendríticas y macrófagos en el tejido linfóide de mucosas, los dirige a esos sitios. (Angulo, F 1995. Baddour, L.M. 1989. Cano, F. 1999. Chatfield, S.N. 1992. Farber, J.M. 1996. Ogra, P.L. 1980. Takeuchi, A. 1967)

Los vectores se pueden dividir en dos principales categorías: los que están basados en patógenos atenuados como *Salmonella*, *Shigella*, BCG y *Bordetella*, etc. y los que están basados en bacterias comensales como *Lactococcus*, *Lactobacillus* o ciertas cepas de *Stafilococcus* y *Streptococcus*. Sin embargo dependiendo del vector utilizado y el sitio de liberación la calidad de la respuesta inmune varía ampliamente. Algunos de los que han sido estudiados extensamente son:

3.1.1 PATÓGENOS ATENUADOS:

Bacilo Calmette-Guérin

El BCG es una cepa de *Mycobacterium bovis* y ha sido utilizada como vacuna para la tuberculosis, como vacuna es segura en humanos y tiene una gran capacidad de aceptar fragmentos de DNA extraños (Lugosi, L. 1989), además de que ambas inmunidades humoral y celular son estimuladas (Matsumoto, S. 1998). En un experimento reciente se demostró que ratones inmunizados con un vector BCG, el cual expresa el fragmento C-terminal de la proteína de superficie 1 del merozoito de *Plasmodium yoelii* (MSP1) exhibía un mayor grado de inmunidad protectora contra la infección parasítica que en otro experimento realizado con la proteína fusionada al adyuvante RIBI o al incompleto de Freund. Sin embargo la vacuna rBCG-MSP1 no induce niveles detectables de anticuerpos específicos contra MSP1, ni células que secreten INF- γ específico a MSP1 en los bazo de ratones inmunizados. Cuando los ratones vacunados fueron retados con eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii*, se observó una rápida respuesta de anticuerpos IgG específicos, por lo que estos hallazgos sugieren que la protección observada fue dependiente de las células cooperadoras tipo 1 de memoria específicas a MSP1 (TH1). Y que el vector es capaz de inducir inmunidad humoral contra un patógeno protozoario.

En otro estudio de fase II (Edelman ,R. 1999) se muestra la inmunización intradérmica de 24 adultos saludables con un vector rBCG que expresa la proteína de superficie A de *Borrelia burgdorferi* (rBCG-OspA), en la cual no se detectaron anticuerpos específicos en suero, por lo que no está claro el porque esta vacuna fallo para inducir la respuesta humoral al antígeno en humanos, como lo hizo en ratones, sin embargo los resultados indican la seguridad del vector (Langemann,S. 1994).

Listeria monocytogenes:

Listeria tiene la habilidad de inducir la respuesta de células T citotóxicas (Schafer,R. 1992. Shen ,H. 1995). Schafer y cols. en un estudio generó un prototipo de un vector con *Listeria* que expresa el gen de la galactosidasa (β -gal) de *E. coli* , la inyección de ratones con esta construcción oral o intraperitonealmente induce células T citotóxicas específicas a β -gal capaces de lisar células tumorales que expresan β -gal. Sin embargo el nivel de expresión de β -gal por el vector fue solo marginal. Consecuentemente el nivel de células T citotóxicas fue bajo y requiere varias semanas de estimulación in vitro.

Subsecuentes estudios sugieren que el nivel de expresión del antígeno extraño y el lugar de expresión en el vector pueden influenciar la magnitud de la respuesta inmune en este tipo de vectores. (Goossens,p.L.1995. Ikonomidis,D. 1994). Un aspecto importante es el encontrado en un experimento realizado con el vector de *Listeria* contra el virus de la coriomeningitis linfocítica, en el cual se generó una fuerte respuesta celular contra el antígeno, por lo que puede causar un severo daño en mujeres embarazadas , recién nacidos e individuos inmunocomprometidos (Angulo, F.J. 1995. Farber,J.M.1996). Recientemente se han desarrollado estrategias de atenuación para resolver este problema. (Dietrich,G. 1998), una estrategia es la propuesta por Dietrich et al. que desarrolló un vector con *L. monocytogenes* atenuado y con secuencias que codifican para endolisina bajo el control de un promotor inducido, seguido por la infección el promotor es activado y resulta en la expresión de endolisina y lisis del vector bacteriano. Esta estrategia atenúa el vector y permite la transferencia y expresión de un plásmido reportero en células infectadas, no se ha reportado la inmunogenicidad de este sistema.

Salmonella :

El avance mas reciente es el desarrollo de vectores de vacunas basados en *Salmonella* (Paglia,P. 1998). Los vectores de *Salmonella* tienen la habilidad de inducir una fuerte respuesta inmune celular, debido a que la bacteria permanece en el compartimiento endosomal de las células infectadas, (Fig.10). Gentschev et al. modificó genéticamente a *Salmonella* para expresar la listeriolisina O (*Llo*) de *L. monocytogenes*, este vector mimétiza el tropismo intracelular de *L. monocytogenes* aumentando la capacidad de este vector para inducir una respuesta celular , resultando en una mejor protección mediada por célula T CD8 contra *Listeria* , esta estrategia fue comparada con una construcción análoga que expresa *Llo* en el citoplasma del vector y permanece unida al fagosoma (Hess,J.1996).

Darji et al. Inmunizo ratones oralmente con una sola dosis de *S. typhimurium* aró mutante portando el gen *lac Z* de *E. coli* bajo el control de un promotor inmediato de Citomegalovirus . Este vector dio grandes niveles de anticuerpos específicos para β -galactosidasa, proliferación de células T y respuesta de T citotóxicas. En el mismo estudio, la vacunación oral del vector de *Salmonella* portando el gen *Llo* de *Listeria* bajo el control de un promotor de citomegalovirus , induce la respuesta humoral y celular contra *Llo* , resultando en la protección contra *L. monocytogenes*. (Darji, A., 1997) .

Un reciente estudio se encontró que el vector de *Salmonella* induce protección contra una línea celular de fibrosarcoma que expresan *lac Z*. Los ratones vacunados adquirieron anticuerpos séricos específicos contra β -gal y una buena respuesta de T citotóxicos, teniendo una buena resistencia al retarlos con la línea celular de fibrosarcoma *lacZ+*. (Paglia,P.1998). También se han probado los vectores de *Salmonella* que expresan la proteína gp 120 induciendo números similares de células T CD 8 específicas a HIV- 1, comparadas con las inducidas por vacunas de DNA con gp 120 administrada intramuscularmente. (Shata M.T.,no publicado).

Shigella:

Shigella como vector tiene poca atención por su patogenicidad, sin embargo con la atenuación de esta, la ha hecho mas favorable, (Kotloff, K.L. 1996. Noriega, F.R. 1994. Phalipon,A.1995). *Shigella flexneri* tiene las propiedades de: que eficientemente escapa del endosoma y accesa directamente al citoplasma de la célula hospedera (Fig.10) y es blanco natural de tejido linfoide en la mucosa del colon, por lo que induce una respuesta inmune celular y humoral.

A la fecha no ha sido reportado el uso de *Shigella* como vector para inducir células CD 8 contra un antígeno extraño, sin embargo *Shigella* atenuada de los primeros vectores bacterianos empleados para liberar vacunas de DNA (Powell,R.J. 1996) , el desarrollo de *Shigella* como vehículo para liberar DNA plasmídico en células hospederas fue inicialmente hecho en mutantes de *S. flexneri* que son deficientes en síntesis de pared celular (Sizemore, D.R. 1995), en este estudio la cepa mutante es dependiente de ácido diaminopimelico (DAP) para la replicación, debido a la mutación en el gen *asd* ($\Delta.asd$). Durante la infección, la cepa mutante es deficiente de DAP y debido a esta inhabilidad de sintetizar la pared celular, rápidamente sufre auto lisis dentro de la célula hospederas. Sizemore y cols. demostraron la liberación del plásmido reportero p CMV β de *lacZ* para la expresión de este gen codificado en el vector en células humanas. Bajo el control de un promotor de SV40. (Powell,R.J.1996) , demostrando que *Shigella* es capaz de liberar genes de expresión eucariótica en células hospederas.

Un número limitado de estudios de inmunogenicidad con vacunas de DNA con *Shigella* se han reportado, el primer reporte mostró que los esplenocitos cosechados de ratones vacunados con dos inmunizaciones intranasales de *S. flexneri* $\Delta.asd$ llevando pCMV β -gal, muestra un aumento en anticuerpos séricos específicos para β -gal y proliferación de células T. (Sizemore, D.R. 1997). Estos hallazgos fueron empleados por Fennelly et al. para liberar una vacuna de ADN que lleva una proteína de envoltura del virus del sarampión bajo el control de un promotor inmediato de citomegalovirus, mostrando anticuerpos séricos específicos para la proteína de envoltura y proliferación de células T , estos investigadores también demostraron que los ratones desarrollaron actividad de células citotóxicas específicas para la proteína (Fennely,G.J. 1999).

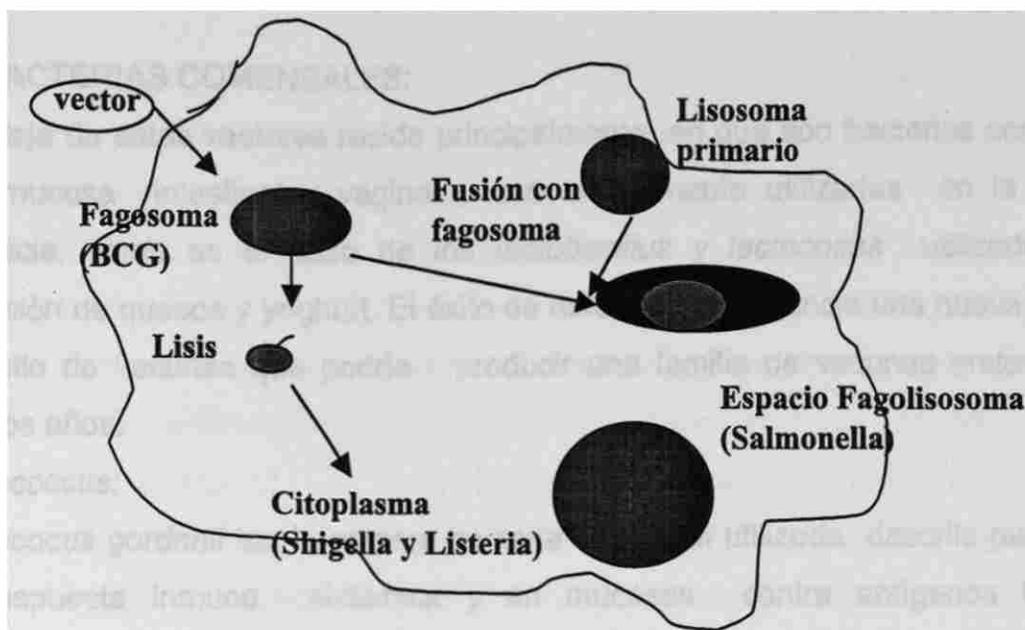


Fig 10. Tropismo intracelular de vectores de BCG, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Shigella*. BCG permanece en un fagosoma temprano y previene la fusión con el lisosoma, mientras que *Salmonella* promueve el desarrollo de un espacio fagolisosoma después de la fusión con el lisosoma primario, *Listeria monocytogenes* y *Shigella*, por otro lado lisan el fagosoma y entran al citoplasma de la célula hospedera.

Bordetella pertusis

Bordetella pertusis es un patógeno respiratorio que da una fuerte respuesta inmune humoral. (Tomoda,T.1990) y celular (Gearing, A,J.H.1989) en humanos. Antígenos heterólogos han sido expresados en *Bordetella pertusis* usando un sistema en el cual los filamentos de adhesión de *B. Pertusis* (FHA) sirven para portar los antígenos extraños en la superficie de la bacteria. Se ha observado un débil incremento en el total de IgE en el fluido bronqueo alveolar (Renauld-mongénie,G. 1996.), así como en las citocinas inflamatorias (Remoué,F, 1997) bajo la administración oral de *B. pertusis* recombinante. Las citocinas como el factor de necrosis tumoral α , interleucina 6 y factor de crecimiento transformante β , fueron producidos en los pulmones y desaparecieron después de una semana, sin embargo no hay que olvidar que el uso de esta bacteria como vector requiere atenuación, ya que el principal factor de virulencia de este microorganismo es la toxina.

Interesantemente, la respuesta de anticuerpos contra la FHA fue aproximadamente 5 veces mayor en ratones inmunizados con la cepa atenuada, comparada con los ratones que fueron infectados con una cepa no atenuada. Esta observación indica que la atenuación genética puede resultar en un aumento en la inmunogenicidad. Este vector se ha utilizado recientemente para inducir Inmunidad contra *Neisseria meningitidis* en niños.

3.1.2 BACTERIAS COMENSALES:

La ventaja de estos vectores reside principalmente en que son bacterias comensales de la mucosa intestinal y vaginal y son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, como es el caso de los *Lactobacillus* y *Lactococcus* utilizados en la producción de quesos y yoghurt. El éxito de este método anuncia una nueva era en el desarrollo de vacunas que podría producir una familia de vacunas orales en los próximos años.

Streptococcus:

Streptococcus gordonii fue la primera bacteria comensal utilizada descrita para inducir una respuesta inmune sistémica y en mucosas contra antígenos liberados. (Medaglini, D. 1995). Es un miembro de la flora normal de la cavidad oral (Frandsen, E.V.G.1991) y en contraste a *Lactobacillus* y a *Lactococcus* es capaz de colonizar efectivamente la superficie mucosa (Medaglini, D.1997), incluyendo la cavidad nasal (Oggioni, M.R.1995). Antígenos recombinantes han sido expresados sobre la superficie de *Streptococcus pyogenes* por fusiones genéticas con la proteína de anclaje a pared M6 (Pozzi, G.1992). También se le ha fusionado a la proteína E7 del virus 16 de papiloma humano, inmunizando ratones por vía intranasal, obteniendo una eficiente colonización (Oggioni, M.R.1995) e induciendo una buena respuesta de anticuerpos IgG séricos específicos al antígeno. *S. gordonii* parece ser un vector prometedor para la liberación intranasal de antígenos extraños, sin embargo hay que considerar que *S. gordonii* también ha sido asociado con enfermedades, tales como caries dental (Guggenheim, B. 1968) y endocarditis humana (Baddour, L.M. 1989).

Staphylococcus

Los estafilococos no patogénicos como *S. xylosus* (Nguyen, T.N.1993) que son bacterias comensales de la piel (Schleifer, K.H.1975) y *S. carnosus* (Samuelson, P. 1995) han sido identificados por su habilidad de presentar proteínas heterólogas en superficie, además son ampliamente utilizados en la industria de la carne y pescado (Schleifer, K.H.1982). *S. carnosus* se ha utilizado como modelo para producir la proteína albúmina unida a la superficie de la bacteria, resultando en una buena respuesta de anticuerpos específicos a dicha proteína. Sin embargo cuando la cepa co-produjo el dominio B3 de la proteína B de fibronectina unida a *S. disgalacticae* la respuesta fue incrementada en uno o dos órdenes de magnitud.

Interesantemente otros dominios de la proteína de fibronectina no aumentan la respuesta inmune, sugiriendo que el dominio B3 puede prolongar la persistencia de la

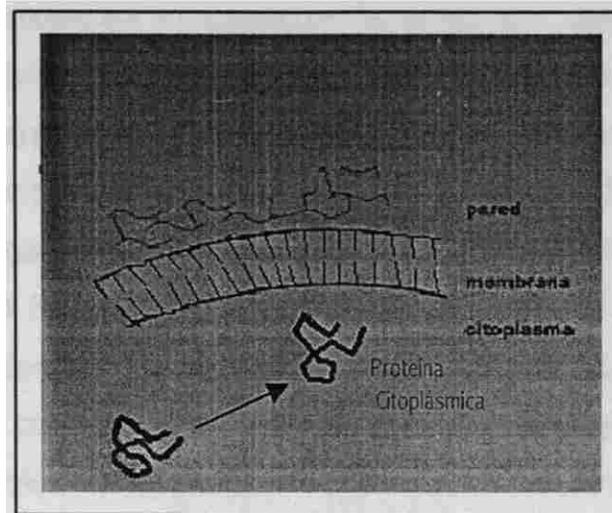
bacteria recombinante. (Liljeqvist,S.1999). También se detectó un aumento en la respuesta de anticuerpos a la albúmina cuando la subunidad B de la toxina del cólera fue co-expresada en la superficie de *S. carnosus*.(Cano,F.1999).

3.1.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

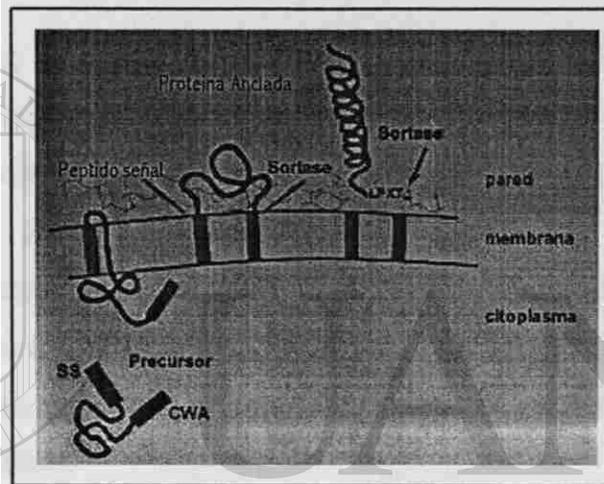
La ventaja de las bacterias lácticas como vectores para vacunas radica en que son bacterias comensales de la flora normal en mucosas y son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia. Principalmente se han considerado a las del genero de *Lactobacillus* conocidas por sus propiedades probióticas, inmunoadyuvantes e inmunomodulatorias (Mercenier,A. 1999), baja inmunidad intrínseca (Pouwels PH, 1998) y que algunas especies pueden colonizar las superficies de la mucosa (Pouwels, P.H.1996), las cuales las hacen atractivos candidatos para propósitos de vacunación oral. A pesar de las características que los definen como vectores ideales para vacunas, su capacidad de generar una respuesta inmunogénica depende de la cepa, del antígeno y de la vía de administración utilizados. Esto se comprobó en un estudio con diferentes especies de *Lactobacillus* bajo condiciones de Inyección intraperitoneal u administración oral de gamma globulina de pollo en diferentes modelos experimentales con *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. delbrueckii*, observando altas respuestas inmunes y una significativa adyuvancia para las dos primeras cepas y una baja respuesta para las cepas restantes, siendo la respuesta incrementada cuando se administro por vía oral. (Pouwels PH 1996). Otra característica analizada de las bacterias ácido lácticas es su capacidad para inducir memoria inmunológica, esto se demostró por la administración oral de *Lactobacillus* trinitrofenilizado (TNP) por la determinación de anticuerpos en suero. (Gerritse K,1990). También se han obtenido resultados muy satisfactorios con *Lactococos lactis* (Robinson, K. 1997), debido a que la bacteria no coloniza la superficie de la mucosa. *L. lactis* esta siendo desarrollado como un sistema de liberación de antígenos para vacunas en mucosas, la inoculación en mucosas de la cepa recombinante resulta en una respuesta de anticuerpos en suero y producción de IgA en el sitio de la mucosa (Norton PM, 1995).

Estos vectores se han utilizado para sobre expresar proteínas heterólogas, secretadas, intracelulares o ancladas a la pared celular (Fig.11). Entre estas proteínas se encuentran las de interés terapéutico, antígenos, enzimas (Straus,A. 1996), inmunoglobulinas (Gunneriusson, E.1996), peptidos con actividad antimicrobiana, peptidos activos biológicamente (gelatina, proteína de pescado, proteínas de la leche), interleucinas, probióticos, etc.

a)



b)



c)

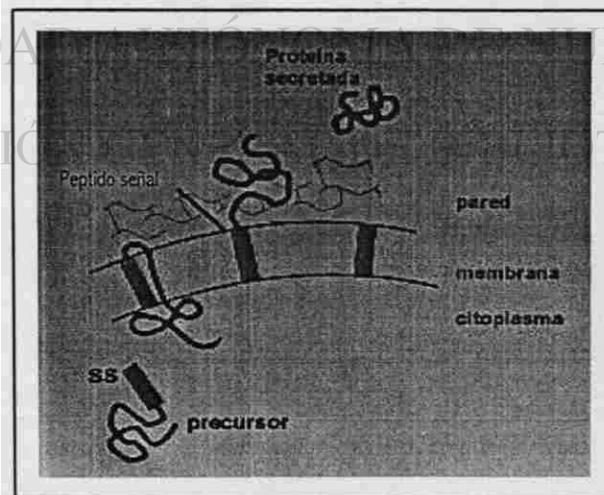


Fig 11. Sistemas de Expresión de Proteínas en Bacterias Lácticas. a) Proteína citoplasmática, b) Proteína anclada a pared, c) Proteína secretada.

Específicamente los géneros *Lactobacillus* y *lactococcus* se han utilizado como vectores para la expresión en su superficie de antígenos derivados de *Chlamydia psittaci* (Turner MS, 1999), como vectores de expresión de proteínas heterólogas de patógenos como el ántrax , con una administración segura (Zegers ND,1999), en la producción de citocinas como IL-2 o IL-6 (Steidler,L.1998), IL-10 (Steidler,L. 2000), en la expresión de la toxina del tétanos (Grangette, C 2000), la toxina difterica (Fromen, RC. 1999).También se ha demostrado su función en el tracto gastrointestinal como inactivador de la carcinogénesis y prevención de daño al ADN en colon de ratas (Wollowski,I 1999), así como el efecto antitumoral en cáncer superficial de vejiga (Aso, Y. 1992), y en la reducción del riesgo de infección por VIH en mucosa vaginal (Van de Wijgert, J. 1996).

Las vacunas en mucosas por vectores recombinantes son aparentemente seguras y efectivas, debido a que inducen una buena respuesta humoral (Mercenier,A. 1999). y celular, así como la expresión de citocinas proinflamatorias (Th1) , TNF-alfa , IL-1 e IL-2 (Maassen,C. 2000).

Debido a que muchos microorganismos causan importantes enfermedades en mucosas, y con una vacunación sistémica usualmente no se da una buena respuesta inmune, los vectores de bacterias lácticas son los vectores ideales para vacunas en mucosas. (Rush Cm, 1994).

Tabla 4 . Proteínas Heterologas Expresadas en Bacterias Lacticas

<i>L. lactis</i>	Fragmento C de la Toxina tetanica	Proteína Intracelular con Inmunogenicidad	1997 Norton, Wells, Le Page. Cambridge, Reino Unido
	Fragmento C de la Toxina tetanica	Proteína Intracelular con Inmunogenicidad y Protección.	1997 Robinson , Wells, Le Page. Cambridge, Reino Unido
	Proteína VP8 de Rotavirus	Proteína de Secreción	2001 Perez-Martinez, G Valencia, España.
	Subunidad B de <i>Helicobacter pylori</i>	Proteína intracelular Pobre Inmunogenicidad y Protección.	2001 Lee MH, Tabaqchali S. Londres, Reino Unido
<i>L. casei</i>	Fragmento C de la Toxina tetanica	Inmunogenicidad por Anticuerpos	1999 Maassen, C TNO- Holanda.
	Proteína Basica de la Mielina Humana	Tolerancia de Linfocitos T	1999 Maassen, C TNO- Holanda.
<i>L. plantarum</i>	Subunidad b de la toxina del Colera	Proteína de Secreción	1998 Slos P, Hols P Transgene and Inst. Pasteur, Francia
<i>S. gordonii</i>	Gp 120 del VIH y E7 de HPV	Proteína de Expresión con Inmunogenicidad en Monos	1998 DiFabio, Pozzi, Titti. Siena Italia
	Subunidad B de <i>E.coli</i> , toxina labil al calor,	Proteína de Expresión con Inmunogenicidad	2000 Ricci, Pozzi. Siena Italia
	Antigenos del virus del Sarampion	Proteína de Expresión con Inmunogenicidad	2000 Maggi, pozzi Siena Italia
	Fragmento C de la Toxina tetanica	Inmunogenicidad y Protección por Anticuerpos	2001 Medaglini, D. Pozzi, G. Siena Italia.

CAPITULO 4

4.1 EXPRESIÓN DE PROTEINAS HETEROLOGAS EN BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, por su capacidad de fermentar azúcares principalmente en ácido láctico, en la producción de alimentos fermentados como queso y yogurt. Sin embargo, algunas BAL son explotadas como productores de enzimas (Straus,A. 1996), antígenos heterólogos (Samuelson,P.1995), inmunoglobulinas (Gunneriusson, E.1996), péptidos con actividad antimicrobiana, interleucinas, proteínas terapéuticas, probióticos y como metabolitos que contribuyen a saborizantes, etc.(Piard,J. 1997).

La ausencia de una membrana externa en las bacterias Gram. positivas, las hace particularmente atractivas para su uso en la exposición de moléculas bioactivas por medio de proteínas extracelulares de la bacteria. Estas proteínas de superficie son expresadas en la superficie celular con la función de unirse a tejidos, interactuar con un sustrato localizado en el microambiente, unirse componentes del sistema inmune específicos, unirse a proteínas del suero y a proteínas extracelulares de matriz (ECM), al procesamiento de proteínas, para la adquisición de nutrientes, agregación bacteriana y para la transferencia de ADN. (Piard,J. 1997).

En 1977 Myhre and Kronvall propusieron tres diferentes clases de proteínas de superficie ancladas a membrana que tienen unión a inmunoglobulinas por medio de receptores Fc., esta clasificación esta basada en la habilidad de ciertas bacterias a unir diferentes subtipos de Ig de varias especies mamíferas. Los tipos I y II fueron designadas como proteína Staphylococcal A y proteína de unión a receptores Fc Staphylococcal (Proteína M) respectivamente. El tipo III fue designado como proteína de unión a Fc de grupo Staphylococci del grupo C y G (proteína G).

La familia de proteínas de superficie streptococal M esta compuesta por las proteínas Emm (Clase I y II), Mrp (FcrA) y Enn. Estas proteínas son moléculas dimericas elongadas alfa-hélice super enrolladas que además de unir moléculas Ig, también unen fibrinógeno, kininogeno, plasminógeno y albúmina, también unen factores que inhiben la deposición de moléculas de complemento sobre la superficie bacteriana, y poseen propiedades antifagociticas (Navarre, 1999).

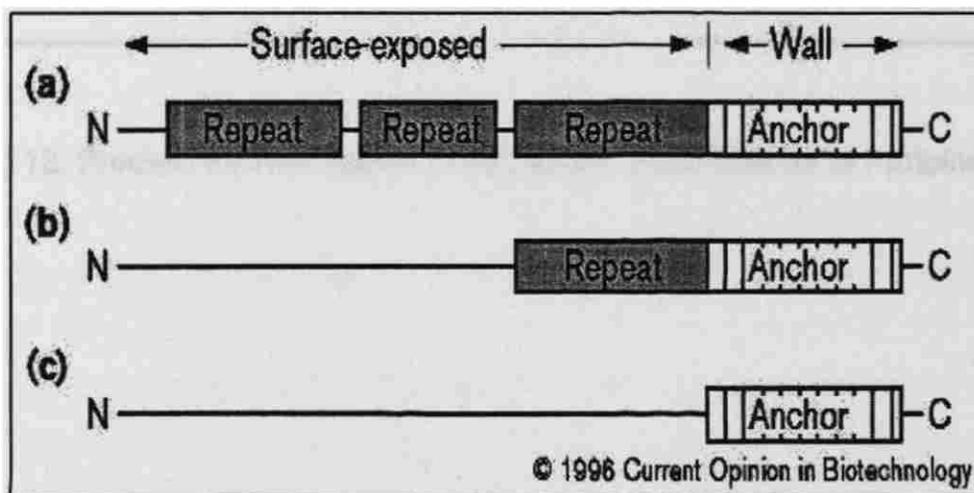
La proteína M6 de *Strptococcus pyogenes* es la proteína de anclaje a membrana mejor caracterizada y ha sido exitosamente utilizada para la expresión de proteínas de fusión recombinantes en la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas. La estructura de anclaje de la proteína M6 incluye en el extremo N-

terminal con actividad catalítica un grupo de dominios repetidos que pueden o no poseer actividad (Fig.12), también tiene un motivo LPXTG seguido por 23 aminoácidos hidrofóbicos ricos en prolina y 6 o 7 residuos cargados positivamente en el extremo C terminal.(Fischetti, V, 1996).

Recientes estudios sobre las proteínas de anclaje a la pared celular involucra un paso inicial en el exporte de un precursor de la proteína a través de la membrana por un mecanismo dependiente de Sec y que una vez translocado, el dominio hidrofóbico y el C-terminal cargado positivamente anclan la proteína a través de interacciones con la membrana y los fosfolípidos cargados negativamente sobre la cara citoplasmática, respectivamente. La proteína de unión a membrana es posicionada para permitir el procesamiento del motivo LPXTG. Una enzima sorteara putativamente rompe a la treonina y crea una unión amida con un grupo amino libre de un péptido en la pared celular (Piard,J. 1997). (Fig.13)

El futuro desarrollo científico e industrial de BAL para la producción de componentes deseados en productos alimenticios o en el tracto gastrointestinal, es la modulación de la expresión de nuevos genes y la apropiada liberación del producto génico. Para este propósito una variedad de sistemas de expresión génica inducibles o controlados por azúcares, nisinas, dependientes de temperaturas, de pH, así como sistemas de proteínas blancos, y sistemas de expresión constitutiva han sido desarrollados. (Willem, M. 1999).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



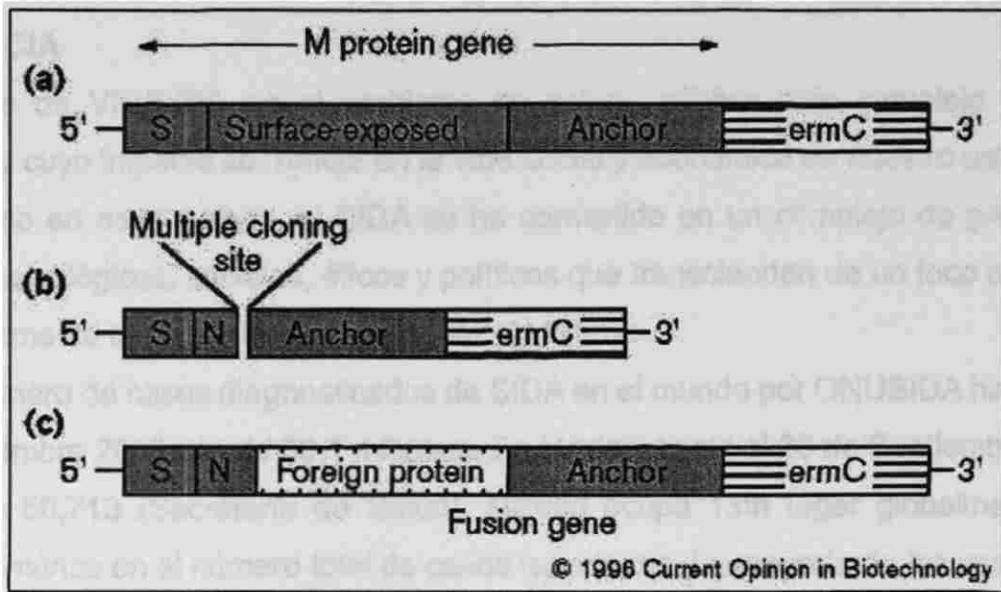


Fig 12. Estructura de la Proteína de Anclaje M6

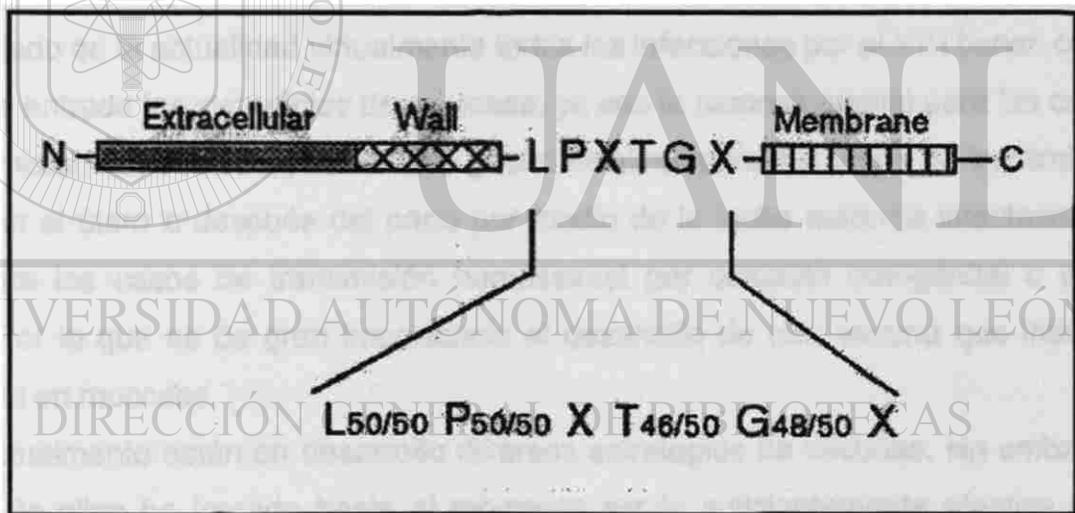


Fig 13. Proceso de Translación y Anclaje a la Superficie de la Proteína M

CAPITULO 5

IMPORTANCIA

La epidemia de VIH/SIDA es el problema de salud pública más complejo en la actualidad, y cuyo impacto se refleja en la vida social y económica de nuestro país. En México, como en otros países, el SIDA se ha convertido en un complejo de grandes problemas psicológicos, sociales, éticos y políticos que trascienden de un foco común de un problema de la salud (Magis-Rodríguez C, 1998) .

El número de casos diagnosticados de SIDA en el mundo por ONUSIDA hasta el 30 de Septiembre 2000 son de 36.1 millones. En México, hasta el 30 de Septiembre del 2000 es de 50,713 (Secretaría de Salud). México ocupa 13th lugar globalmente y tercero en América en el número total de casos reportados. La mayoría de los casos se encuentran en un grupo de 25 a 44 años de edad. Así el SIDA se ha convertido en la causa No. 3 de muerte en hombre y la 6th causa de muerte en mujeres dentro de este grupo de edad (CONASIDA). Por lo cual es urgente el desarrollo y aplicación de una vacuna que disminuya las tasas de morbilidad y mortalidad de esta infección.

Por otro lado en la actualidad virtualmente todas las infecciones por el VIH tienen como puerta de entrada las superficies de mucosas, ya sea la mucosa genital para los casos de transmisión heterosexual, la mucosa gastrointestinal para los casos de transmisión vertical en el útero o después del parto por medio de la leche materna infectada, así como para los casos de transmisión homosexual por contacto oral-genital o anal-genital. Por lo que es de gran importancia el desarrollo de una vacuna que induzca inmunidad en mucosas.

Actualmente están en desarrollo diversas estrategias de vacunas, sin embargo, ninguna de ellas ha logrado hasta el momento ser lo suficientemente efectiva para inducir inmunidad en mucosas capaz de eliminar el virus. Por esta razón son necesarias nuevas alternativas para generar vacunas eficientes en la mucosa. Por otra parte las vacunas en mucosas por vectores recombinantes son aparentemente seguras y efectivas, siendo un componente importante para el control y prevención de la transmisión del SIDA. Nuestro objetivo es el de modificar genéticamente bacterias que tienen la habilidad de habitar normalmente las mucosas para utilizarlas como vectores vivos de antígenos del VIH para inducir inmunidad humoral y celular específica en mucosas.

CAPITULO 6

HIPÓTESIS

La utilización de bacterias lácticas (*Lactococcus lactis*) como vectores de expresión inducen inmunidad específica contra el VIH mediante la expresión en la mucosa gastrointestinal de la gp 120.

OBJETIVO GENERAL

Inducción de inmunidad humoral y celular específica contra el VIH utilizando *Lactococcus lactis* como vector de expresión del antígeno gp 120 en la mucosa .

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Construcción del plasmido recombinante para expresar gp 120.
- 2.- Transformar *Lactococcus lactis* con el plásmido recombinante.
- 4.- Demostrar la expresión del antígeno viral en *Lactococcus lactis*.
- 5.- Comprobar si la proteína gp 120 es expresada en la superficie externa de *Lactococcus lactis* .
- 6.- Determinar si las bacterias recombinantes (*Lactococcus lactis*) inducen una respuesta inmune humoral en mucosa.
- 7.- Determinar si las bacterias recombinantes (*Lactococcus lactis*) inducen inmunidad celular contra la gp 120 en la mucosa.

CAPITULO 7

MATERIAL Y METODO

7.1 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE.

7.1.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS

Tomando en cuenta la secuencia de referencia HXB2R del Gene Bank para el VIH subtipo B se diseñaron un par de oligonucleotidos para amplificar el gen que codifica para la proteína de envoltura gp 120, a cada nucleótido se le añadió un sitio de reconocimiento para las enzimas Apa I y Xho I respectivamente para facilitar su clonación.

Oligonucleotido 1.- CCC GGG CCC ATG AGA GTG AAG GAG AAA TAT CAG

Oligonucleotido 2.- GAG CTC GAG TCT TTT TTC TCT CTG CAC CAC

7.1.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA PROTEINA gp 120

Para la amplificación del gen de la gp 120, se tomo como templado ADN del plasmido pSFV-1, donado por el Dr. Bernard Verrier del instituto Unite Mixte CNRS-Biomerieux (Francia), el cual fue aislado y caracterizado por digestión enzimática con el sitio Bam H I a ambos lados del gen de la gp 120. La reacción en cadena de la polimerasa se llevo acabo como se muestra en la siguiente tabla, en un volumen final de 50 μ l.

Tabla 5. Reacción de Amplificación del gen de la gp 120 por PCR

Reactivo GIBCO	Cantidad (Volumen)
Buffer de Amplificación 10X	5 μ l
MgCl ₂ 50 mM	1.5 μ l
dNTPs mix 10 mM	1 μ l
Oligonucleotido1 10mM	1 μ l
Oligonucleotido 2 10mM	1 μ l
Templado	1 μ l
Taq Polimerasa 5u/ μ	0.5 μ l
H ₂ O _{PCR}	39 μ l

Para la estandarización de la reacción de amplificación se realizó un gradiente de temperaturas de 60°C a 64°C en un Robo Cycler Gradient 40 (Stratagene) a la siguientes condiciones.

Tabla 6. Condiciones para la Amplificación del gen de la gp 120 por PCR

	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	94	2
Desnaturalización	94	1
Alineamiento	60-64	1
Extensión	72	2
Repetir el paso 2 35 ciclos		
Extención final	72	5

7.1.3 CLONACION EN EL VECTOR p GEM-T

El producto obtenido por PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X y tomando en cuenta la temperatura a la cual amplificaron los oligonucleotidos , se corrió un segundo PCR, se corrió en gel de agarosa a las mismas condiciones y la banda que contenía el producto amplificado se separo del resto del gel de agarosa para su purificación por medio del método comercial Gene-Clean II, se cuantificó el ADN obtenido y se realizó una reacción de ligación conteniendo 100 ng de gp120 y 50 ng del vector pGEM-T (promega) con 5µl del buffer rápido de ligación, en presencia de 4 unidades/µl de T4 ADN ligasa. La reacción se incubó por toda la noche a 4°C y esta se utilizó para la transformación de células DH5α de *Escherichia coli* calcio competentes, por medio de un choque térmico de 42 °C por un minuto y pasándolas inmediatamente a 4°C donde se incubó por 30 minutos en presencia de 500µl de caldo LB (Luria-Bertani: 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, pH 7.0) a 37 °C. Posteriormente 100 µl de dicha transformación se creció en placas de agar LB con 100 mg/ml de ampicilina, 0.5 mM de IPTG y 80 µg /ml de X-Gal, se incubó por 24 horas y se seleccionaron las colonias blancas que contenían el inserto de nuestro vector con el gen gp 120. (pGEMTgp120), dichas colonias fueron caracterizadas por medio de la purificación del plasmido (mini-prep), seguido de la digestión enzimática con Apa I y Xho I que liberan el inserto.

7.1.4 SUBCLONACIÓN DEL GEN DE LA gp 120 EN EL VECTOR PIL252:P59:emm6 (pVE5508).

Por último para la construcción de nuestros vectores recombinantes, que expresen la proteína gp120, se purificó el fragmento liberado por digestión Apa I y Xho I y se sub-clonó en el plásmido pVE5508 (Obtenido del INRA, Francia) generando el plasmido p59Mgp120, el cual posee el promotor fuerte P59 de *Lactococcus* y la secuencia que codifica para el fragmento de anclaje en pared celular de la proteína M de *Streptococcus pyogenes*.

7.2 TRANSFORMACIÓN DE *Lactococcus lactis*

7.2.1 PREPARACIÓN DE LAS CELULAS COMPETENTES DE *L.lactis*.

Crece 200 mL de la cepa de *L.lactis* (MG1363) la cual es una bacteria sin plásmidos nativos y bajo nivel de proteasas en caldo M17 en presencia de 0.5M de sacarosa y 2% de glicina e incubar a 32°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6, obtener el pellet por centrifugación a 7500 rpm por 10 minutos a 4°C, resuspender el pellet en 30 ml de buffer de lavado frío (0.5 M sacarosa y glicerol al 10%), centrifugar por 10 min. a 7500 rpm a 4°C, descartar el sobrenadante y repetir el paso anterior 3 veces más, finalmente se recupera el pellet y se resuspende en una solución fría de polietilenglicol 3000 al 30% con glicerol al 10%, realizar alícuotas y congelar inmediatamente a -70 °C.

7.2.2 TRANSFORMACIÓN DE *Lactococcus lactis* POR ELECTROPORACIÓN.

Se transformó a *L. Lactis* por la técnica de electroporación en un electroporador (Electro Square Porator ECM 830 BTX) colocando 50 µl de células competentes y 10 µl del inserto (plasmido p59Mgp120) en una cubeta de electroporación (Cuvettes Plus 4 mm BTX) a las siguientes condiciones, un pulso de 2500 Volts, 200 oms, p.lenght 10 µs, 25 µf. Esta preparación se incuba en presencia de caldo M17 con 0.5 M de sacarosa por 1 hora a 37 °C y posteriormente se crecen 100 µl de esta en agar M17 (Bacto triptona 5gr, Bacto soytrona 5gr, carne digerida 5gr, levadura digerida 2.5gr, ácido ascorbico 0.5gr, sulfato de magnesio 2.5gr, β-glicerol fosfato-disodico. DIFCO), 0.5 % de sacarosa y 5 µg /ml de eritromicina. Las clonas transformadas fueron checadas por resistencia a eritromicina y por PCR en colonia para la gp120, en el cual se pica una colonia que se cree positiva, se resuspende en 50 µl de H₂O_{pcr}, se coloca en ebullición por 5 minutos y se toma una alícuota para realizar el PCR.

7.3 DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA gp120 DEL VIH EN *L.lactis*. POR Western Blot

Para determinar si el lactococcus está expresando la proteína gp 120, las colonias seleccionadas anteriormente se crecieron en caldo M17, se centrifugaron a 7500 rpm por 10 minutos y el paquete bacteriano fue resuspendido en 200 µl de buffer de lisis SDS gel 2X para proteínas y calentado por 10 minutos a ebullición, posteriormente las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12% y transferido en una cámara semiseca (OWL Separation Systems) a una membrana de nitrocelulosa a 120 miliampers por una y media horas. La transferencia fue verificada con rojo ponceau al 1% y fue lavada con PBS al 1% hasta eliminar el exceso de colorante, se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% y tween al 0.5% en PBS a temperatura ambiente por 45 minutos, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween al 0.5% de 15 minutos cada uno, el anticuerpo primario 1:1000 (IgG anti-gp120 VIH monoclonal de ratón, CHEMICON) fue incubado por toda la noche a 4°C, se realizaron tres lavados de PBS-Tween 0.5% y se adicionó un segundo anticuerpo 1:2500 anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, para revelar por quimioluminiscencia, se le adicionó 3 ml del sustrato peroxidasa, luminol 1:1 (Pierce súper signal), después de 5 minutos se colocó la membrana en una película plástica, exponiéndola con un film para quimioluminiscencia Pierce por 1-5 minutos en un cassette para autoradiografía. Revelamos el film colocándolo 1 minuto en una solución reveladora (Kodak), se enjuaga en agua y se colocó por un minuto en solución fijadora (Kodak), volviendo a enjuagar en agua al final del proceso.

7.4 DETECCIÓN DE LA EXPRESION EN LA SUPERFICIE EXTERNA DE LA PROTEÍNA gp120 DEL VIH EN *L.lactis*.

7.4.1 ANÁLISIS DE WHOLE- CELL ELISA:

Crece la cepa de *L.lactis* a una densidad óptica de 0.6, Centrifugar 10 min. a 10,000 rpm. Resuspender el pellet en 1ml de PBS, repetir el paso anterior tres veces, cubrir la placa de ELISA con 200 μ l de *L.lactis* en PBS e incubar toda la noche a 4°C, descartar el exceso de bacteria, lavando 3 veces con PBS-tween al 0.5%. Bloquear la placa con 150 μ l de BSA al 3% en PBS-tween 0.5%, incubar 2 horas a 37°C, lavar 3 veces con PBS-tween al 0.5%, Adicionar 100 μ l del anticuerpo primario (suero de paciente positivo por PCR y ELISA para VIH), incubar 2 horas a 37°C, lavar 3 veces con PBS-tween al .05%, adicionar 100 μ l del anticuerpo conjugado anti-IgG humano peroxidasa. Incubar 1 hora a 37°C, Lavar 3 veces con PBS-tween al 0.5% y adicionar 100 μ l del sustrato ABTS, incubar por 5-10 minutos, adicionar solución de paro (fluoruro de sodio) y leer a 405 nm.

7.4.2 ANÁLISIS DE INMUNOFLUORESCENCIA:

Crece la cepa de *L.lactis* a una densidad óptica de 0.6, centrifugar 10 min. a 10,000 rpm. Resuspender el pellet en 500 μ l BSA 3% en PBS con el anticuerpo anti-gp120 de ratón (CHEMICON) 1:500. Incubar toda la noche a temperatura ambiente, centrifugar, retirar el anticuerpo y resuspender el pellet con PBS-tween 0.5%, repetir el paso anterior cinco veces. Adicionar el segundo anticuerpo conjugado anti-IgG de ratón alexa fluor 594 en PBS-BSA 3% a una dilución de 1:50 e incubar toda la noche a temperatura ambiente, centrifugar y retirar el anticuerpo. Resuspender el paquete celular con PBS-tween 0.5%. Repetir el paso anterior cinco veces. Leer a una emisión de 617 nm en un microscopio confocal laser (Olympus 1x 70).

7.5 GRUPOS EXPERIMENTALES

Se realizaron los siguientes experimentos en grupos de 3 ratones de 6-8 semanas de edad por unidad experimental:

- a) Se inmunizaron ratones por vía oral por medio de una sonda pediátrica con una sola dosis de 10^9 *Lactococcus* recombinantes vivos expresando la gp 120 de VIH y con 10^9 *Lactococcus* que no expresan la gp 120 como control.
- b) Se inmunizaron ratones por vía oral con tres dosis a los 0, 14 y 28 días de 10^9 *Lactococcus* recombinantes expresando la gp 120 del VIH y con 10^9 *Lactococcus* que no expresan la gp 120 como control.

7.6 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se analizó la respuesta inmune en los animales inmunizados con *Lactococcus* recombinantes y no recombinantes obteniendo a diferentes tiempos (10, 18 y 24 días después de la inmunización con una sola dosis y a los 7 días después de la última inmunización para los de tres dosis) muestras de suero, heces, lavados estomacales e intestinales, linfocitos de bazo y una muestra de intestino para histología. Analizando la producción de anticuerpos específicos contra gp 120 de VIH, la respuesta proliferativa y posibles daños en las mucosas.

7.6.1 HECES

Se colectaron de 12-15 pellets de heces en un tubo eppendorf, se les agregó 1 ml de TBS-BSA1% y 1mM del inhibidor de proteasas PMSF (Fenil-Metil-Sulfonil Fluoruro, SIGMA). Incubar toda la noche a 4°C, mezclar rigurosamente y centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm, recuperando el sobrenadante. Almacenar a -70°C hasta su uso.

7.6.2 SUERO

Se obtuvo sangre por punción retroorbital y punción cardiaca, se deja formar el coagulo y se centrifuga a 2000 rpm por 5 minutos, el suero es separado y se almacena a -70°C hasta su uso.

7.6.3 LAVADO DE MUCOSA INTESTINAL Y ESTOMACAL

En una caja petri se colocan por separado el intestino delgado y el estomago disectados, con ayuda de unas pinzas de disección se realizan los lavados intra órganos con 2 ml de TBS con 0.2 mM de PMSF, se colecta la solución después de dos o tres lavados y se centrifuga a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Colectar el sobrenadante y almacenarlo a -4°C hasta su uso.

7.6.4 BAZO

Disectar el bazo y agregar aproximadamente 2 ml de medio de cultivo RPMI 1640 con 2% de suero fetal bovino, realizar un corte apical y por perfusión obtener las células, posteriormente cortar el bazo en pequeños pedazos y continuar la perfusión. Colectar el medio y centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos y resuspender el pellet en 1 ml de medio de cultivo. Realizar un a gradiente de Ficol-Hypaque 1077 (SIGMA) a una

densidad de 1.077 de 2 ml y agregar cuidadosamente la muestra, centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, colectando la interfase. Realizar un conteo de viabilidad celular con azul tripan (SIGMA) para ajustar las células a 1×10^6 .

7.6.5 HISTOLOGIA

Cortar 2 piezas de aproximadamente 0.5 cm de intestino y estomago, colocarlos en un tubo eppendorf conteniendo 1 ml de formalina 10% con NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , se realizaron cortes histológicos y se tificaron con Hematoxilina y Eosina. También se obtuvieron cortes de ratones inmunizados con una sola dosis de bacteria viva recombinante para la realización de Inmunohistoquímica para Macrófagos y CD4. Observar al microscopio.

7.7 INDUCCION DE INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR EN MUCOSAS CONTRA VIH CON LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE *L. lactis* RECOMBINANTE.

7.7.1 MEDICIÓN DE ANTICUERPOS IgG e IgA EN LAVADO ESTOMACAL, INTESTINAL, HECES Y SUERO CONTRA gp 120 POR ELISA

7.7.1.1 MEDICIÓN DE ANTICUERPOS POR UN KIT COMERCIAL (VIRONOSTIKA)

Para la medición de anticuerpos IgG e IgA específicos contra el VIH, utilizamos una placa comercial, la cual contienen antígeno VIH-1. Se recubrió la placa con 200 μl de lavado estomacal, intestinal, heces o suero (las dos ultimas en una dilución 1:50), se incubo toda la noche a 4°C , posteriormente se lavo la placa tres veces con TBS-Tween 0.5% , se adicionaron 100 μl del segundo anticuerpo anti-ratón IgG o anti IgA (SIGMA) conjugados con fosfatasa alcalina en buffer de carbonatos a pH de 9.6, incubar por 3 horas a 37°C, lavar tres veces con PBS-Tween 0.5% , adicionar el sustrato pNPP 2mg /ml (para- nitrofenilfosfato SIGMA), incubar por 1 hora a 37°C y leer en un micro lector de ELISA (BIOTEK Instruments) a 405nm.

7.7.1.2 MEDICIÓN DE ANTICUERPOS IgG E IgA POR WHOLE-CELL ELISA

Cubrir la placa de ELISA con 200 μl de *L.lactis* a una densidad óptica de 0.6 en buffer de carbonatos e incubar toda la noche a 4°C, descartar el exceso de bacteria, lavando 3 veces con PBS-tween al 0.5%. Bloquear la placa con 200 μl de BSA al 3% en PBS-tween 0.5%, incubar 2 horas a 37°C, lavar 3 veces con PBS-tween al 0.5%, Adicionar 200 μl lavado estomacal, intestinal, heces o suero (las dos ultimas en una dilución 1:50) incubar 2 horas a 37°C, lavar 3 veces con PBS-tween al 0.5%, adicionar

100µl del segundo anticuerpo anti-ratón IgG o anti IgA (SIGMA) conjugados con fosfatasa alcalina en buffer de carbonatos a pH de 9.6, incubar por 3 horas a 37°C, lavar tres veces con PBS-Tween 0.5% , adicionar el sustrato pNPP 2mg /ml (para nitrofenilfosfato SIGMA), incubar por 1 hora a 37°C y leer en un micro lector de ELISA (BIOTEK Instruments) a 405nm.

7.7.2 OBTENCION DEL ANTIGENO VIH-1

7.7.2.1 PURIFICACION DEL ANTIGENO VIH-1

El antígeno VIH-1 se obtuvo de una placa comercial de ELISA (Vironostika) para el diagnostico de VIH-1. Se recuperó el antígeno por medio de la adición de 100 µl de saponina al 0.1% a cada pozo, se incubó a 4 °C toda la noche, se colectó la solución y se sometió a diálisis con PBS por 48 hrs., posteriormente el antígeno es purificado con isopropanol frío en una relación de 2:1, se incubó por 20 minutos a 4°C y se centrifugo por 5 min. a 10,000 r.p.m. , el pellet obtenido se lava con etanol al 100% y se disuelve en PBS. Finalmente se determinó la concentración de antígeno proteico por medio del método para determinación de concentración de proteínas de Stanford.

7.7.2.2 DETECCION DEL ANTIGENO VIH-1 POR WESTERN BLOT

Para confirmar la presencia del antígeno VIH-1, se realizó su detección por medio de western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti gp120, la técnica se llevo a cabo como se menciona previamente en la detección de la gp120 en *Lactococcus* . Posteriormente el antígeno fue probado en linfocitos de bazo de ratón para determinar ,si las concentraciones a probar de 1 y 5µg pudieran ser citotóxicas a las células, al momento de probarlo como estimulante de linfocitos para los ensayos de proliferación celular .

7.7.3 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

7.7.3.1 ANALISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN LINFOCITOS DE BAZO

Para medir la proliferación específica de los linfocitos sensibilizados, se incubaron 1×10^6 células de bazo de los ratones inoculados con *L.lactis* recombinante y no recombinante, de los diferentes tratamientos, en ausencia y en presencia de 1 µg, 5 µg de la proteína gp 120 y 2.4 µg /ml de Con A (Concanavalin A, SIGMA) como estimulador inespecífico por 66 hrs. a 37 °C con 5% de CO₂. Se les añadió 10 µl de timidina tritiada(Amersham Pharmacia Biotech) de una solución stock a 100 mCi, 6 hrs.

antes de cumplir las 72 hrs. de incubación, para determinar el grado de proliferación. Se cosecharon las células de los diferentes tratamientos en un filtro con poro de $0.2\mu\text{m}$, se deja secar el filtro y se le añade aproximadamente $500\ \mu\text{l}$ de líquido de centelleo (Amersham International). La incorporación de timidina tritiada se analizó en un contador de centelleo líquido marca Beckman.

7.8 ANALISIS HISTOLOGICO DE LOS EPITELIOS EN ESTOMAGO E INTESTINO DELGADO

Para el análisis histológico de los epitelios en estómago e intestino, se obtuvieron 2 piezas de tejido de estómago e intestino de ratones inmunizados con una sola dosis de *L. Lactis* que expresa la gp120 y *L. lactis* normal, los cortes fueron aproximadamente de 1cm cada pieza y se fijaron en formalina al 10% , posteriormente se realizaron cortes histológicos de las muestras obtenidas sobre una laminilla y se tiñeron con hematoxilina y eosina, finalmente se colocó una gota de resina y un cubreobjetos para observar al microscopio.

7.9 DETECCION DE LA EXPRESIÓN DE CD4 Y MAC EN LA MUCOSA DEL ESTOMAGO E INTESTINO DELGADO POR INMUNOHISTOQUIMICA

Para la detección de la expresión de CD4 y Mac, utilizamos un kit para inmunohistoquímica (DAKO), utilizando la siguiente técnica: Colocamos la laminilla en xilol I por 5 min., posteriormente en xilol 2 por 5 min, deshidratamos el tejido con OH 100% , 80%, 70%, 50% por 4 minutos cada uno, lavar con agua, posteriormente aplicamos antígeno retrieval a 80°C por 20 minutos, enfriamos a temperatura ambiente, lavamos con agua destilada y con buffer, colocamos el bloqueador de peroxidasa al 3% (H_2O_2), lavamos con buffer, bloqueamos con biotina por 5 minutos, lavamos con buffer, adicionamos el anticuerpo primario en una dilución de 1:200 (Anti-macrofago o Anti-CD4) por 20 minutos, lavamos con buffer, adicionamos el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa por 15 minutos, lavamos con buffer , aplicamos estreptavidina por 15 minutos, lavamos con buffer, revelamos con diaminobenzidina por 30 segundos, lavamos con agua destilada, sumergimos la laminilla en hematoxilina por 20 segundos, lavamos con agua, posteriormente sometimos la laminilla a los alcoholes 50%, 70%, 80%, 100%, a xilol II y xilol I. Finalmente colocamos una gota de resina y un cubreobjetos para observar al microscopio.

CAPITULO 8

RESULTADOS

Con el propósito de desarrollar una vacuna basada en bacterias lácticas comestibles, expresando antígenos del VIH en *Lactococcus lactis* para inducir inmunidad en mucosas, se construyó un plasmido recombinante, que exprese la proteína gp 120 del VIH en la pared de *L.lactis* basado en la proteína M de anclaje a la pared derivada de *S. Pyogenes*. *L. Lactis* fue transformado por electroporación con este plasmido recombinante y después de analizar la expresión de la proteína en la bacteria por Western Blot, Whole-Cell ELISA e Inmunofluorescencia, se inmunizaron vía oral 3 ratones por unidad experimental de 6 semanas de edad con 1×10^9 bacterias recombinantes a una sola dosis y a tres dosis a los 0, 14 y 18 días, después de la inmunización se obtuvieron las muestras de heces, suero, lavado estomacal e intestinal y linfocitos de bazo, para analizar el nivel de anticuerpos anti-IgG o anti-IgA específicos contra la gp 120 por medio de la técnica de ELISA y para medir la proliferación celular en bazo, así mismo se realizaron cortes histológicos para determinar la integridad de la mucosa en estomago e intestino.

8.1 CONSTRUCCIÓN DEL PLASMIDO RECOMBINANTE

8.1.1 AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA PROTEINA gp 120 DEL VIH

Para clonar el gen de la gp 120 del VIH subtipo B, obtuvimos el plasmido pSFV-1 donado por el Dr. Bernard Verrier (Francia), el cual fue aislado por mini-prep y caracterizado para demostrar que contiene clonado el gen de la gp120 en el sitio Bam HI, cuando tratamos el plasmido con dicha enzima, efectivamente liberó el fragmento de 1447 pb que corresponde al marco de lectura completo de dicho gen (Fig.14). Usando como templado dicho plasmido optimizamos las condiciones por medio de un gradiente de temperaturas para amplificar por PCR dicho fragmento de 1447 pb con los oligonucleotidos diseñados por nosotros, en base a la secuencia de dicho gen depositado en el Gene Bank (K03455,M38432). (Fig.15).

Plasmido pSFV-1

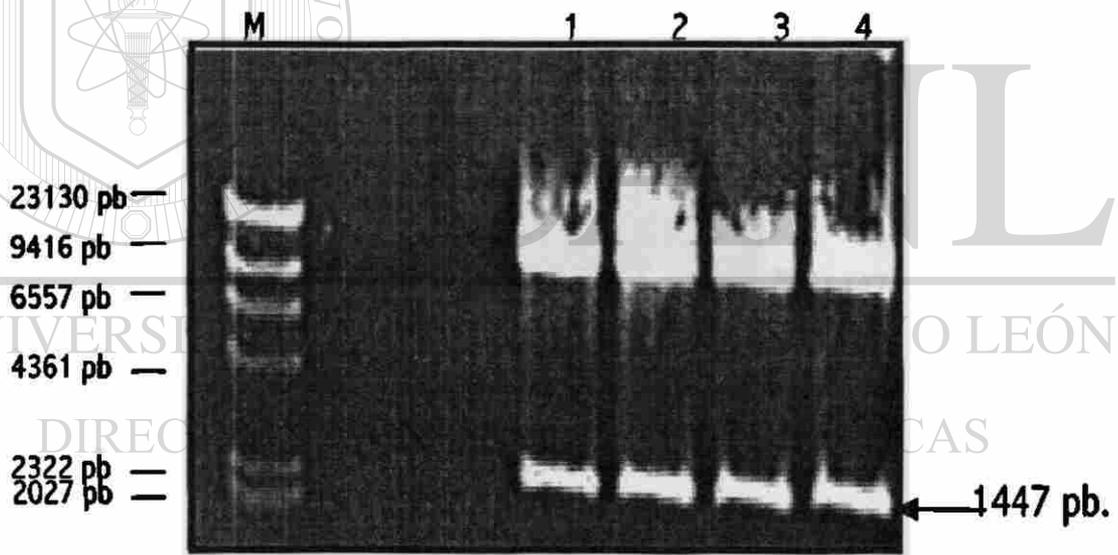
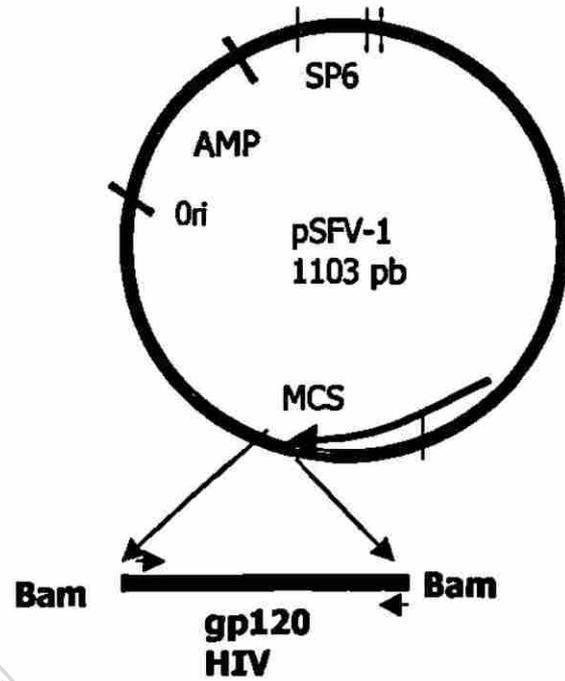
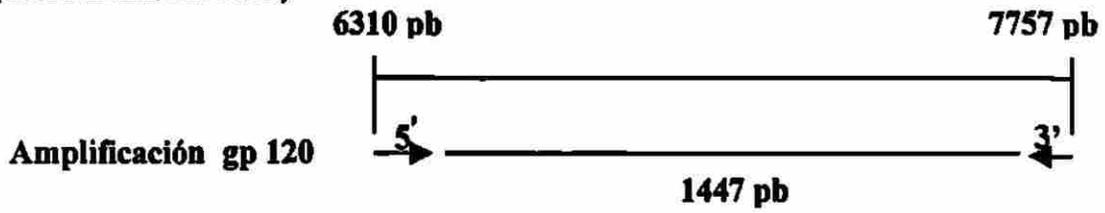
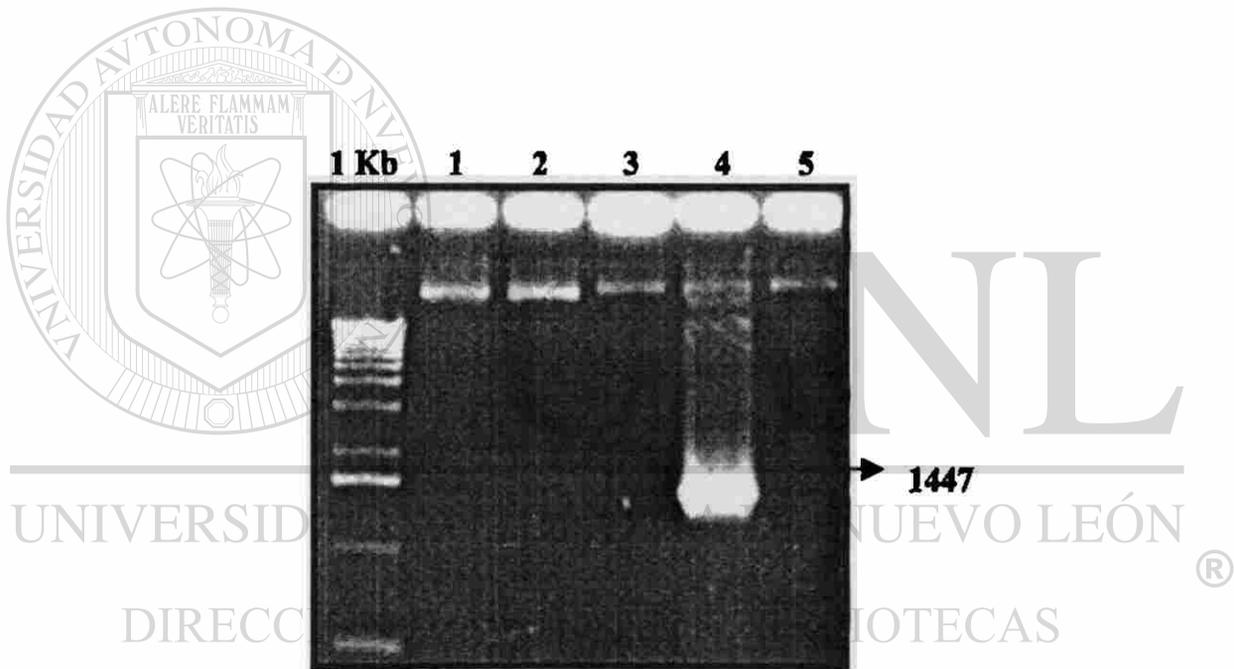


Fig 14. Caracterización del gen de la gp 120 en el Plasmido pSFV-1. M) DNAHind III. 1-4) Digestión enzimática del plasmido pSFV-1 con Bam H I, para la liberación del gen de la proteína gp 120 de 1447 pb.

**Gen de la gp 120 HXB2R
(Gene Bank M38432)**



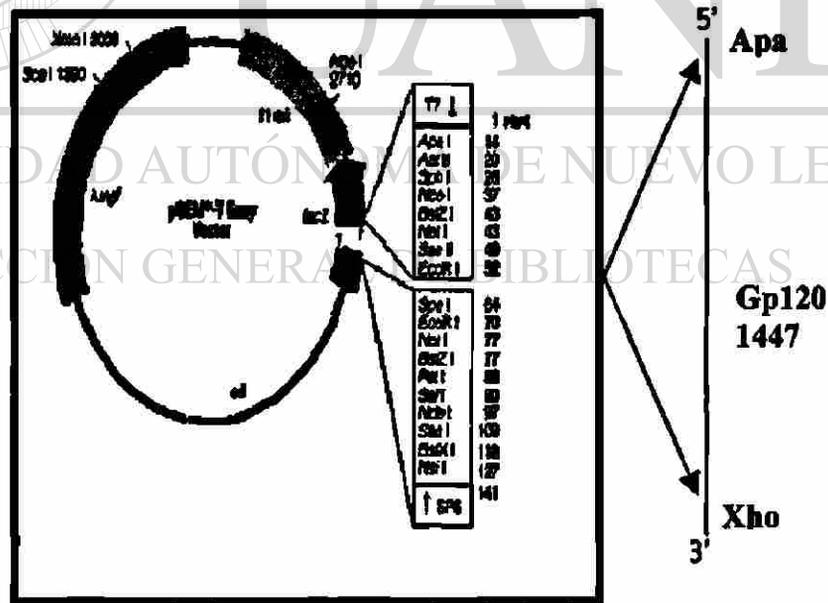
Oligonucleotido 5' CCC GGG CCC ATG AGA GTG AAG GAG AAA TAT CAG
Oligonucleotido 3' GAG CTC GAG TCT TTT TTC TCT CTG CAC CAC



**Fig 15. Gradiente de Temperaturas para la Amplificación por PCR del gen de la Proteína gp 120 del DNA del Plasmido pSFV-1.
M) 1 Kb 1-5) Temperaturas de amplificación de 60 a 64 °C respectivamente .**

8.1.2 CLONACION DEL GEN DE LA gp120 DEL VIH.

Posteriormente usamos el sistema pGEM-T easy para clonar el producto de PCR de 1447 pb, dicho producto contiene los sitios ApaI y Xho I en los extremos, los cuales fueron introducidos por los oligonucleotidos al momento de la amplificación, Después de llevar a cabo la ligación del fragmento de 1447 pb obtenido por PCR con el vector T, seleccionamos un grupo de varias clonas resultantes de la transformación y realizamos un miniprep rápido para checar los plasmidos que contenían el inserto. Seleccionamos 3 clonas que mostraron un plasmido de un tamaño mas grande aproximado al peso esperado con el fragmento clonado de 1447 pb (Fig.16). Posteriormente realizamos un mini-prep de esas colonias para caracterizar el plasmido obtenido (Fig.17). Las clonas que contenía el gen gp 120 del VIH fueron caracterizadas con las enzimas ApaI y Xho I para terminar de demostrar la liberación del fragmento de 1447 pb con los sitios introducidos durante la amplificación por PCR. Este plasmido caracterizado fue llamado pGEMTgp120.(Fig. 18).



pGEMgp120

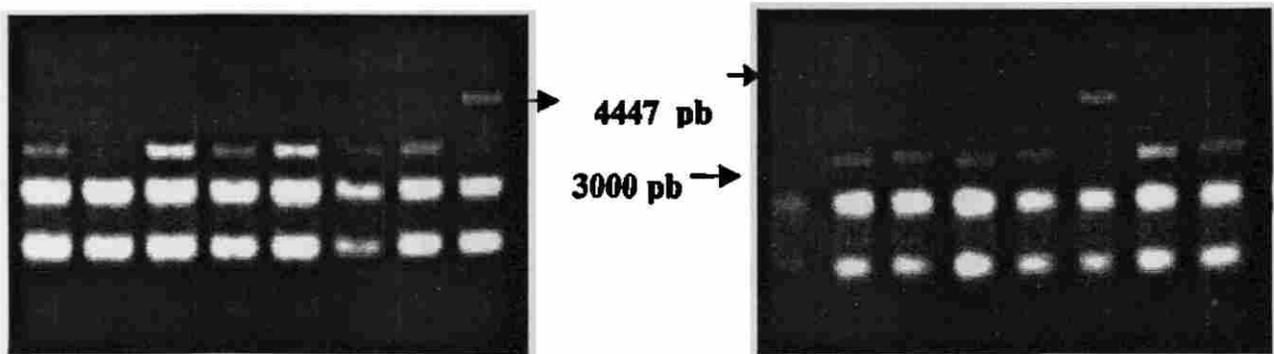


Fig 16. Clonación de la gp120 en el Vector pGEM-T.

Construcción del vector pGEMTgp 120 (4447 pb) y transformación del vector en *E. Coli* DH5á , seleccionando 2 clonas positivas por un prep rápido

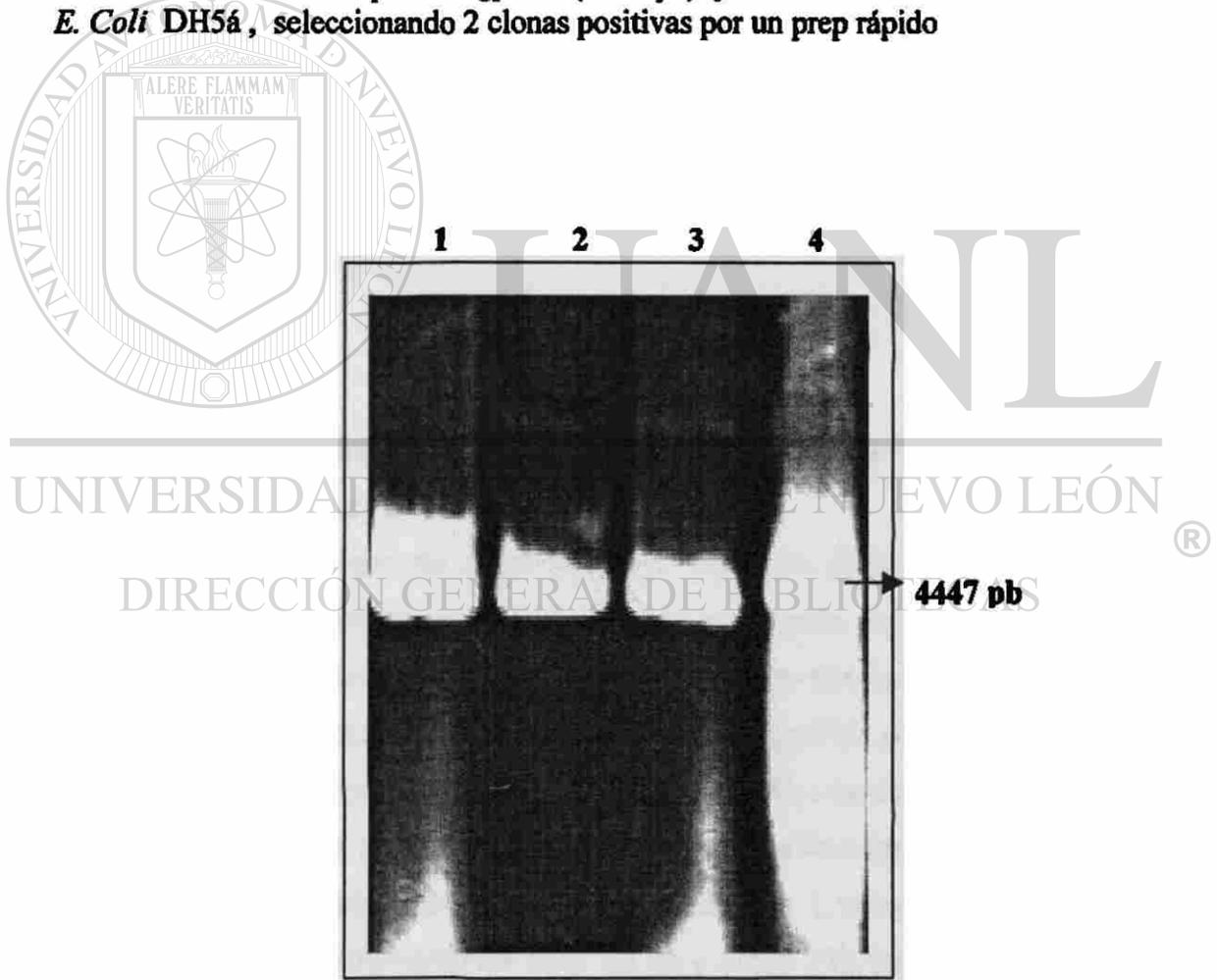


Fig 17. Purificación del Plasmido pGEMTgp120 por Maxi-Prep.
1-4) ADN plasmidico obtenido

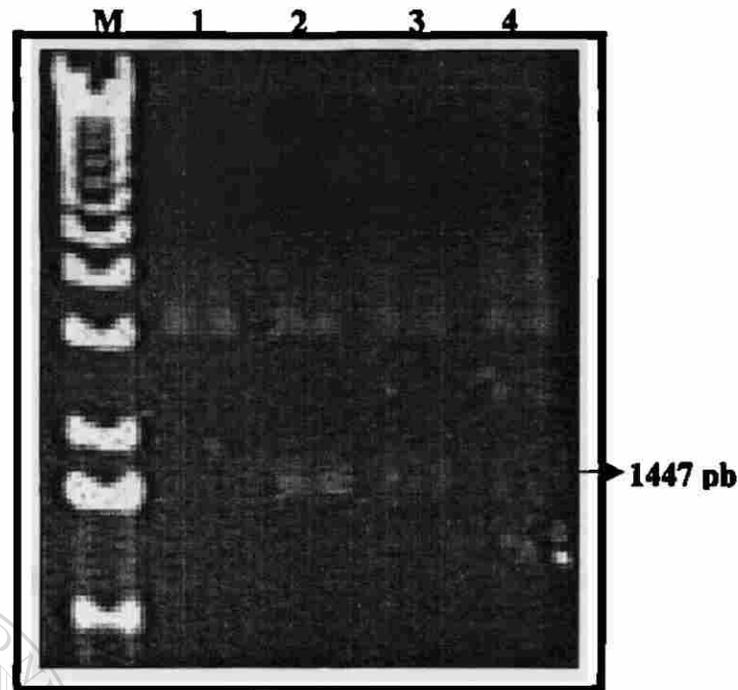


Fig 18. Caracterización del Plasmido pGEMTgp120. Liberación del plasmido por digestión enzimática con Apa I y Xho I. M) 1Kb, 1 y 4) clonas sin inserto, 2-3) clonas positivas.

8.2 SUBCLONACION DEL GEN DE LA gp120 DEL VIH EN EL VECTOR DE EXPRESION DE *Lactococcus lactis*.

Una vez clonado el gen de la gp120 en el plasmido pGEMTgp120, el gen de la gp120 de 1447 pb fue liberado con las enzimas de restricción ApaI y XhoI y purificado por GENE CLEAN II y ligado al vector pVE5508 digerido con las mismas enzimas de restricción, el plasmido resultante fue denominado p59Mgp120, por que dicho plasmido dirige la expresión fuerte específica de *L.lactis* (Fig.19 A). Las clonas resultantes de la transformación de *L.lactis* por electroporación fueron verificadas por PCR en colonia para determinar la presencia del gen de la gp120 en *L.lactis*, en varias colonias resultantes se detecto el fragmento de 1447 pb en *L.lactis* (Fig.19 B).

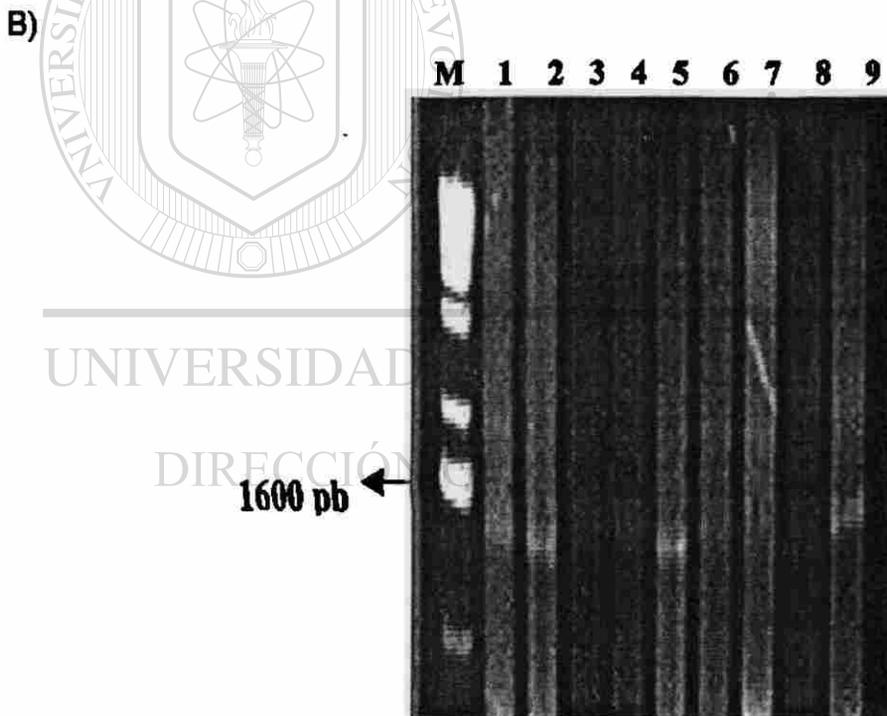
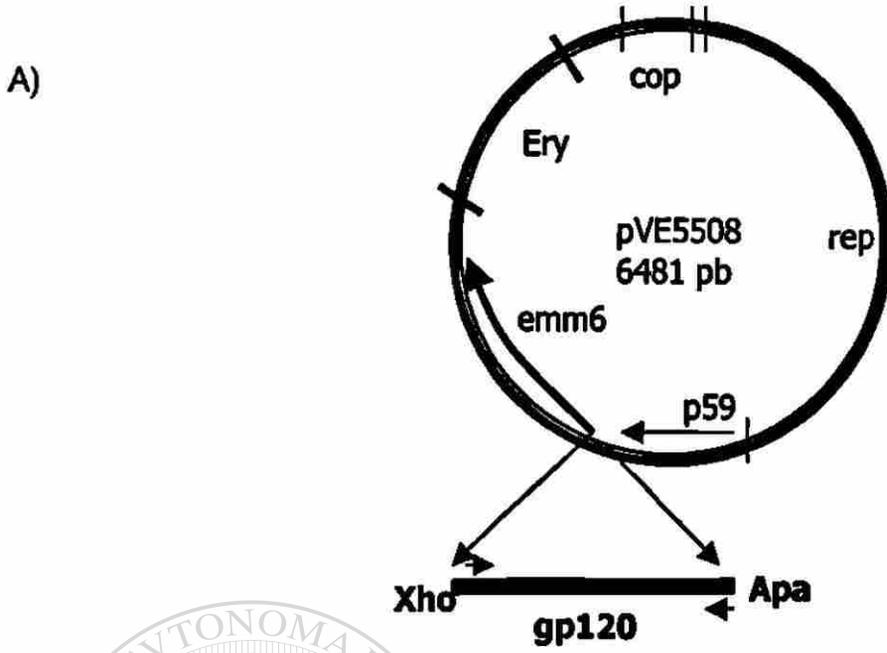


Fig 19. Detección de la gp120 en Transformantes de *Lactococcus lactis* por PCR en Colonia. M) 1 Kb 1,2 5, 9 clonas positivas de *L. Lactis* para gp 120

8.3 DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA gp120 DEL VIH EN *L.lactis*. POR Western Blot

Varias clonas de *L.lactis* seleccionadas por PCR en colonia fueron crecidas hasta una densidad óptica de 0.6 y de estas células bacterianas se obtuvo la proteína total para la realización de un Western Blot. También se obtuvo proteína total de 2 cepas de *L.lactis* la MG1363 y la VE 1121 no transformadas con ningún plasmido para usarlas como control. La presencia de la proteína gp 120 en *L.lactis* fue chequeada utilizando un anticuerpo monoclonal contra la gp 120 del VIH (Chemicon). El Western Blot mostró la presencia de una sola proteína del tamaño esperado en varias clonas de *L.lactis*, en las líneas 3-5 y 7-9, mientras que en las líneas 1 y 2 donde se colocaron los extractos proteicos de las cepas control de *L.lactis* no se detectó banda alguna (Fig.20), es necesario hacer notar que aparentemente la clona 1 de *L.lactis* colocada en la línea 3 tiene un mayor nivel de expresión que las otras clonas de *L.lactis* (Fig.20).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

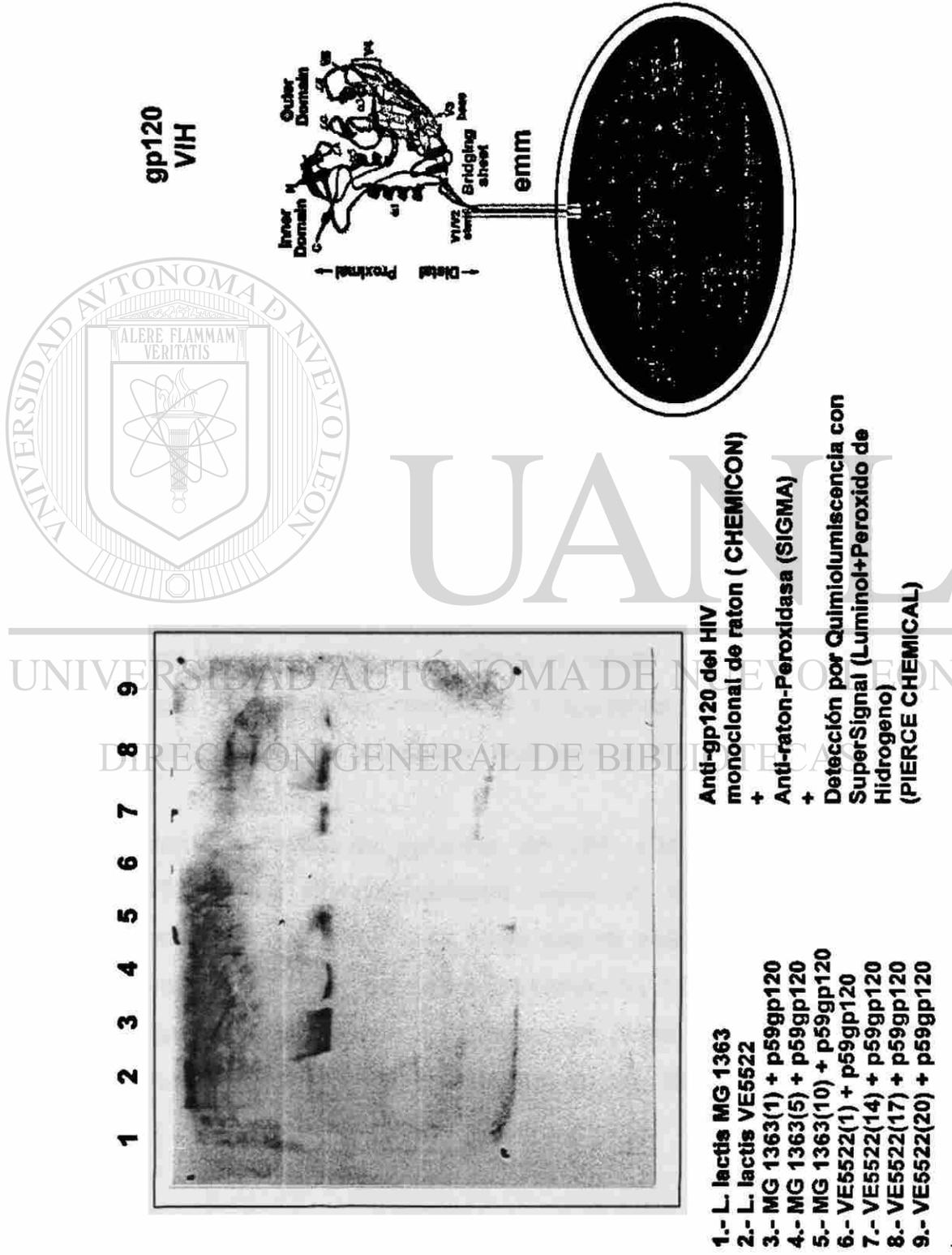


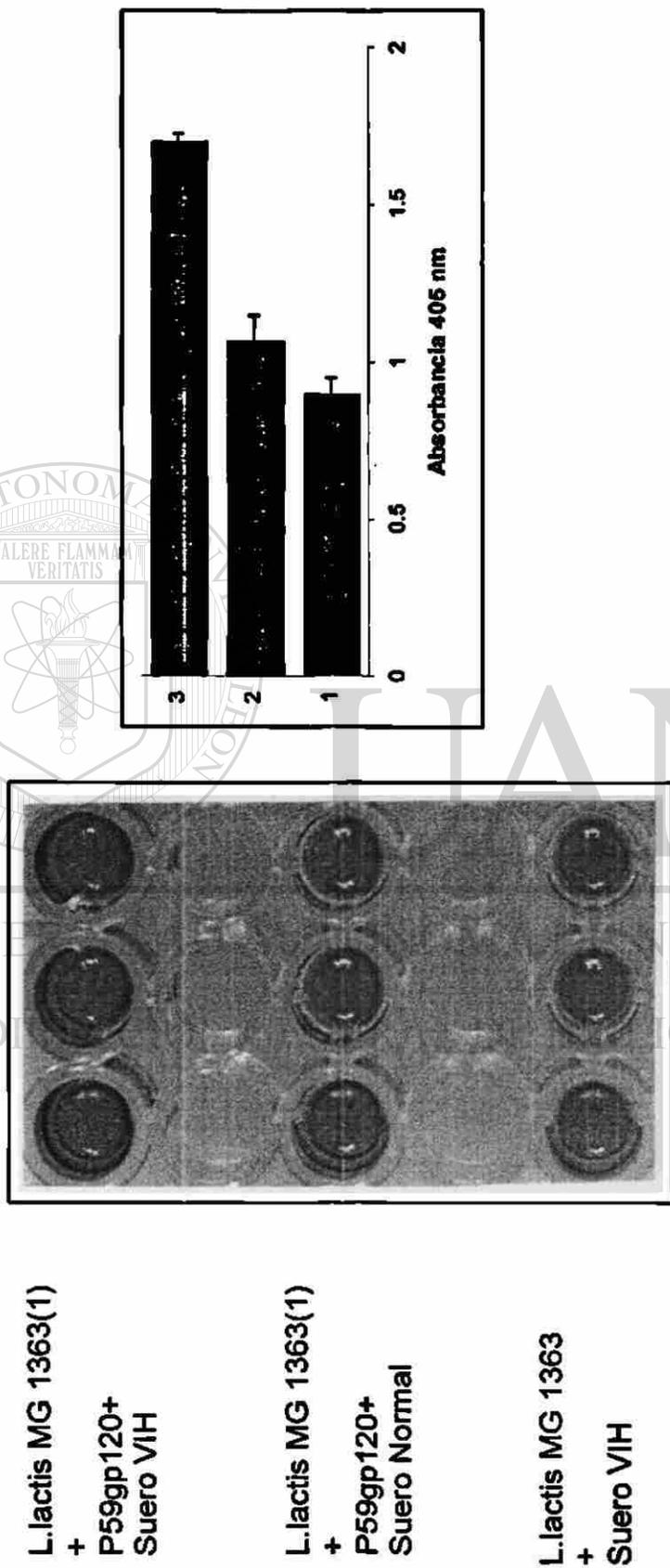
Fig 20. Detección de la Expresión de la Proteína gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por Western Blot

8.4 DETECCIÓN DE LA EXPRESION EN LA SUPERFICIE EXTERNA DE LA PROTEÍNA gp120 DEL VIH EN *L.lactis*.

8.4.1 ANÁLISIS DE WHOLE-CELL ELISA:

De los resultados obtenidos en el ensayo de Western blot seleccionamos 3 clonas de *L. lactis* recombinantes que expresan adecuadamente la gp120, dado que un anticuerpo comercial reconoció específicamente una única proteína en los extractos de estas células, para determinar si estas clonas expresan la gp120 en la superficie externa anclada a la pared celular de la bacteria por medio de el fragmento génico (gene emm 6) de anclaje a pared celular de la proteína M presente en el vector p59gpM120 al que se fusionó la gp 120, se llevo acabo una ELISA denominada Whole-Cell en el cual se utilizan células bacterianas vivas completas para realizar sobre ellas una reacción de ELISA. Para detectar la gp120 en la superficie de *L.lactis* se utilizó suero de paciente VIH positivo por PCR y positivo para anticuerpos contra el virus por un ELISA comercial, también se uso un suero de un individuo negativo para VIH, como control. La clona 1 de *L.lactis* recombinante reacciono significativamente con el suero del paciente con VIH (Absorbancia de 1.8), mientras que la reacción por este sistema de ELISA con un suero normal tuvo una absorbancia 1.1 aproximadamente, de estos datos se deduce que la bacteria recombinante presenta adecuadamente la gp 120 en su superficie y esta es reconocida por los anticuerpos de un paciente con VIH generados en la infección natural, lo cual puede indicar que la clona 1 de *L.lactis* recombinante muestra en su superficie externa una gp120 con una conformación similar a la que muestra el virus durante el proceso de infección natural (Fig.21).

El reconocimiento del suero del paciente en VIH a la bacteria sin transformar (*L.lactis* MG1363) fue significativamente menor en los niveles de absorbancia mostrados, indicando posiblemente la presencia de anticuerpos contra la bacteria láctica solamente (Fig.21), con respecto a las clonas 5 y 17 de *L.lactis* recombinante, también mostraron los mismos datos obtenidos para clona 1, solo que para la clona 5 estos fueron más bajos (Fig.22 y 23) pero demostrando lo mismo.



L. lactis MG 1363(1)
+ P59gp120+
Suero VIH

L. lactis MG 1363(1)
+ P59gp120+
Suero Normal

L. lactis MG 1363
+ Suero VIH

Fig 21. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por WholeCell-ELISA

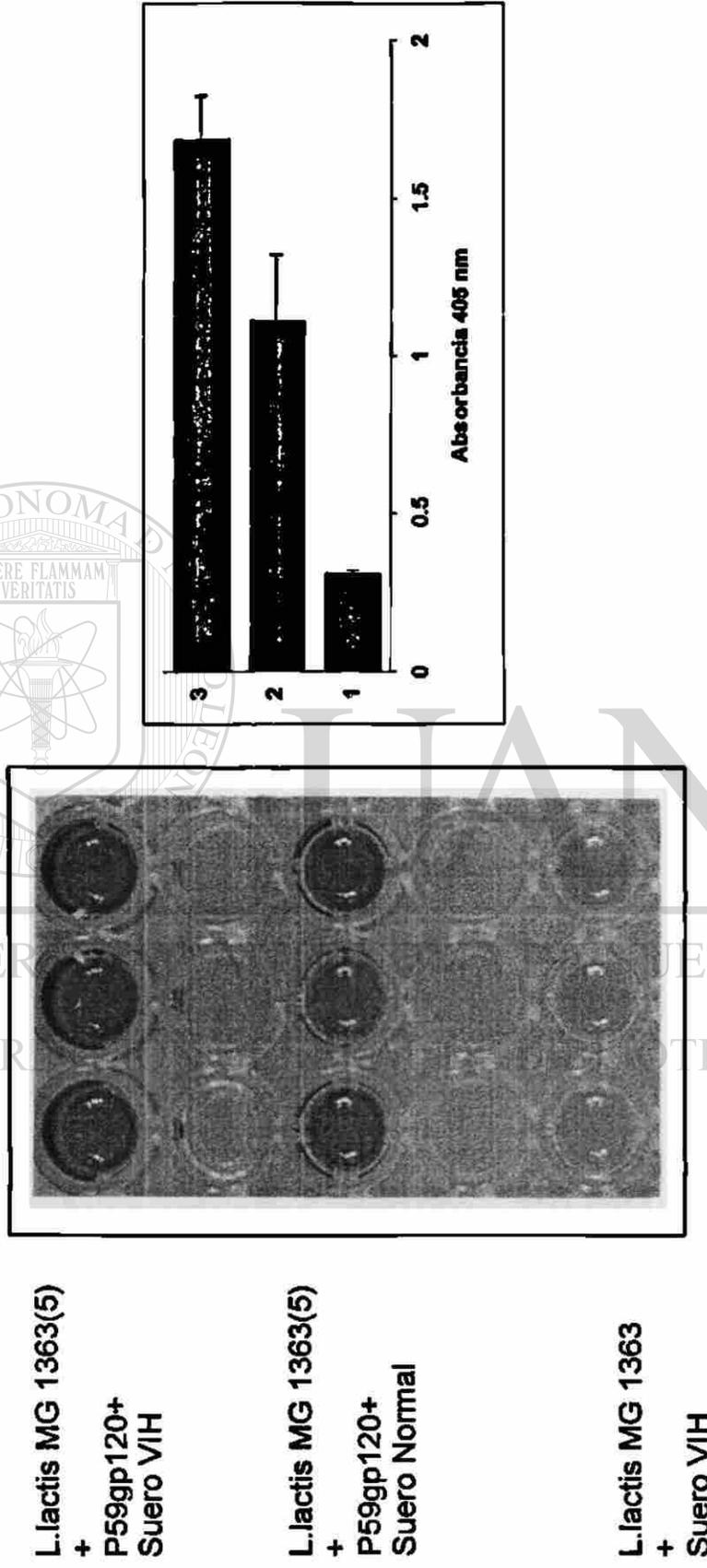
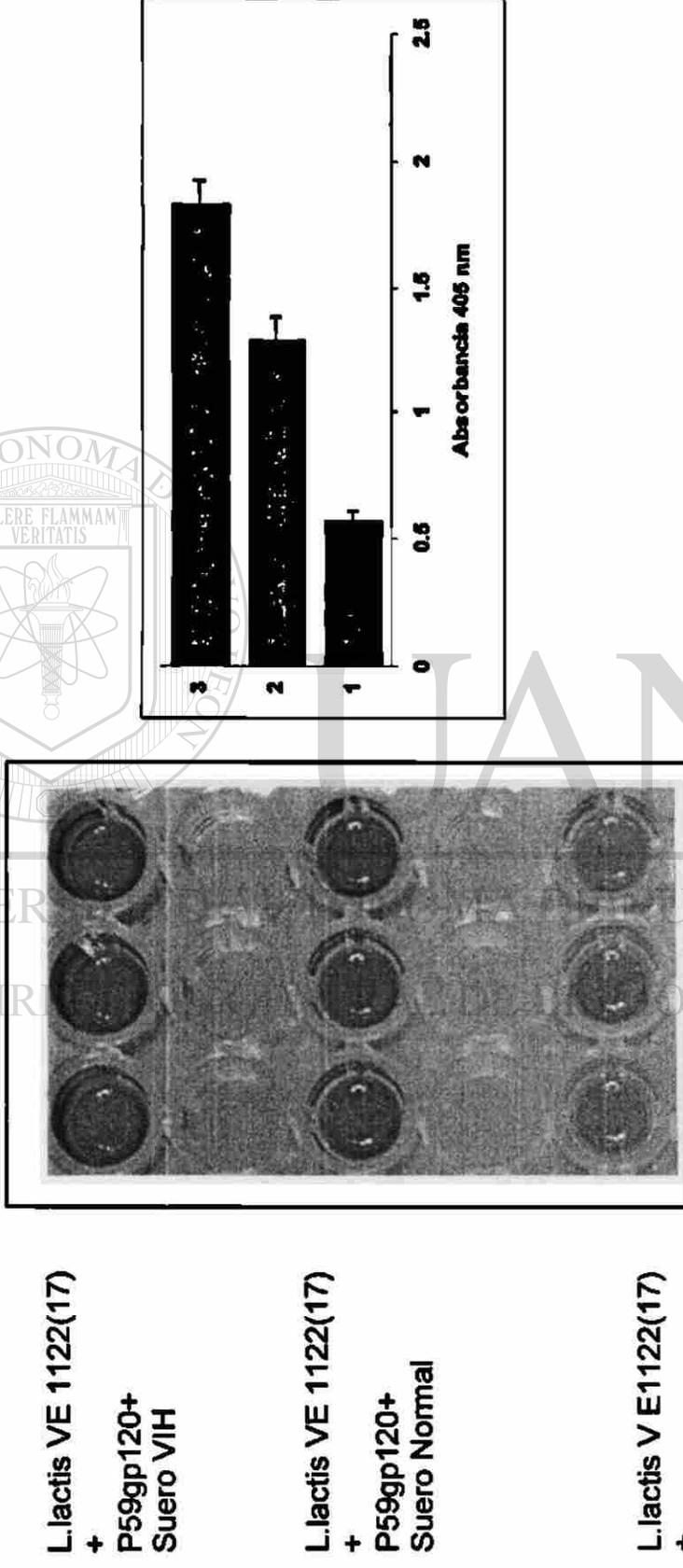


Fig 22. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por WholeCell-ELISA



L. lactis VE 1122(17)
+ P59gp120+
Suero VIH

L. lactis VE 1122(17)
+ P59gp120+
Suero Normal

L. lactis VE 1122(17)
+ Suero VIH

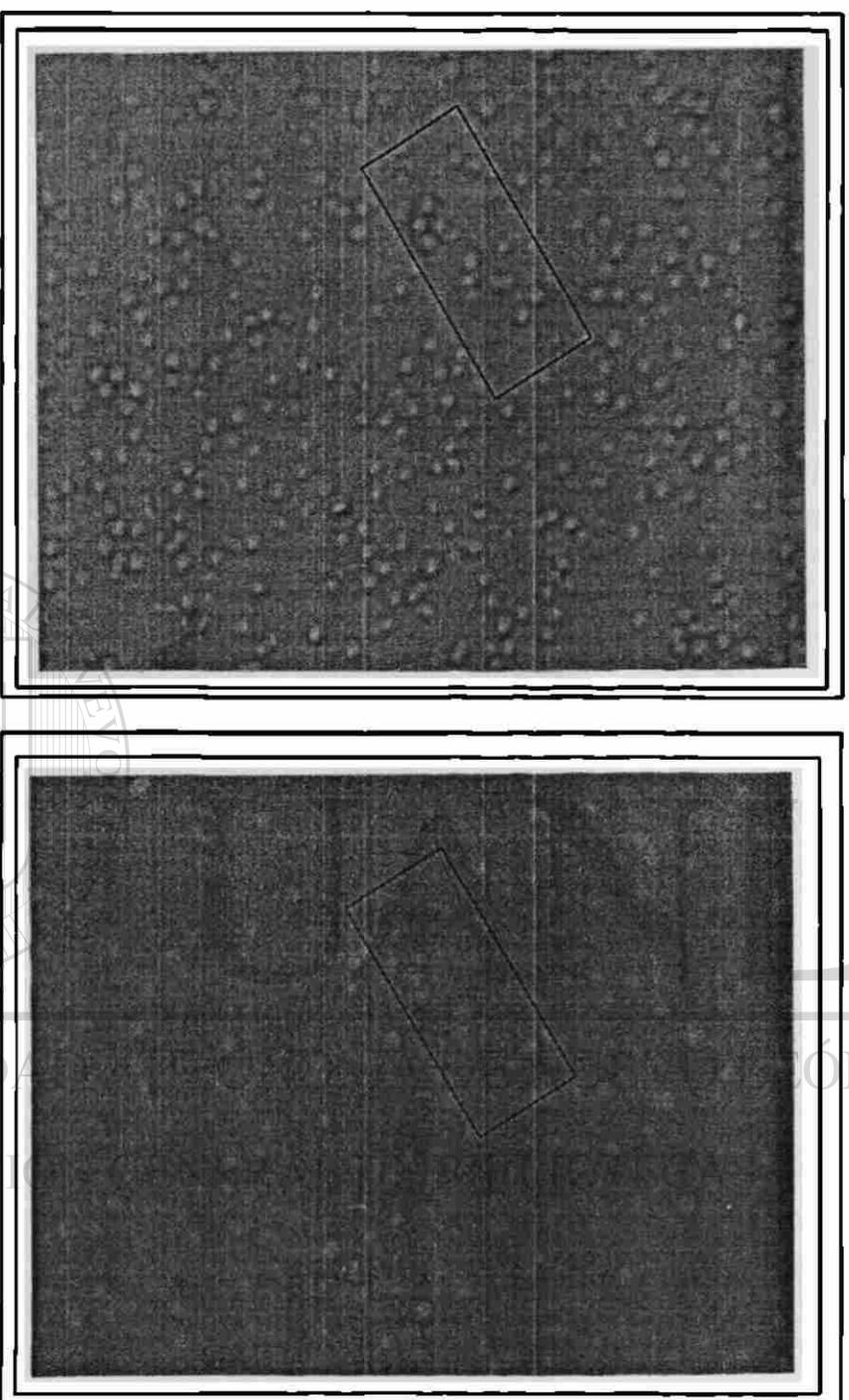
Fig 23. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por WholeCell-ELISA

8.4.2 ANALISIS DE INMUNOFLUORESCENCIA

El Whole-Cell ELISA indicó que la bacteria recombinante que expresa la gp120 detectada por Western blot probablemente tenga la gp 120 anclada en la superficie externa dado el reconocimiento que tiene el suero de un paciente con VIH positivo que fue siempre mayor en los niveles de absorbancia obtenidos. Sin embargo, para tener una demostración más concluyente de la presencia de la gp120 en la superficie externa de *L.lactis* recombinante se realizó un experimento de inmunofluorescencia solamente en la clona 1. Los resultados obtenidos indicaron que el anticuerpo monoclonal comercial contra la gp120 detecta dicha proteína en la superficie de la célula bacteriana viva, como se mostró por la fluorescencia roja del Alexa fluor 594 en mas del 95% de las células bacterianas, lo cual se observa al comparar las células bacterianas presentes en la misma área bajo el campo claro y las células con tinción roja bajo el campo fluorescente (Fig.24 y 25) . Estos datos de inmunofluorescencia indican de manera concluyente que la clona de *L.lactis* seleccionada fue modificada genéticamente para expresar en su superficie celular externa una proteína heteróloga , como lo es la gp 120 de VIH subtipo B. Además se deduce que el gene emme 6 que contiene el fragmento de anclaje a la pared celular de la proteína M es capaz de dirigir adecuadamente y anclar en la pared celular la gp120 en una conformación natural de la proteína.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**L.lactis MG 1363(1) + P59gp120+
Anti-gp120 del HIV monoclonal de raton (CHEMICON)
+ Anti-raton-AlexaFluor594 (Molecular Probes)**

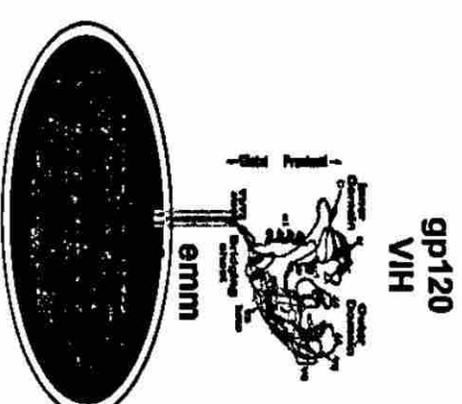
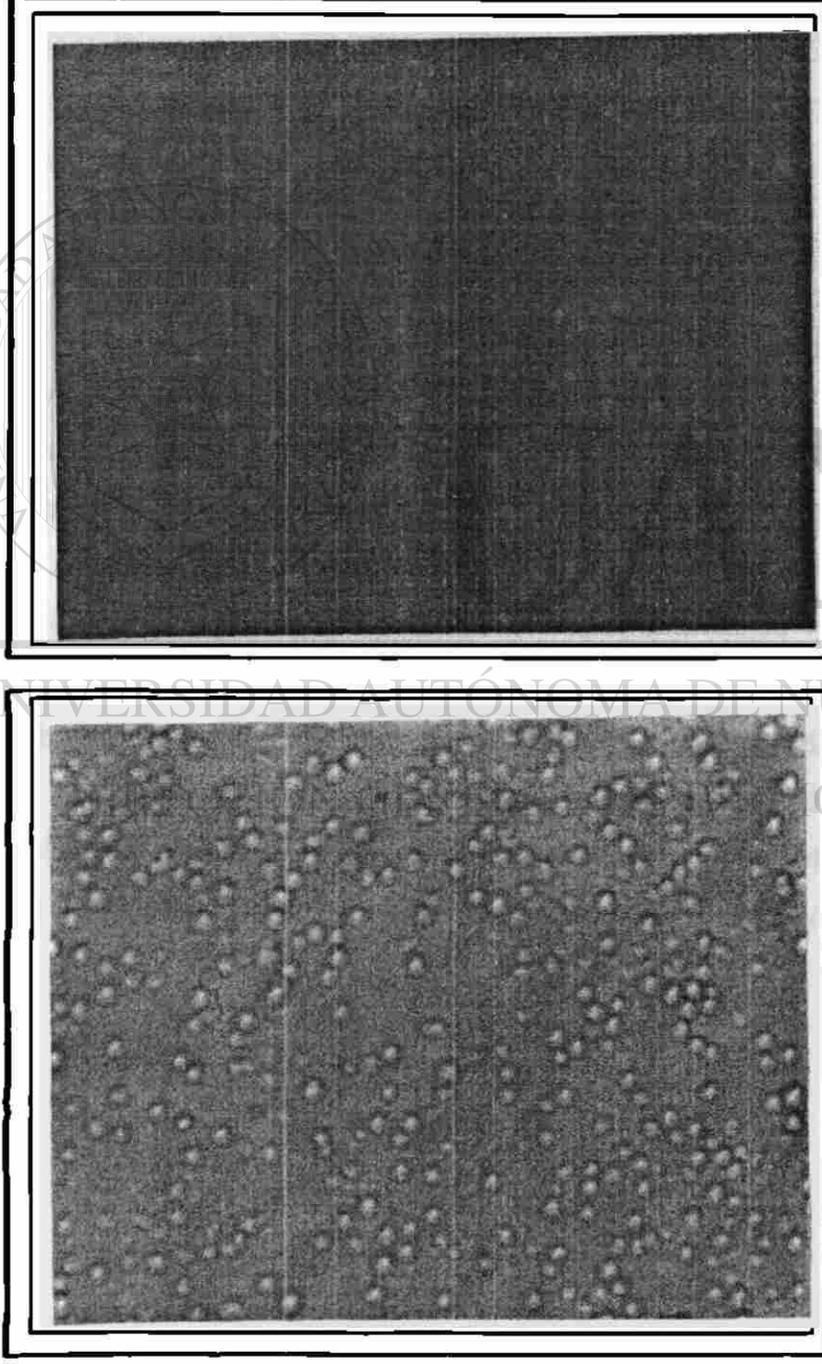


Fig 24. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por Inmunofluorescencia



gp120
VIH



emm



L.lactis MG 1363(1) + P59gp120
+ Anti-gp120 del HIV monoclonal de raton (CHEMICON)
+ Anti-raton-AlexaFluor (Molecular Probes)

Fig 25. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por Inmunofluorescencia

8.5 INDUCCION DE INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR EN MUCOSAS CONTRA VIH CON LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE *L. lactis* RECOMBINANTE.

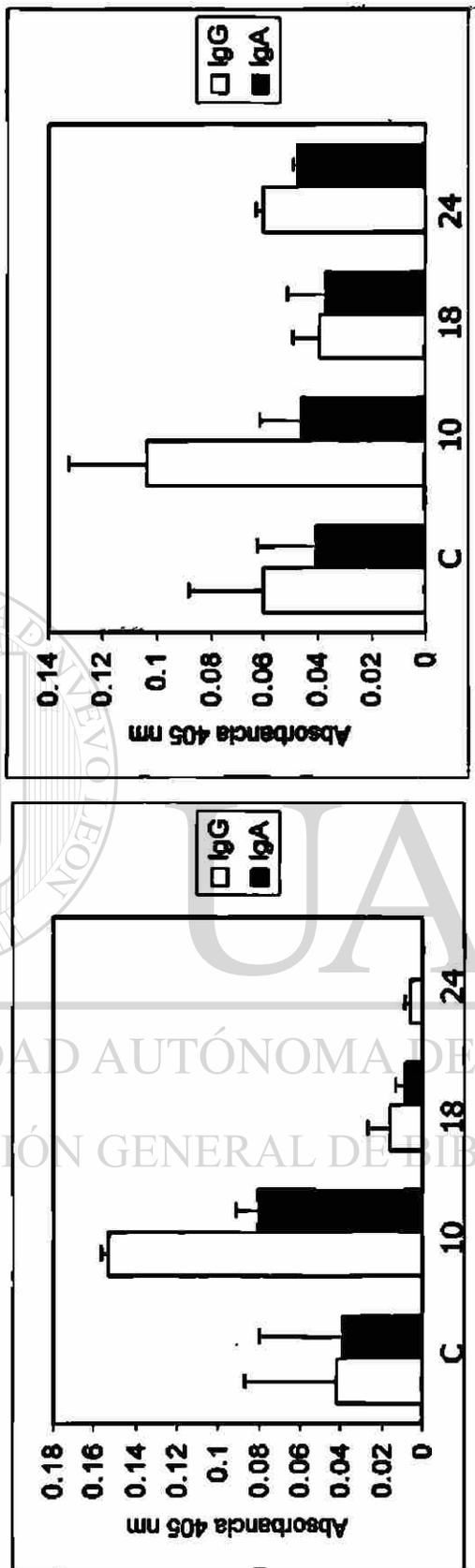
Para determinar si *L.lactis* recombinante que expresa la gp 120 en superficie externa es capaz de inducir inmunidad humoral en mucosas, se realizaron varios experimentos, administrando por vía oral con un catéter de teflón 10^9 bacterias vivas en una sola dosis de *L.lactis* recombinante y en tres dosis a los 0, 14 y 28 días. A diferentes tiempos (10, 18 y 24 días después de la inmunización con una sola dosis y a los 7 días después de la inmunización para los de 3 dosis) se obtuvieron muestras de lavados de mucosas y de suero para medir los niveles específicos de IgG e IgA monomérica contra el VIH usando 2 sistemas de ELISA, uno comercial y otro desarrollado usando como antígeno la bacteria recombinante.

8.5.1 MEDICIÓN DE ANTICUERPOS IgG e IgA EN LAVADO ESTOMACAL, INTESTINAL HECES Y SUERO CONTRA gp 120 POR ELISA

8.5.1.1 ANTICUERPOS EN LAVADO ESTOMACAL:

La detección de IgG e IgA monomérica en los lavados estomacales a los 10, 18 y 24 días después de la inmunización indicó niveles significativamente altos de la IgG en los dos sistemas de ELISA a los 10 días después de la inmunización con respecto al control (promedio de una $n= 3$ ratones a los diferentes tiempos a los que se les administro *L.lactis* normal), mientras que a los otros días los niveles de IgG e IgA fueron bajos o iguales a los controles (Fig.26) De igual manera los niveles de IgG en el lavado estomacal de ratones inmunizados con tres dosis de 10^9 bacterias vivas recombinantes, indica niveles significativamente altos con respecto al control, mientras que los niveles de IgA monomérica no son significativos con respecto al control. (Fig. 27)

Inducción de Inmunidad Humoral Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa

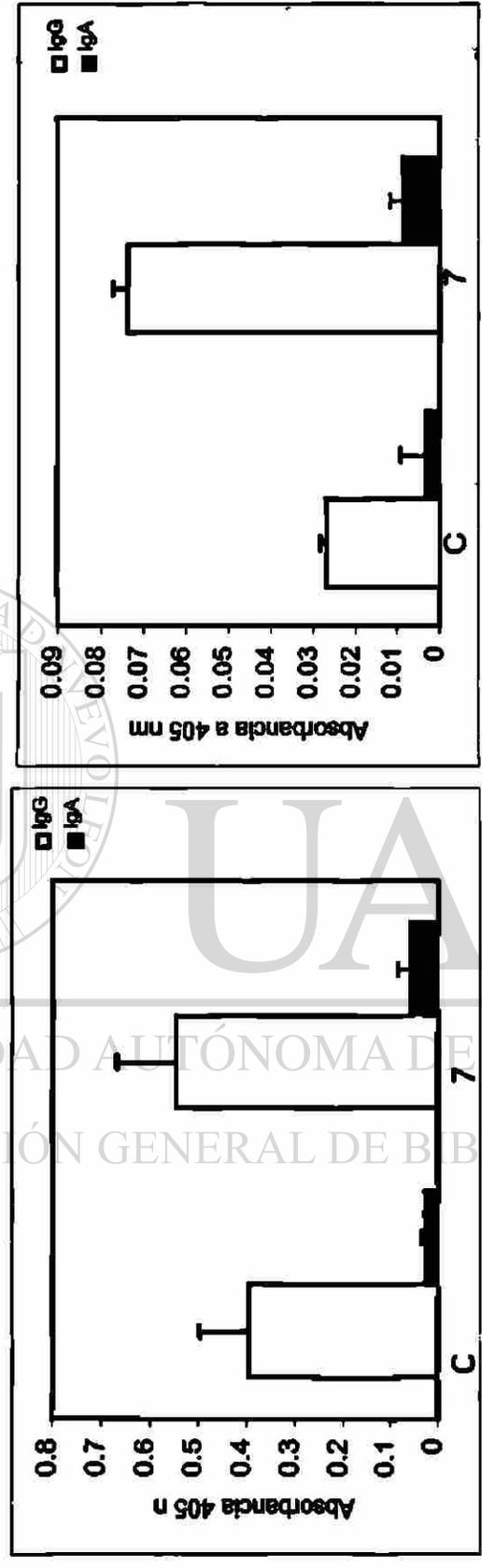


Analisis por ELISA Comercial

Analisis por ELISA con *L. lactis*

Fig. 26 Niveles de Anticuerpos en Lavado Estomacal con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis

Inducción de Inmunidad Humoral Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



Analisis por ELISA Comercial

Analisis por ELISA con *L. lactis*

Fig. 27 Niveles de Anticuerpos en Lavado Estomacal con 10^9 Bacterias en 3 Dosis

8.5.1.2 ANTICUERPOS EN LAVADO INTÉSTINAL:

La detección de IgG e IgA monomérica en los lavados intestinales con los 2 sistemas de ELISA a los 10, 18 y 24 días después de la inmunización Indico también niveles significativamente altos de la IgG a los 10 y 18 días después de la inmunización con el ELISA comercial, mientras que con el ELISA con *L.lactis* la IgG se encuentra elevada solo a los 10 días después de la inmunización. Los niveles de IgA monomérica empiezan a elevarse a los 10 días y son significativamente altos a los 24 días en el análisis por el ELISA comercial, sin embargo solo son significativamente altos a los 10 días después de inmunización en la ELISA con *L.lactis*. (Fig. 28). En cuanto a los niveles de IgG en el lavado intestinal de ratones inmunizados con 3 dosis de bacteria viva recombinante son significativamente altos con respecto al control, la IgA tiene niveles muy bajos y no significativos (Fig. 29).



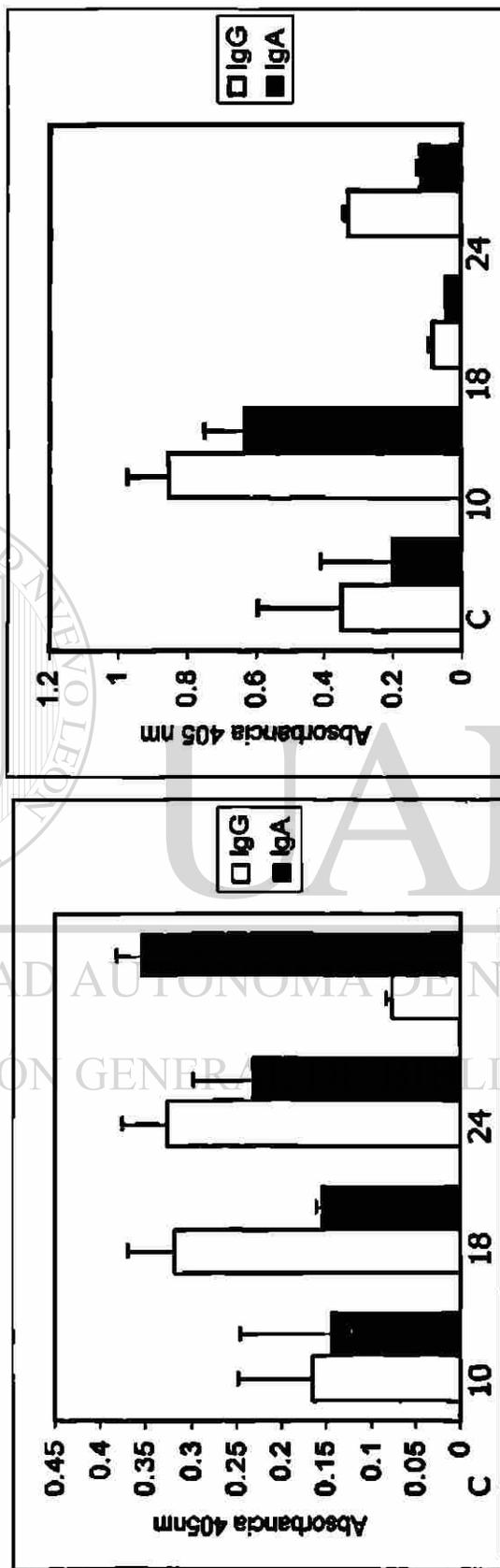
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Inducción de Inmunidad Humoral Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa

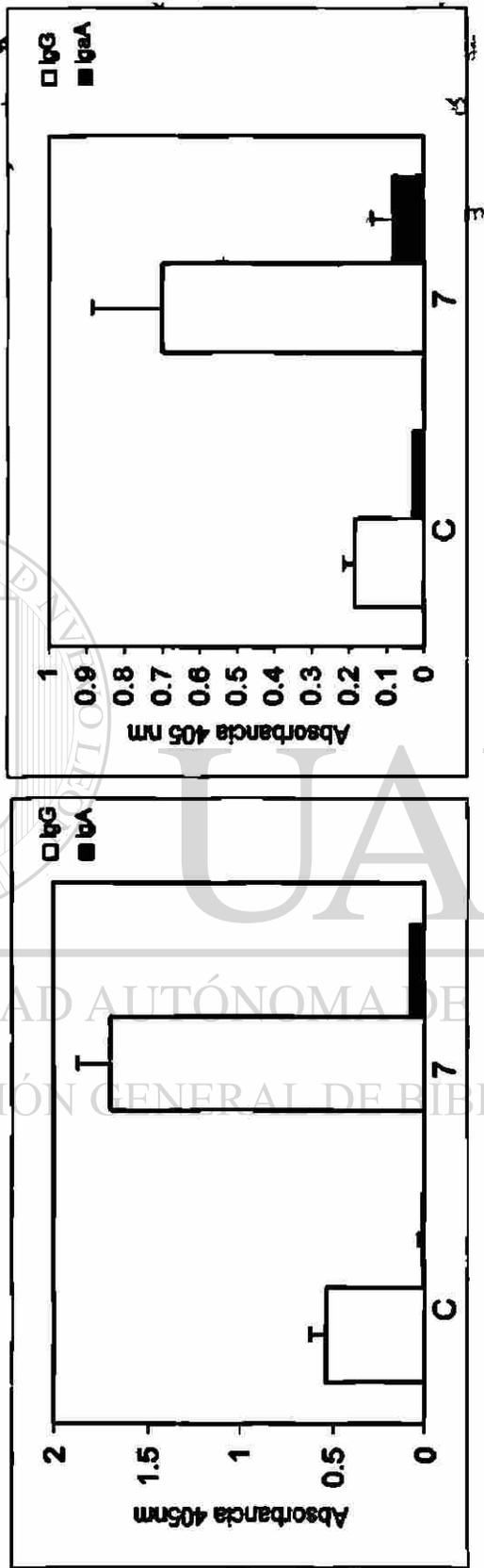


Analisis por ELISA Comercial

Analisis por ELISA con *L. lactis*

Fig. 28 Niveles de Anticuerpos en Lavado Intestinal con 10⁹ Bacterias en una Sola Dosis

Inducción de Inmunidad Humoral Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



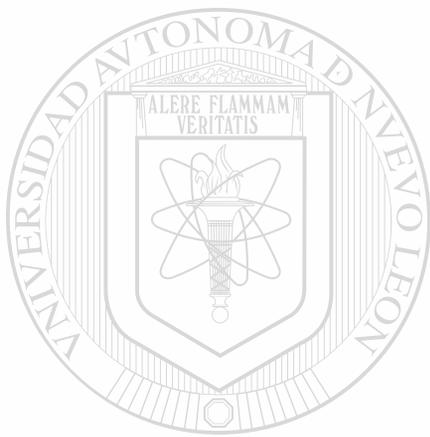
Análisis por ELISA Comercial

Análisis por ELISA con *L. lactis*

Fig. 29 Niveles de Anticuerpos en Lavado Intestinal con 10^8 Bacterias en 3 Dosis

8.5.1.3 ANTICUERPOS EN HECES:

Para el análisis de anticuerpos en heces entre 10 y 12 pellets de heces fueron colectados a los 10, 18 y 24 días después de la inmunización, estos pellets fueron homogeneizados en PBS conteniendo 0.1 M de PMSF como inhibidor de proteasas y este homogeneizado fue clarificado por centrifugación y el sobrenadante fue utilizado en una dilución de 1:50 en los 2 sistemas de ELISA para medir IgG e IgA monomérica. En heces se encontró que solo la IgG parece tener valores significativos en los 2 sistemas de ELISA.(Fig.30) Sin embargo en las muestras de ratones inmunizados con 3 dosis de bacteria recombinante vivas los niveles de IgG no son significativos con respecto al control. (Fig. 31).



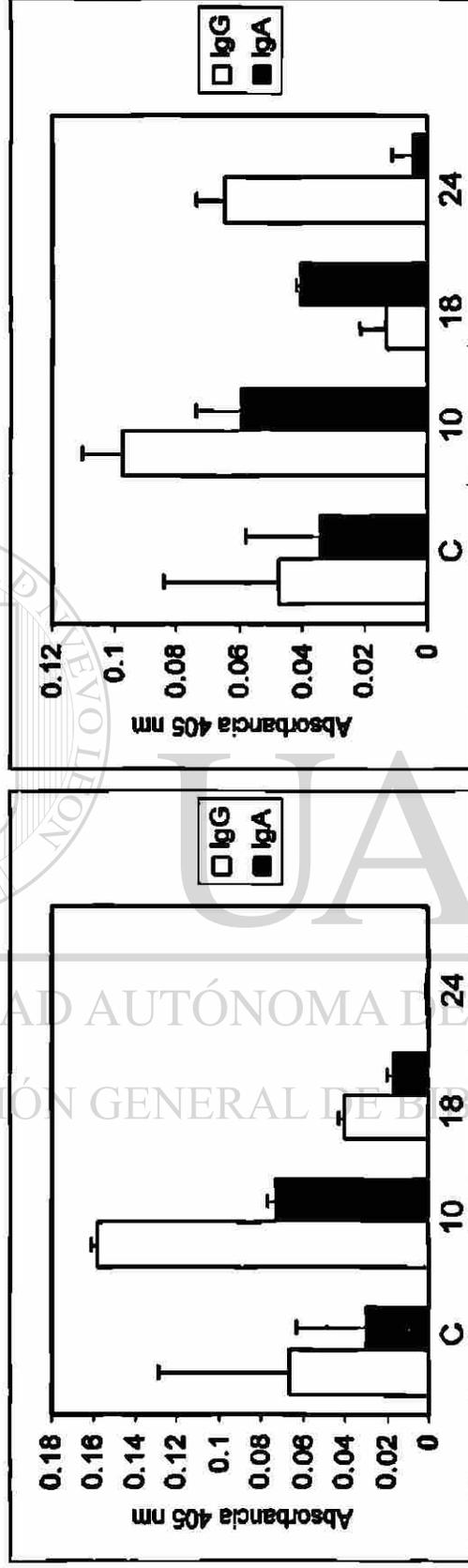
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Inducción de Inmunidad Humoral Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa

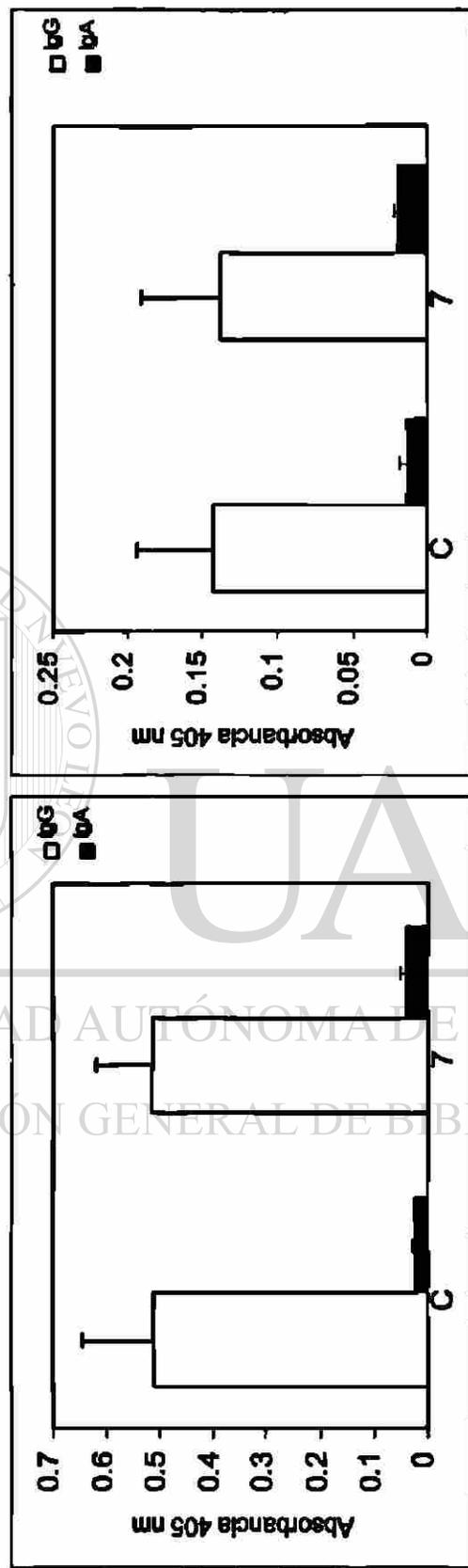


Analisis por ELISA Comercial

Analisis por ELISA con *L. lactis*

Fig. 30 Niveles de Anticuerpos en Heces con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis

Inducción de Inmunidad Humoral Contra el VIH Mediante la Administración de *Lactococcus lactis* Recombinantante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



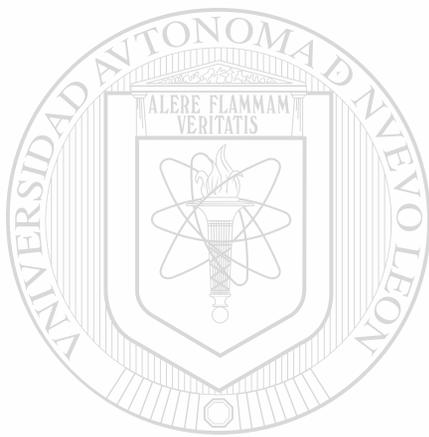
Analisis por ELISA Comercial

Analisis por ELISA con *L. lactis*

Fig. 31 Niveles de Anticuerpos en Heces con 10^8 Bacterias en 3 Dosis

8.5.1.4 ANTICUERPOS EN SUERO:

La detección de IgG e IgA monomérica en suero indica que existen niveles significativos de IgG a los 24 días después de la inmunización en el ELISA con *L.lactis*, mientras que en la ELISA comercial los niveles de IgG son aparentemente altos a los 10 días después de la inmunización. La IgA está elevada en suero a los 10 días en el análisis con el ELISA comercial, mientras que en el ELISA con *L.lactis* con gp 120 solo se detectó niveles aparentemente altos a los 18 días (Fig.32). Los niveles de IgG en los lavados de inmunización con 3 dosis de bacteria recombinante son significativamente altos, con respecto a los del control, mientras los valores de IgA son muy bajos. (Fig. 33).



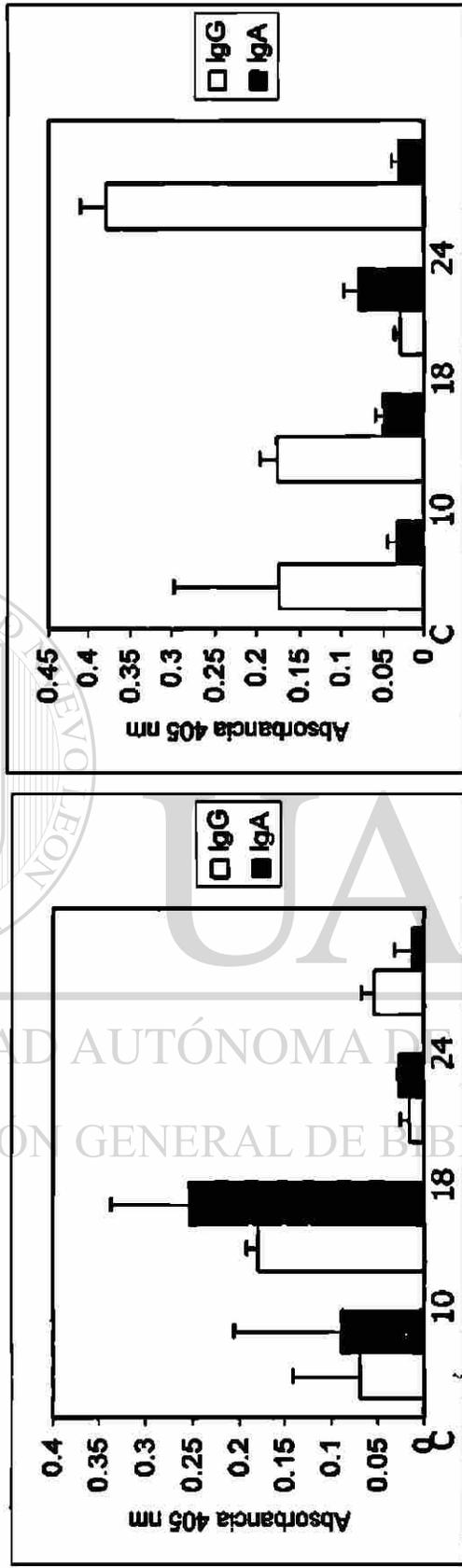
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Inducción de Inmunidad Humoral Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa

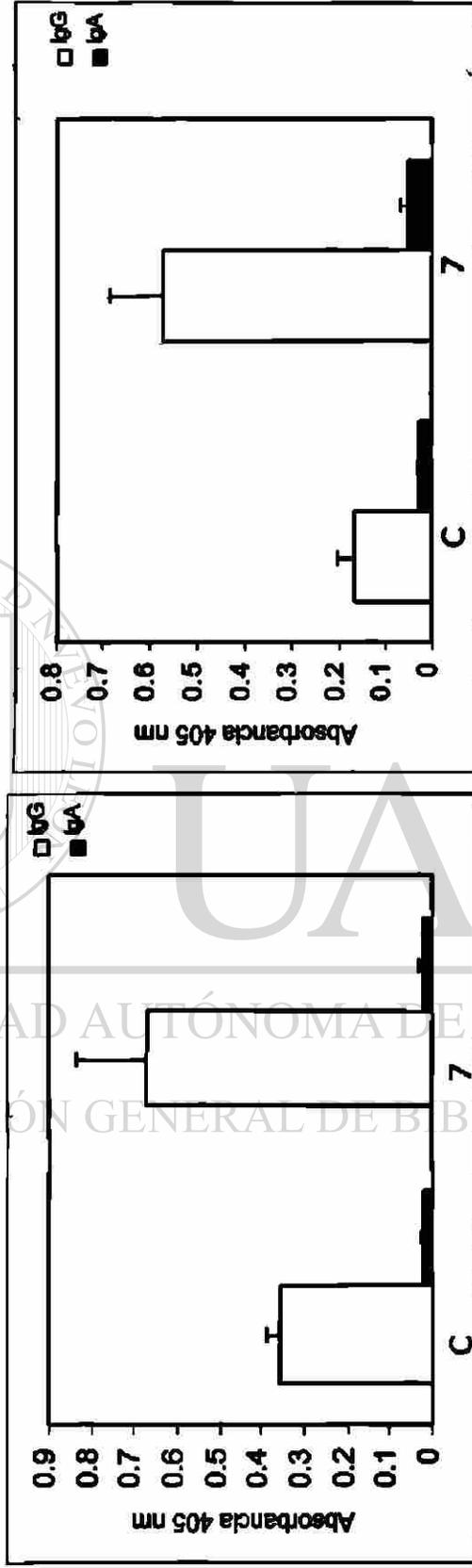


Análisis por ELISA con *L. lactis*

Análisis por ELISA Comercial

Fig. 32 Niveles de Anticuerpos en Suero con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis

Inducción de Inmunidad Humoral Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



Análisis por ELISA Comercial

Análisis por ELISA con *L. lactis*

Fig. 33 Niveles de Anticuerpos en Suero con 10^9 Bacterias en 3 Dosis

8.5.2 OBTENCION DEL ANTIGENO VIH-1

8.5.2.1 DETECCION DEL ANTIGENO VIH-1 POR Western BLOT

Después de la purificación del antígeno VIH-1, este fue cuantificado por el método de Stanford, en el cual se determinó la concentración de $1\mu\text{g/ml}$, para confirmar la presencia de dicho antígeno, se realizó su detección por corrimiento de la proteína en gel de poliacrilamida y posteriormente se realizó un western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-gp120. Los resultados muestran el fuerte reconocimiento del antígeno por medio del anticuerpo anti-gp120, sin embargo también se muestra el reconocimiento de una banda de mayor tamaño (Fig. 34).

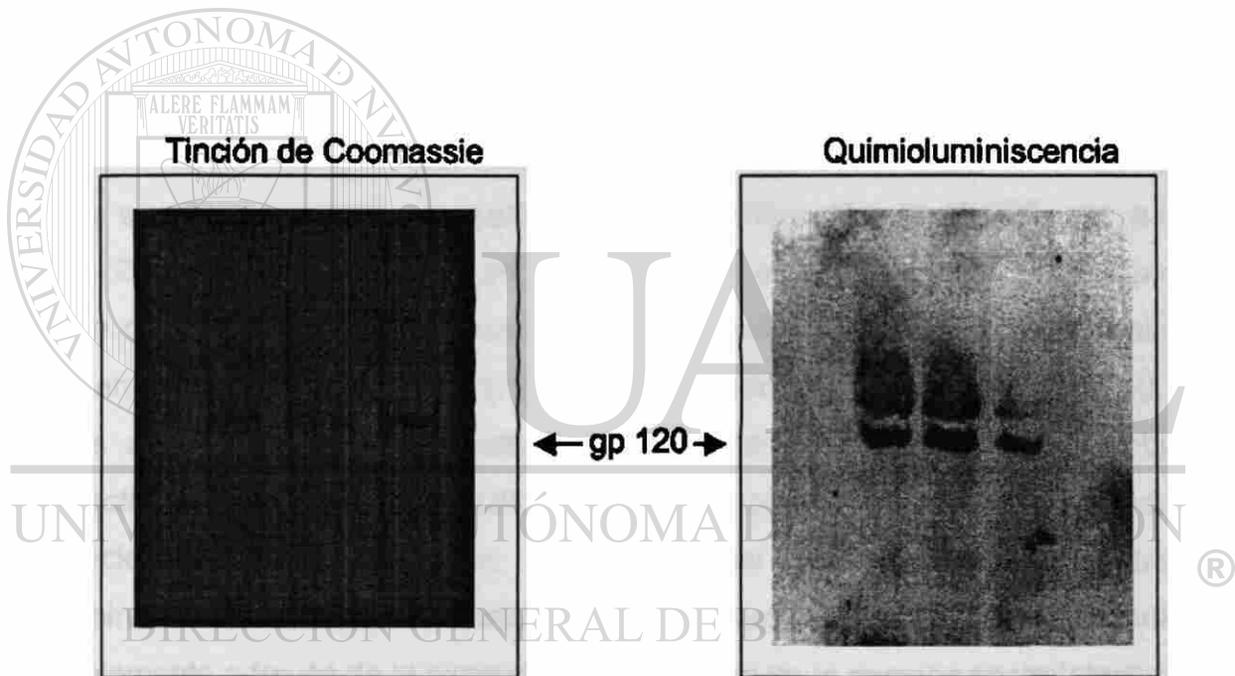


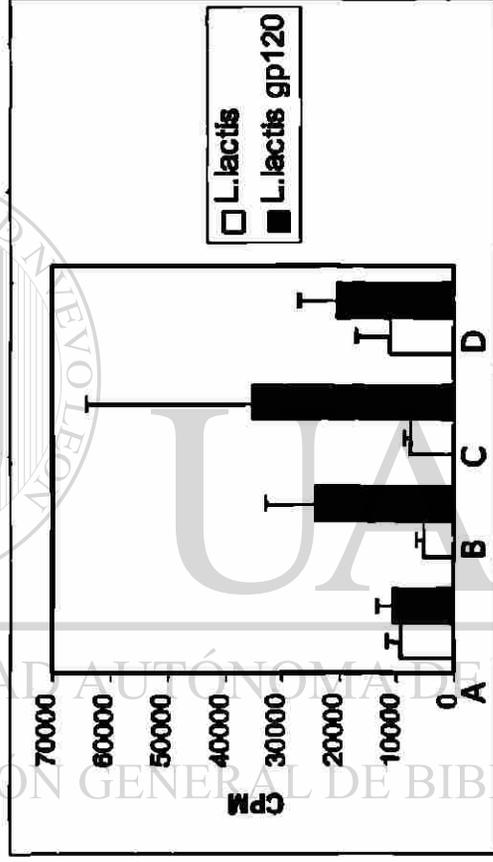
Fig 34.- Detección del Antígenos VIH-1 en Geles de Poliacrilamida y Western Blot .

8.5.3 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

8.5.3.1 ANALISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN LINFOCITOS DE BAZO

Para determinar si la administración oral de la bacteria *L.lactis* recombinante que expresa la gp120 en la superficie externa induce inmunidad celular, se utilizó el ensayo de proliferación de linfocitos midiendo la incorporación de timidina tritiada luego de la estimulación con antígenos del VIH. Los ensayos indican niveles de proliferación elevados, comparados con el control de linfocitos sin estimular, a los 10 días después de la inmunización oral con la bacteria. El estímulo con 1µg y 5µg de antígeno viral mostró un aumento significativo en la proliferación que va de acuerdo a la dosis utilizada, lo cual es indicativo de la especificidad de las clonas de linfocitos estimulados por el antígeno, dado que en los linfocitos de bazo inmunizado con la bacteria normal de *L.lactis* no demostraron este efecto (Fig.35). Los datos obtenidos de los ensayos de proliferación a los días 18 y 24 después de la inmunización muestran el mismo efecto de estimulación específica de linfocitos con 5 µg de antígeno viral, aunque se observa que hay un menor grado de proliferación, de 40,000 cpm a los 10 días a 20,000 a los 18 días (Fig.36) y 8,000 cpm a los 24 días; lo cual indica que el número de clonas de linfocitos sensibles ó específicos al antígeno viral disminuyen considerablemente en el tiempo. (Fig.37). Estos datos de proliferación a los 10, 18 y 24 días después de la inmunización, en conjunto indican que la bacteria recombinante de *L.lactis* que expresa la gp 120 administrada por vía oral es capaz de inducir la generación de linfocitos sensibles a la gp 120 del VIH. Indicando que la bacteria recombinante induce inmunidad celular sistémica cuando es administrada por vía oral, probablemente a través de la expresión del antígeno en la mucosa gastrointestinal. Con respecto a los niveles de proliferación en linfocitos de ratones inmunizados con 3 dosis de bacterias 1×10^9 vivas recombinantes, los resultados indican que no hay diferencia significativa en los niveles de proliferación en los linfocitos sin estimular y los estimulados con 1 µg de antígeno del VIH. Sin embargo, cuando se estimulan los linfocitos con 5 µg de antígeno, se observó una proliferación elevada con respecto al control, aunque los niveles de proliferación son menores a los obtenidos inmunizando con una sola dosis de 10^9 bacterias. (Fig.38).

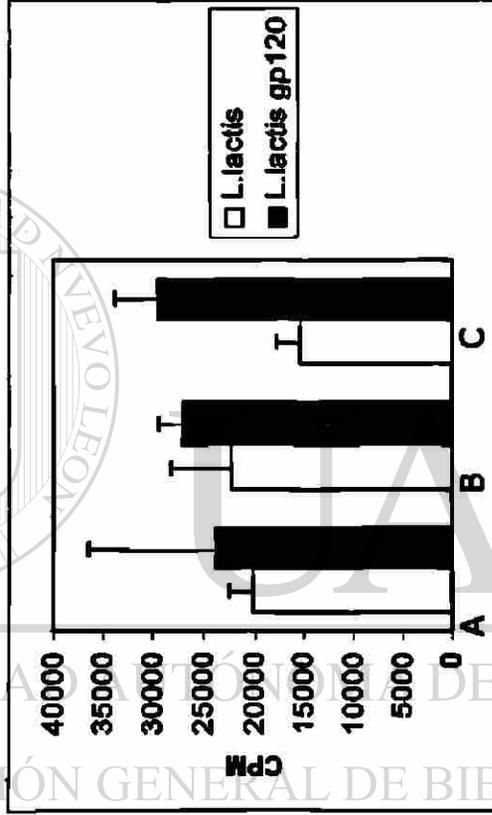
Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



- A.- Linfocitos Sin Estimular
- B.- Linfocitos + 1 ug de Antígeno Viral
- C.- Linfocitos + 5 ug de Antígeno Viral
- D.- Linfocitos + ConA

Fig. 35 Ensayo de Proliferación con Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 10 Días Después de la Inmunización con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis

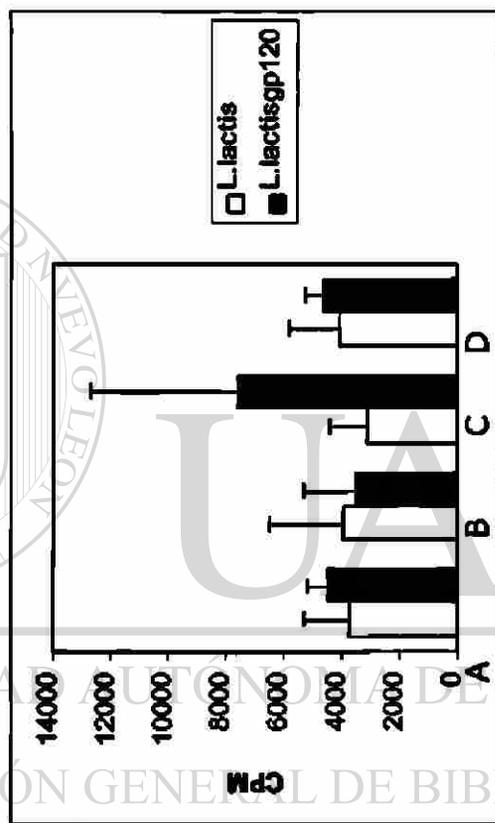
Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



A.- Linfocitos Sin Estimular
B.- Linfocitos + 5 ug de Antígeno Viral
C.- Linfocitos + Con A

Fig 36. Ensayo de Proliferación con Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 18 Días Después de la Inmunización con 10^9 Bacterias en una Sola Dosis

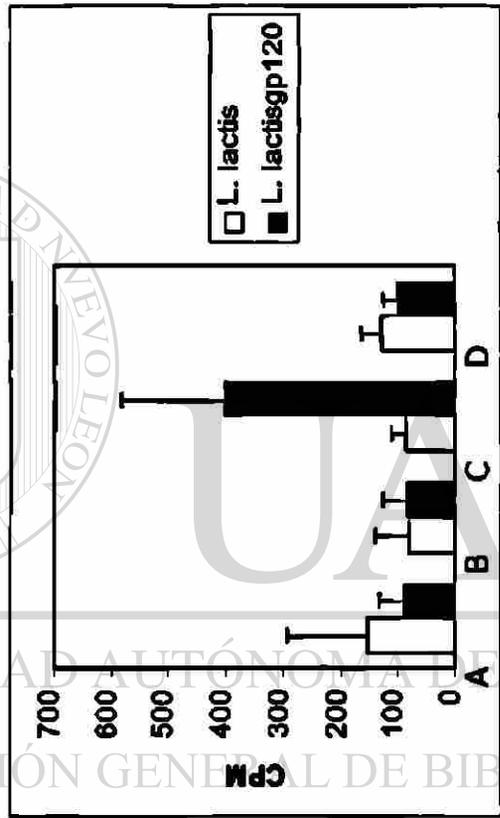
Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



- A.- Linfocitos Sin Estimular
- B.- Linfocitos + 1 ug de Antígeno Viral
- C.- Linfocitos + 5 ug de Antígeno Viral
- D.- Linfocitos + ConA

Fig 37. Ensayo de Proliferación con Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 24 Días Después de la Inmunización con 10^8 Bacterias en una Soja Dosis

Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



- A.- Linfocitos Sin Estimular
- B.- Linfocitos + 1 ug de Antígeno Viral
- C.- Linfocitos + 5 ug de Antígeno Viral
- D.- Linfocitos + ConA

Fig 38. Ensayo de Proliferación con Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 7 Días Después de la Inmunización con 10^8 Bacterias en 3 Dosis..

8.5.4 ANÁLISIS HISTOLOGICO DE LOS EPITELIOS EN ESTOMAGO E INTESTINO DELGADO

Con el objetivo de determinar si *L. lactis* recombinante produce alteraciones morfológicas en la mucosa, que sean indicativos de posible daño en ésta, se realizaron cortes histológicos de mucosa estomacal e Intestinal. El análisis histológico de las mucosas en el estomago a los 10, 18 y 24 días después de la administración oral de *L. lactis* normal como control y *L. lactis* recombinante, indicó que no existen diferencias histológicas en los epitelios donde se administro la bacteria normal y recombinante. La organización celular de los epitelios no mostró alteraciones histológicas significativas derivadas de un proceso inflamatorio o derivada de algún daño celular por la administración de grandes cantidades de bacteria a la mucosa del estomago (Fig. 39)

Por lo que respecta a la mucosa intestinal, tampoco se encontraron signos que indicaran daño o alteraciones a los epitelios intestinales (Fig.40).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

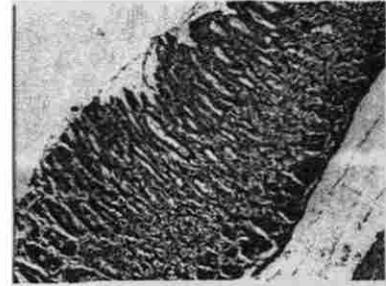
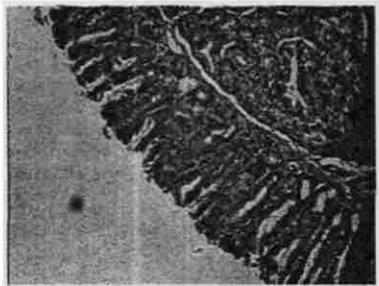


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

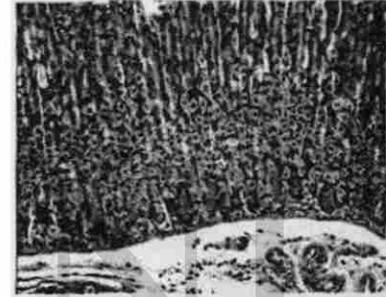
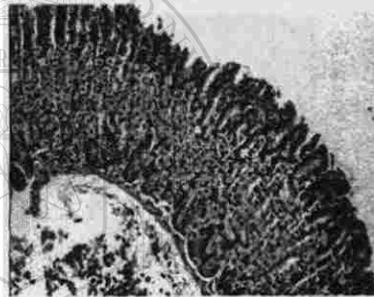
Control
(*L. lactis* normal)

Inmunizado
(*L. lactis* gp 120)

a)



b)



c)

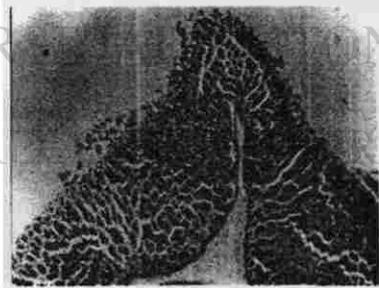
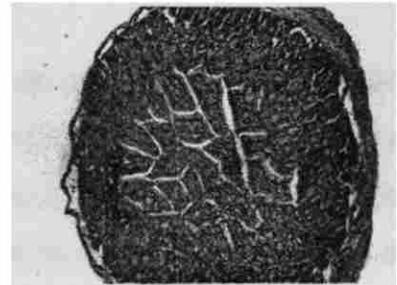
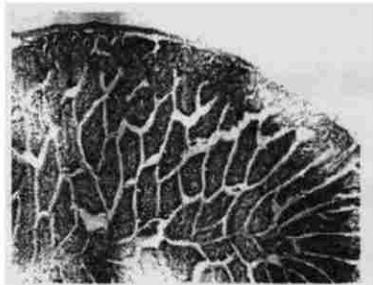


Fig. 39. Cortes Histológicos de la Mucosa del Estomago Teñidos con Hematoxilina y Eosina. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 (a), 18 (b) y 24 (c) días después de la administración oral de la bacteria normal y recombinante a una dosis de 10^9 .

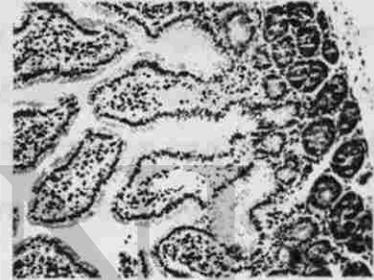
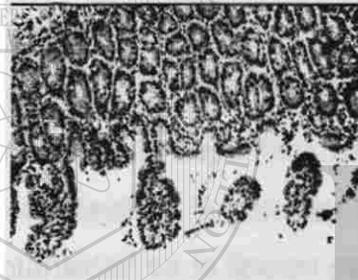
Control
(*L. lactis* normal)

Inmunizado
(*L. lactis* gp120)

a)



b)



c)

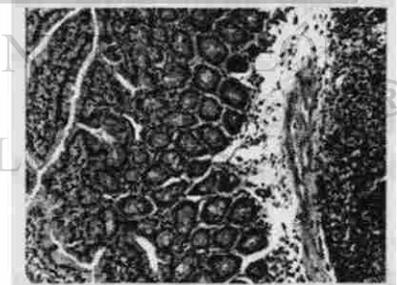
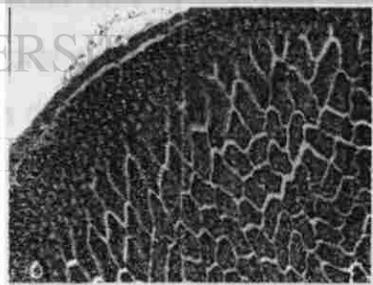


Fig 40. Cortes Histológicos de la Mucosa del Intestino Delgado Teñidos con Hematoxilina y Eosina. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 (a), 18 (b) y 24 (c) días después de la administración oral de la bacteria normal y recombinante a una dosis de 10^9 .

8.5.5 DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD4 Y MAC EN LA MUCOSA DEL ESTOMAGO E INTESTINO DELGADO POR INMUNOHISTOQUIMICA.

Hemos encontrado que la administración oral de *L.Lactis* que expresa la gp120 induce inmunidad humoral y celular a nivel local y sistémico, dicha inmunidad debe ser el resultado de la activación de linfocitos asociados al tejido linfoide de la mucosa del estomago e intestino.

Esta inducción de Inmunidad local debe ser acompañada de cambios en los linfocitos asociados a las mucosas, por esta razón realizamos la detección por inmunohistoquímica de la expresión de marcadores de linfocitos T(CD4) y macrófagos o monocitos (Mac). Se encontró un incremento significativo de la expresión de CD4 en la mucosa del estomago e intestino de los ratones inmunizados con *L.Lactis* recombinante a los 10 días, mientras que en las mucosas de los ratones a los que se les administro la *L.Lactis* control (normal), la expresión de CD4 fue significativamente menor (Fig. 41 y 42). Cuando comparamos la intensidad de señal y cantidad de células que expresan la tinción específica para CD4, observamos diferencias muy claras entre el estomago e intestino, la mucosa intestinal mostró una mayor cantidad de células y una mayor intensidad de la tinción para CD4 (Fig. 41 y 42).

Este incremento selectivo en la expresión de CD4 en la mucosa intestinal de los ratones tratados con la bacteria recombinante, se asocia con la mayor respuesta inmune humoral y celular obtenida a los 10 días después de la inmunización.

La expresión de Mac también fue significativamente mayor en la mucosa del estomago e intestino de los ratones tratados con la bacteria recombinante, comparado con los que recibieron la bacteria normal (Fig. 43 y 44).

Estos datos en conjunto indican que la inducción local de inmunidad humoral y celular contra la gp120 con *L.Lactis* recombinante se asocia a un incremento significativo en la expresión de CD4 y Mac en las mucosas.

Control
(*L. lactis* normal)

Inmunizado
(*L. lactis* gp120)



Fig. 41. Detección de la Expresión de CD4 por Inmunohistoquímica en la Mucosa del Estomago. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 días después de la administración oral con una dosis de 10^9 bacterias.

Control
(*L. lactis* normal)

Inmunizado
(*L. lactis* gp120)

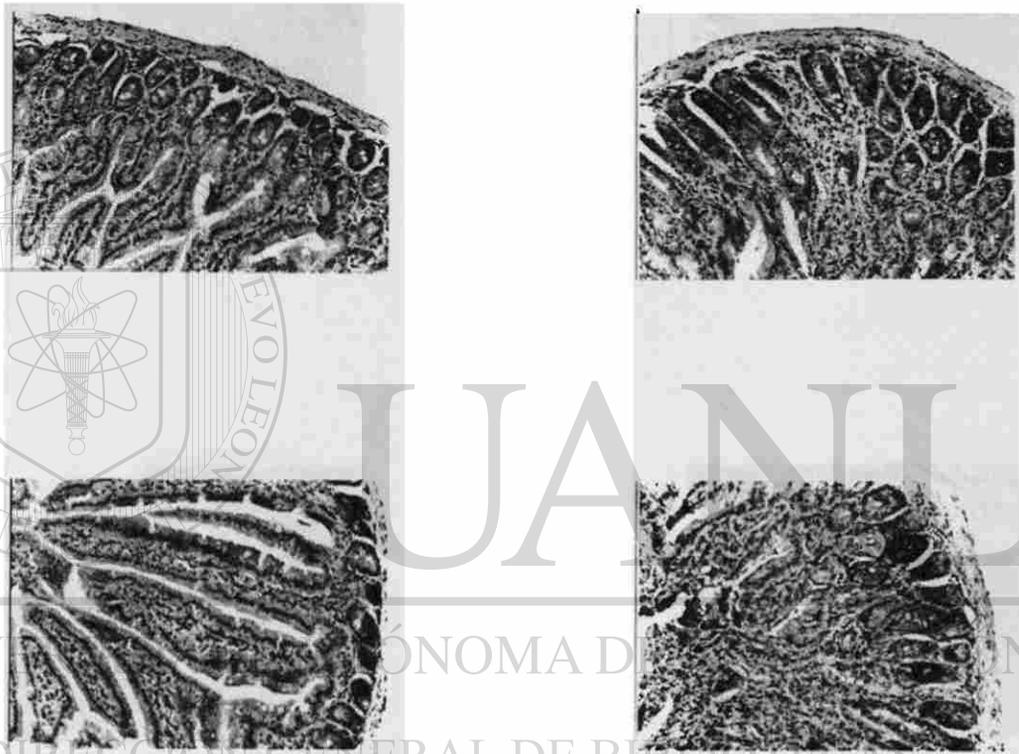
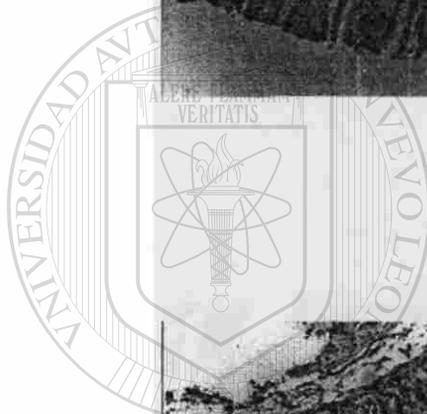
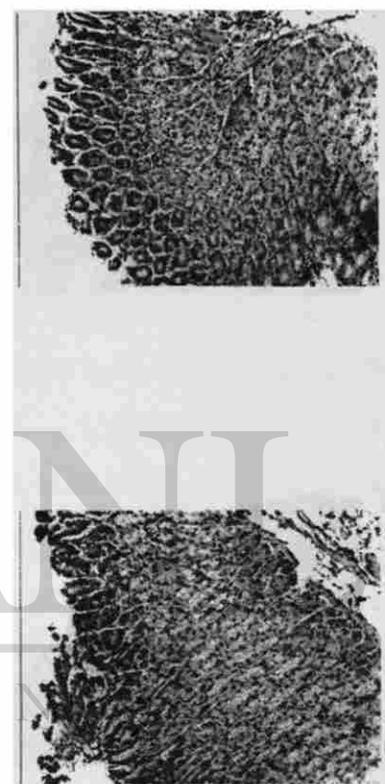
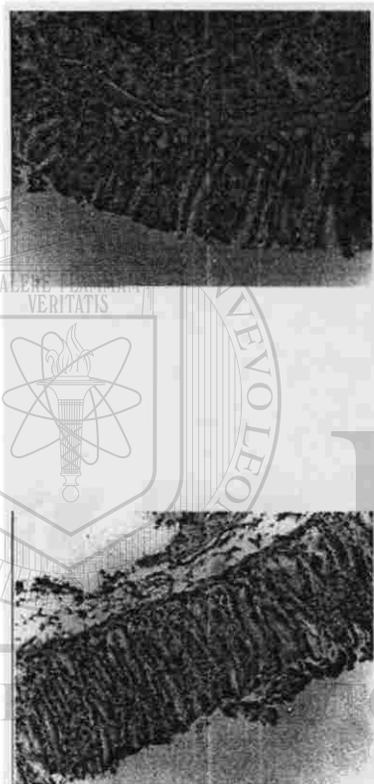


Fig. 42. Detección de la Expresión de CD4 por Inmunohistoquímica en la Mucosa Intestinal. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 días después de la administración oral con una dosis de 10^9 bacterias.

Control
(*L. lactis* normal)

Inmunizado
(*L. lactis* gp120)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig 43. Detección de la Expresión de Mac por Inmunohistoquímica en la mucosa del Estomago. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 días después de la administración oral con una dosis de 10^9 bacterias.

Control
(*L. lactis* normal)

Inmunizado
(*L. lactis* gp120)

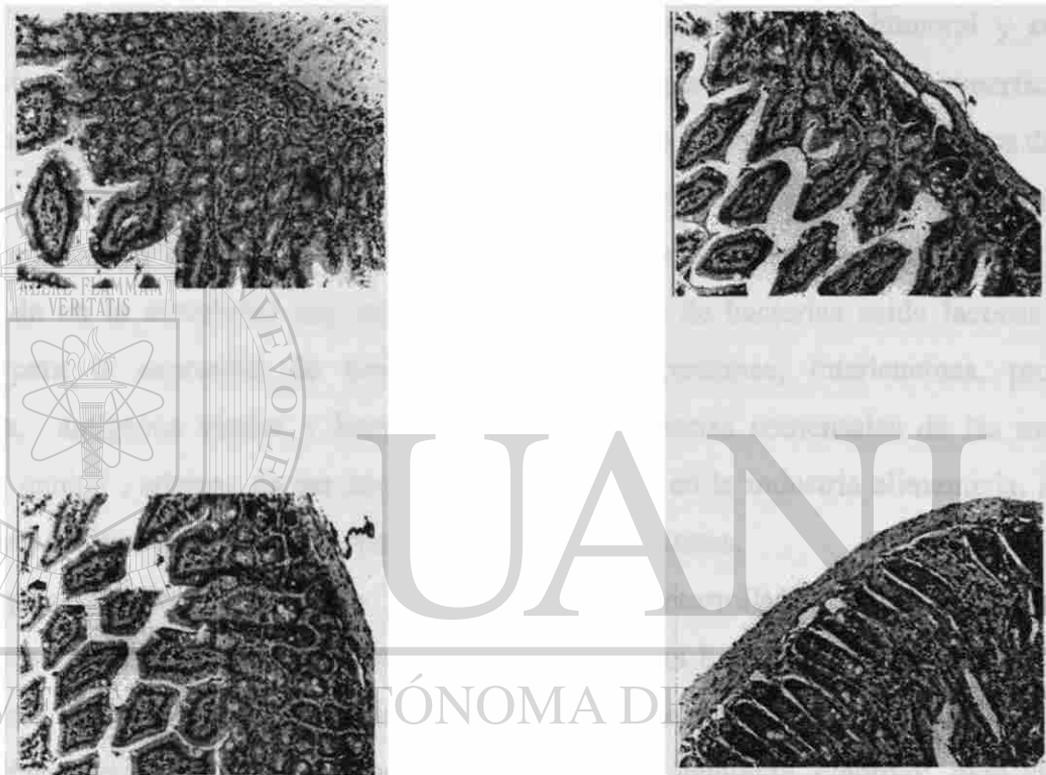


Fig 44. Detección de la Expresión de Mac por Inmunohistoquímica en la T Mucosa Intestinal. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 días después de la administraciom oral con una dosis de 10^9 bacterias.

CAPITULO 9

DISCUSIONES

El VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) es el agente causal del SIDA, el cual es un grave problema a nivel mundial. En México, se tienen registrados 50,713 casos hasta el 30 de Septiembre del 2000 (Secretaría de Salud). Debido a la severidad de esta enfermedad es urgente el desarrollo y aplicación de una vacuna. Hoy en día se han desarrollado algunos candidatos a vacunas como proteínas recombinantes del virus, pseudoviriones, vectores recombinantes y vacunas de ADN, sin embargo no se cuenta con una vacuna segura y efectiva, uno de los principales problemas de estas vacunas es la inducción de inmunidad humoral y celular. Virtualmente todas las infecciones por VIH tienen como puerta de entrada las superficies de mucosas, la cual cuenta con propiedades y funciones diferentes que en muchos aspectos difieren del sistema inmune sistémico, por lo anterior es necesario el desarrollo de vacunas que induzcan inmunidad y protección en las mucosas por ser el sitio principal de entrada del virus. Por otro lado en la actualidad hay un gran auge en el uso de bacterias ácido lácticas como vehículos para la expresión de proteínas heterólogas (enzimas, interleucinas, proteínas terapéuticas, antígenos virales y bacterianos) por ser bacterias comensales de las mucosas intestinal y genital, además de ser ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, lo cual las convierte en los vectores ideales para el desarrollo de vacunas.

El propósito de la presente investigación fue desarrollar bacterias ácido-lácticas comestibles modificadas genéticamente para generar vacunas basadas en vectores bacterianos vivos, seguros e inoctrinos capaces de inducir inmunidad humoral y celular contra el VIH en las mucosas. Para desarrollar nuestra vacuna, se planteó el siguiente objetivo: Inducción de inmunidad contra VIH utilizando *L. lactis* como vector de expresión del antígeno gp 120 del VIH en mucosas. Para cubrir nuestros objetivos, la estrategia experimental que se siguió, fue primero amplificar por PCR el gen de la gp120 del VIH-1 por medio del diseño de iniciadores específicos. (Gene Bank KO3455), Utilizamos al ADN del plasmido pSFV1, el cual fue previamente caracterizado para demostrar que contiene clonado el gen de la gp120 en el sitio Bam H I (Fig 14). El producto de la amplificación fue purificado por el sistema Gene-Clean II y clonado utilizando el sistema pGEM-T en el cual después de realizar la ligación, seleccionamos un grupo de varias clonas resultantes de la transformación y realizamos un miniprep rápido para chequear los plasmidos que lo contenía (Fig 16), obteniendo 2 clonas que mostraron un plasmido de un tamaño más grande del plasmido pGEM-T, el cual era aproximado al peso del plasmido

con el fragmento clonado de 1447 pb. De estas dos clonas purificamos el ADN por mini prep y checamos el tamaño específico del plasmido resultante, el cual fue de 4447 pb, 3000 pb del vector y 1447 del fragmento clonado (gen de la gp120, Fig 17). Esta clona que contenía el gen gp 120 del VIH fue caracterizado con las enzimas Apa I y Xho I para demostrar la liberación del fragmento de 1447 pb, y a este plasmido caracterizado se le llamo pGEMTgp120. (Fig. 18) Posteriormente el plasmido se purificó para subclonarlo en el vector de expresión pIL1252:P59:emm6, digerido previamente con las mismas enzimas de restricción, este vector contiene el promotor P59 el cual es específico para *L.lactis* y la expresión de la proteína de anclaje M de *S. Pyogenes*. Este sistema ha sido ampliamente caracterizado y utilizado en la expresión de varias proteínas en superficie (Fischetti, V. 1996). Después se transformó a *L. lactis* con el vector por electroporación. Las clonas resultantes de la transformación de *L.lactis* fueron verificadas por PCR en colonia para determinar la presencia del gen de la gp120 en *L.lactis*.(Fig. 19). Teniendo la construcción deseada del vector P59gp120 en *L.lactis*, se llevó a cabo el análisis de la expresión de la proteína recombinante gp 120 producida en *L. lactis* por medio de Western Blot, el cual mostró la presencia de una sola proteína del tamaño esperado en varias clonas de *L.lactis*, mientras que en las líneas donde se colocaron los extractos proteicos de las cepas control de *L.lactis* no se detecto banda alguna , por los resultados obtenidos aparentemente una clona tiene mayor nivel de expresión que las otras clonas de *L.lactis* analizadas. Lo cual nos confirma la presencia y expresión del gen de la gp 120 (Fig 20), sin embargo no confirma si la expresión de la proteína es en la superficie externa , por medio de la fusión a la proteína de anclaje a pared M, así que realizamos un Whole cell ELISA, la cual utiliza células bacterianas vivas completas para realizar sobre ellas una reacción de ELISA, utilizando suero de paciente VIH positivo por PCR y positivo para anticuerpos contra el virus por un ELISA comercial, también se uso un suero de un individuo negativo para VIH, como control. Los resultados obtenidos son que la clona de *L.lactis* recombinante reacciono significativamente con el suero del paciente con VIH (Absorbancia de 1.8), mientras que la reacción por este sistema de ELISA con un suero normal tuvo una absorbancia 1.1 aproximadamente, de estos datos se deduce que la bacteria recombinante presenta adecuadamente la gp 120 en su superficie y esta es reconocida por los anticuerpos de un paciente con VIH generados en la infección natural , lo cual puede indicar que *L.lactis* recombinante muestra en su superficie externa una gp120 con una conformación similar a la que muestra el virus durante el proceso de infección natural. El reconocimiento del suero del paciente en VIH a la bacteria sin transformar (*L.lactis* MG1363) fue significativamente

menor en los niveles de absorbancia mostrados ; indicando posiblemente la presencia de anticuerpos contra la bacteria láctica solamente (Fig 21). Para tener una demostración más concluyente de la presencia de la gp120 en la superficie externa de *L.lactis* recombinante se realizó un experimento de Inmunofluorescencia, los resultados obtenidos indicaron que el anticuerpo monoclonal comercial contra la gp120 detecta dicha proteína en la superficie de la célula bacteriana viva , como se mostró por la fluorescencia roja del Alexa fluor en la Fig 24. Los sistemas de whole-cell ELISA e inmunofluorescencia también han sido utilizados para determinar la expresión de proteínas en superficie, un ejemplo es el de la proteína gp120 expresada en la superficie de *E. coli*.(Kwak, YD. 1999). Estos datos de inmunofluorescencia indican de manera concluyente que la clona de *L.lactis* seleccionada fue modificada genéticamente para expresar en su superficie celular externa una proteína heteróloga , como lo es la gp 120 de VIH subtipo B. Además se deduce que el gene emme 6 que contiene el fragmento de anclaje a la pared celular de la proteína M es capaz de dirigir adecuadamente y anclar en la pared celular la gp120 en una conformación natural de la proteína. De hecho este sistema de anclaje es ampliamente utilizado en la expresión de proteínas heterólogas en superficie por medio de la proteína de anclaje M de *S.pyogenes*, (Piard,J.C 1996), así como la proteína A de *S.aureus*.

Teniendo la cepa de *L.lactis* recombinante y habiendo demostrado la expresión de la proteína de la gp 120 en la superficie externa, el siguiente paso fue determinar si *L.lactis* recombinante es capaz de inducir inmunidad humoral en mucosas, para lo que realizamos varios experimentos, en donde se inmunizaron 3 grupos de ratones, administrando por vía oral con un catéter 10^9 bacterias vivas a una sola dosis y un cuarto grupo con de ratones a tres dosis a los 0,14 y 28 días con 1×10^9 bacterias recombinantes (Dosis recomendada en otros estudios con dicha bacteria, Loch C. 2000). Cada grupo inmunizado tenía un control (bacteria sin expresión de la gp 120). Se obtuvieron las siguientes muestras de los ratones inmunizados: Bazo, Suero, Heces y lavados estomacal e intestinal, a los 10,18 y 24 días de inmunización para los grupos de una dosis y a los 7 días de inmunización para los de 3 dosis, en las cuales se midieron los niveles de anticuerpos anti-IgG y anti-IgA por ELISA usando un sistema comercial contra el VIH y utilizando la bacteria recombinante como antígeno, los resultados obtenidos son que la IgG e IgA monomérica en los lavados estomacales a los 10, 18 y 24 días después de la inmunización indicó niveles significativamente altos de la IgG en los dos sistemas de ELISA a los 10 días después de la inmunización con respecto al control. Así mismo los anticuerpos en lavado intestinal a los 10, 18 y 24 días después de la inmunización indico también niveles significativamente altos de la IgG

a los 10 días después de la inmunización con los 2 sistemas de ELISA. Los niveles de IgA monomérica empiezan a elevarse a los 10 días y son significativamente altos a los 18 días en el análisis por el ELISA comercial. En el caso de medición de anticuerpos en heces se encontró que solo la IgG parece tener valores significativos en los 2 sistemas de ELISA. La detección de IgG e IgA monomérica en suero indico que existen niveles significativos de IgG, mientras que la IgA esta elevada en suero a los 10 días en el análisis con el ELISA comercial, en el ELISA con *L.lactis* con gp 120 los niveles de IgG elevados se detectaron a los 24 días. Por lo que deducimos que la mayor respuesta encontrada de IgG fue a los 10 días después de la inmunización, a diferencia de la IgA, la cual no se ve incrementada significativamente excepto en lavado intestinal. En resumen encontramos que los niveles de IgG presentes en suero, heces y mucosas (estómago, intestino delgado) fueron significativamente mas altos a los 10 días después de la inmunización con respecto a otros tiempos. Respecto a la IgA monomérica solamente en intestino y suero se detectaron niveles significativos, los máximos valores obtenidos de IgG fueron cuando se inmunizó a los ratones con tres dosis de bacteria. A diferencia de un estudio donde analizaron el nivel de IgG e IgA en ratones inmunizados por via nasal con gp120 oligomérica, en la cual detectaron una fuerte respuesta de IgG e IgA sistémica, sin embargo no detectaron respuesta en lavados de mucosa vaginal, y en heces detectaron una débil respuesta de IgA (Van Cott TC,1998). En otro estudio donde también se midió la respuesta inmune en mucosas contra la toxina tetánica, expresada en *Lactobacillus*, inmunizaron ratones via nasal con 10^9 bacterias y encontraron que los títulos de IgG en suero eran significativos en comparación con los controles y que la respuesta de IgA en mucosas también representaba valores significativos, a los 10 días después de la inmunización con 2 dosis de bacteria, pero cuando inmunizaban con una sola dosis los valores de IgA no fueron significativos. (Grangette C 2001). Otra estrategia para la generación de anticuerpos contra el VIH es la realizada por Giraud y cols quienes inmunizaron ratones con RNA desnudo del vector SFV fusionado con la proteína gp 140 del VIH, cuando cuantificaron la respuesta de IgG en suero a diferentes tiempos de inyección del virus (0, 10, 24, 38 y 60 días), encontraron que los niveles de IgG aparecen en las muestras coleccionadas después de la segunda dosis por el día 24. Otro estudio que relaciona el nivel de anticuerpos con la dosis es el de Bruce y cols, donde inmunizan ratones con 10^8 o 5×10^7 adenovirus recombinantes con env, ellos encuentran que los títulos de IgG en suero son mayores en la dosis alta y con la dosis baja, los títulos son bajos. Por lo que podemos concluir que los valores obtenidos de IgG e IgA en el presente estudio en suero y sobretudo en mucosas a una sola dosis y en tres son significativos e importantes en la protección contra el VIH.

Así mismo se analizó la respuesta de proliferación celular al estímulo con antígenos del VIH, para este análisis medimos la incorporación de timidina tritiada luego de la estimulación con antígenos del VIH. Los ensayos indican niveles de proliferación elevados, comparados con el control de linfocitos sin estimular, a los 10 días después de la inmunización oral con la bacteria y en comparación con otros tiempos. El estímulo con $1\mu\text{g}$ y $5\mu\text{g}$ de antígeno viral mostró un aumento significativo en la proliferación que va de acuerdo a la dosis utilizada, lo cual es indicativo de la especificidad de las clonas de linfocitos estimulados por el antígeno, dado que en los linfocitos de bazo inmunizado con la bacteria normal de *L.lactis* no demostraron este efecto.

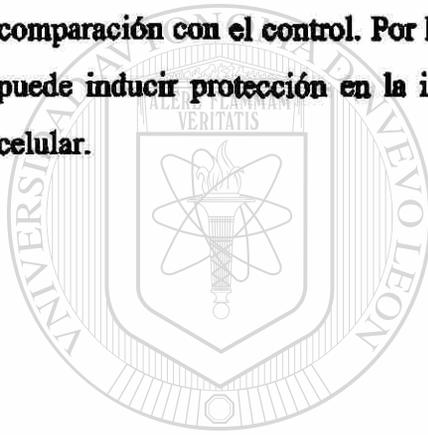
Estos datos de proliferación, en conjunto indican que la bacteria recombinante de *L.lactis* que expresa la gp 120 administrada por vía oral es capaz de inducir la generación de linfocitos sensibles a la gp 120 del VIH y que disminuyen considerablemente en el tiempo. Indicando que la bacteria recombinante induce inmunidad celular sistémica cuando es administrada por vía oral, probablemente a través de la expresión del antígeno en la mucosa gastrointestinal.

Con respecto a los niveles de proliferación en linfocitos de ratones inmunizados con 3 dosis de bacterias 1×10^9 vivas recombinantes, los resultados obtenidos aparentemente no indican diferencias significativas, en los tratamientos, excepto en los linfocitos sensibilizados con la dosis mayor de antígeno. Como se demostró en el experimento anterior, la respuesta de proliferación disminuye con el tiempo, posiblemente esa es la causa de que los valores obtenidos en ratones inmunizados con tres dosis no sean tan elevados, sin embargo presentan el mismo comportamiento. La inducción de proliferación celular es un valor de gran relevancia, debido a que los datos obtenidos son concordantes en tiempo para montar una respuesta inmune, ya que se necesita proliferación celular. A la fecha no hay estudios de inmunización en mucosas que determinen la proliferación celular, lo cual hace nuestro trabajo original en este aspecto.

Con el objetivo de determinar si nuestra bacteria recombinante no produce alteraciones morfológicas en la mucosa, que sean indicativas de posible daño en ésta, se realizaron cortes histológicos para el análisis morfológico de los epitelios en estómago e intestino delgado de los ratones inmunizados con *L. lactis* recombinante y *L.lactis* control. Los resultados indican que aparentemente no hay ningún daño en la integridad de las mucosas estomacal e intestinal de los ratones inmunizados con *L.lactis* recombinante, ni con *L. Lactis* control.

Una serie de estudios in vivo de la infección por VIS han determinado que los linfocitos intestinales, no macrófagos son un blanco celular para la infección in vitro por el virus, ya que

durante los primeros días de la infección por SIV en monos, la infección de macrófagos fue muy rara, y la mayoría de las células T infectadas estaban presentes en la mucosa intestinal y no en células T de sangre periférica. (Janoff, E 2001). Por lo que nuestros resultados son relevantes para la protección de la enfermedad montando una buena respuesta inmune celular, ya que se indujo una fuerte expresión de CD4 en mucosas del estómago e intestinal. Por otra parte los macrófagos de las mucosas, son células de gran importancia ya que constituyen una línea de defensa contra las infecciones, presentando características que los distinguen de los monocitos en sangre. Li Ling y cols realizaron un estudio donde demuestran que los macrófagos intestinales reducen en mayor porcentaje la permisibilidad del VIH en comparación con los macrófagos de sangre periférica por lo que la prevalencia de estas células en mucosas es de gran importancia, de acuerdo con nuestros resultados en la detección de mac por inmunohistoquímica obtuvimos que la expresión de Mac se ve incrementada cuando se inmuniza con la bacteria recombinante en comparación con el control. Por lo que el aumento en la expresión de CD4 y Mac en mucosas puede inducir protección en la infección por VIH por la inducción de inmunidad humoral y celular.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 10

CONCLUSIONES

- 1.- Se desarrollo la tecnología para llevar a cabo la modificación genética de bacterias lácticas (*Lactococcus lactis*), lo cual permitirá a corto plazo llevar a cabo la manipulación de estas bacterias comestibles, para la producción y envío de proteínas con interés terapéutico al aparato gastrointestinal.
- 2.- Se desarrollo la tecnología para anclar en pared celular proteínas heterólogas como antígenos (gp120) en la superficie externa de *Lactococcus lactis*.
- 3.- Se desarrollo un sistema para inducir inmunidad humoral (IgG e IgA) en varias mucosas del aparato gastrointestinal y sistémica en suero contra la gp120 del VIH basado en la generación de *L.lactis* recombinante.
- 4.- Se desarrollo un sistema de Inducción de Inmunidad celular sistémica (Proliferación celular específica de antígeno) basado en la administración oral de *L.lactis* recombinante.
- 5.- La presente estrategia para inducir inmunidad contra el VIH basada en la administración oral de *L.lactis* recombinante puede ser optimizada para inducir inmunidad protectora contra la infección por el virus y evaluar en su momento su papel como vacuna más efectiva y segura para el VIH.

CAPITULO 11

PERSPECTIVAS

- 1.- Determinar en Intestino los niveles de CD4 y CD8 en linfocitos intraepiteliales.**
- 2.- Determinar Citocinas por RT-PCR en los linfocitos Intraepiteliales.**
- 3.- Determinar niveles de citocinas en lavados de Mucosas Gastrointestinal y Vaginal.**
- 4.- determinar niveles de anticuerpos específicos en lavados de mucosa vaginal.**
- 5.-Determinar niveles de Linfocitos CD8 productores de INF-gamma específicos para VIH por Spot- ELISA.**
- 6.- Determinar la Inducción de CTL específicos contra VIH en linfocitos Intraepiteliales y de Lamina Propia.**
- 7.- Determinar la Inducción de CTL específicos contra VIH en linfocitos Intraepiteliales Vaginales.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 12

BIBLIOGRAFIA

- Abul K. Abbas, Lichtman A, Pober, J. 1999. *Inmunología Celular y Molecular*. 3 Ed. McGraw- Hill, S.A.U.
- Achour A, Bex F, Hermans P, Burny A, Zagury D. Induction of anti-gp160 cytotoxic T cells crossreacting with various V3 loop P18 peptides in human immunodeficiency virus type 1 envelope- immunized individuals. *J Virol* 1996; 70:6741-6750.
- Adams SE, Dawson KM, Gull K, Kingsman SM, Kingsman AJ. The expression of hybrid HIV:Ty virus-like particles in yeast. *Nature* 1987; 329:68-70.
- Aldovini A, Young RA. Development of a BCG recombinant vehicle for candidate AIDS vaccines. *Intern Rev Immunol* 1990; 7:79-83.
- Aldovini A, Young RA. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* 1991; 351:479-482.
- Altmeyer R, Escriou N, Girard M, Palmenberg A, Van der Werf S. Attenuated mengo virus as a vector for immunogenic human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9775-9779.
- Amerogen HM, Weltzin R, Farnet CM, Michetti P, Haseltine WA, Neutra MR. Transepithelial transport of VIH-1 by Intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS. *J. Acquir Immune Deficit Syndr* 1991;4:760-765.
- Angulo, F.J. and Swerdlow, D.L. 1995. Bacterial enteric infection in person infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 21,584-593.
- Aso Y, Akaza H, and the BLP study group. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* pre recurrence of superficial bladder cancer. *Urol. Int.* 1992;49:125-129
- Ayabe ,T. Secretion of microbial α -defensines by intestinal Paneth cell in response to bacteria. *Nature immunol* 2000;1:113-118.
- Baddour, L.M. 1989. A review of pathogenesis gleaned from animal models of experimental endocarditis. *Rev. Infect. Dis.* 11,452-563.
- Bagarazzi ML, Boyer JD, Javadian MA. Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees. *J Med Primatol* 1997; 26:27-33.
- Barnett SW, Duliege AM, Sinangil F. HIV vaccine efforts at Chiron: Polynucleotide, protein subunit, and prime/boost approaches. Abstracts of the 4th Conference on

Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington, DC, January 1997. [Abstract 530] (AIDSLINE).

-Belshe R, Gorse G, Mulligan M, Evans T, Keefer M, Excler J, Duliege A. Induction of immune responses to HIV-1 by canarypox virus (ALVAC) HIV-1 and gp 120 SF-2 recombinant vaccines in uninfected volunteers. *AIDS* 1998 Sep;12(18):2407-2415.

-Belyakov I, Wyatt L, Ahlers J, Earl P, Pendleton C, Kelsall B, Strober W, Moss B, Berzofsky A. Induction of a mucosal cytotoxic T-lymphocyte response by interarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing human immunodeficiency virus envelope protein. *J of Virology*, 1998 Oct;72 (10):8264-8272.

-Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat.Med* 1997;3:42-47.

-Boyaka PN, Marinaro M, Vancott JL, Takahashi I, Fujihashi K, Yamamoto M, van Ginkel FW, Jackson RJ, Kiyono H, McGhee JR. Strategies for mucosal vaccine development. *Am J Trop Med Hyg* . 1999 Apr;60(4 Suppl): 35-45.

-Boyer JD, Ugen KE, Wang B. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nature Med* 1997; 3:526-532.

-Bruce BC, Akrigg A, Shape A. Replication-deficient recombinant adenoviruses expressing the human immunodeficiency virus Env antigen can induce both humoral and CTL immune response in mice. *J of General Virology*.1999,80,1621-2628.

-Burke KL, Almond JW, Evans DJ. Antigen chimeras of poliovirus. *Prog Med Virol* 1991; 38:56-68.

-Caley IJ, Betts MR, Irlbeck DM. Humoral, mucosal, and cellular immunity in response to a human immunodeficiency virus type 1 immunogen expressed by a Venezuelan equine encephalitis virus vaccine vector. *J Virol* 1997; 71:3031- 3038.

-Cano,F. 1999. A Surface displayed cholera toxin B peptide improves antibody response using food-grade staphylococci for mucosal subunit vaccine delivery. *FEMS. Immunol.Med. Microbiol*.25,289-298.

-Charbit A, Martineau P, Ronco J. Expression and immunogenicity of the V3 loop from the envelope of human immunodeficiency virus type 1 in an attenuated *aroA* strain of *Salmonella typhimurium* upon genetic coupling to two *Escherichia coli* carrier proteins. *Vaccine* 1993;11:1220- 1228.

- Chatfield, S.N. 1992. Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htr A* and *aro A* in the murine salmonellosis model. *Microb. Phatog.* 12,145-151.
- CONASIDA. Programa de fortalecimiento para la Prevención y Control del VIH/SIDA y otras enfermedades de transmisión sexual. México, 1997.
- Coney L, Wang B, Ugen KE. Facilitated DNA inoculation induces anti-HIV-1 immunity *in vivo*. *Vaccine* 1994; 12:1545-1550.
- Cooney EL, Collier AC, Greenberg PD. Safety of and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein. *Lancet* 1991;337: 567-572.
- Curtiss,r,III and Kelly, SM. 1987 *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate ciclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and innunogenetic. *Infect.Immun.*55,3035-3043.
- Darji, A. 1997. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium* † *Cell* 91,765- 775.
- Dietrich,G. 1998. Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol.* 16, 181-185.
- Edelman ,R. 1999. Safety and immunogenicity of recombinant bacille Calmette-guerin (rBCG) expressing *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A(OspA) lipoprotein in adult volunteers: a candidate lyme disease vaccine. *Vaccine* 17, 904-914.
- Farber,J.M. 1996. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *Int. J. Food. Microbiol.* 30, 145-156.
- Fasano A. Cellular Microbiology: how enteric phatogens socialize with their intestinal host. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;28:520-32.
- Fennely,G.J. 1999 Mucosal DNA vaccine immunization against measles with a highly attenuated *Shigella flexneri* vector. *J. Immunol.* 162,1603-1610.
- Fischetti, V. Medaglini,D. Pozzi, Gianni. Gram-positive comensal bacteria for mucosal vaccine delivery. *Current Opinión in Biotecnology*, 1996;7 No6.
- Fleury B, Janvier G, Pialoux G. Memory cytotoxic T lymphocyte responses in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-negative volunteers immunized with a recombinant canarypox expressing gp160 of HIV-1 and boosted with a recombinant gp160. *J Infect Dis* 1996; 174:734-738.

- Frandsen, E.V.G. 1991. Ecology of viridians streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol.Immunol.*6,129-133.
- Fromen RC, Drevet P, Robert A, Menez A, Leonetti M. Recombinant *Staphylococcus* Strains as Live vectors for the Induction of Neutralizing Anti-Diphtheria Toxin Antisera. *Inf and Immunity*, Oct 1999.5007-5011.
- Fuller DH, Murphey-Corb M, Clements J, Barnett S, Haynes JR. Induction of immunodeficiency virus-specific immune responses in rhesus monkeys following gene gun-mediated DNA vaccination. *J Med Primatol* 1996; 25:236-241.
- Gearing, A.J.H. 1989. Human cellular immune responses to *Bordetella pertusis* infection. *FEMS. Immunol.Microbiol.*1,205-211.
- Geijtenbeek TBH, Kwon DS, Torensma R. DC-SIGN, a dendritic cell -specific HIV-1-binding protein that enhances transinfection of Tcell . *Cell* 2000;100:587-597.
- Gerritse K, Posno M, Schellekens MM, Boersma WJ, Claassen E. Oral administration of TNP- *Lactobacillus* conjugates in mice: a model for evaluation of mucosal and systemic immune responses and memory formation elicited by transformed lactobacilli. *Res Microbiol.* 1990.Sep-Oct;141(7-8):955- 62.
- Giraud A, Battail N, Piga N. Generation of monoclonal antibodies to native human immunodeficiency virus type 1 enveloped glycoprotein by immunization of mice with naked RNA. *J of Virol Meth.*79. 1999,75-84.
- Goossens,p.L. 1995. Attenuated *Listeria monocytogenes* as a live vector for induction of CD8 T cell in vivo: a study with the nucleoprotein of the lymphocytic choriomeningitis virus. *Int. Immunol.* 7, 797-805.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 1981;305:1425.
- Grangette C, Muller AH, Goudercourt MC, Turneer M, Mercenier A. Mucosal Immune Responses and Protection against Tetanus Toxin after Intranasal Immunization with Recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infection and Immunity*, Mar,2001,1547-1553.
- Grassi F, Meneveri R, Gullberg G. Human Immunodeficiency virus type 1 gp 120 mimics a hidden monomorphic epitope borne by class-I major histocompatibility complex heavy chains. *J Exp Med* 1991;174:53
- Guggenheim,B. 1968. Streptococci of dental plaque. *Caries Res.* 2, 147-163.

- Gunneriusson, E. Samuelson, P. Uhlen, M. Nygres, A. Stahl, S. Surface display of a functional single-chain Fv antibody on *Staphylococcus*. *J. Bacteriol.* 1996; 178:1340-1346.
- Hess, J. 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1458-1463.
- Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm AM. Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiology* 1992 Feb; 184 (2-3): 157-79.
- Holmgren J. Mucosal immunity and vaccination. *FEMS Microbiol Immunol.* 1999 Dec; 4(1):1-9.
- Hone, D.M. 1991. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9, 810-816.
- Ikonomidis, D. 1994. Delivery of a viral antigen to the class I processing and presentation pathway by *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med* 180, 2209-2218.
- Izhar, M. 1990. Moderate immunodeficiency does not increase susceptibility to *Salmonella typhimurium aro A* live vaccines in mice. *Infect. Immun.* 58, 2258-2261.
- Janoff, Edward. Smith P. Emerging concepts in gastrointestinal aspects of HIV-1 pathogenesis and management. *Gastroenterology* 2001; 120:607-621.
- Kwak Y, Yoo S. Kim E. Cell surface display of human immunodeficiency virus type 1 gp120 on *E. coli* by using ice nucleation protein. *Clin and Diagnostic laboratory immunology*, July 1999, 499-503.
- Kingsman AJ, Burns NR, Layton GT, Adams SE. Yeast retro-transposon particles as antigen delivery systems. *Ann NY Acad Sci* 1995; 754:202-213.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S. T-lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV. *Nature* .1984; 312:767.
- Klein M R, Veenstra J, Holwerda AM. Gag-specific immune responses after immunization with p17/p24:Ty virus-like particles in HIV type 1-seropositive individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13:393-399.
- Klein M. Current progress in the development of human immunodeficiency virus vaccines: research and clinical trials. 2001. *Vaccine* 19:2210-2215.
- Korber B, Kuiken C, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors J, and Sodroski J. *Human Retroviruses and AIDS* 1998. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, group T-10, Los Alamos National Laboratory, New Mexico, U.S.A.

- Kotloff, K.L. 1996. Safety, Immunogenicity, and transmissibility in humans of CVD 1203, a live vaccine *Shigella flexneri* 2^a vaccine candidate attenuated by deletions in *aro A* and *vir G*. *Infect.Immun.*64,3055-3061.
- Kowalski M, Potz J, Basiripour L. Functional region of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 1987;237:1351-1355.
- Langemann,S. 1994. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer- surface protein A of *Bordetella burgdorferi*. *Nature* 372, 552-555.
- Lei Lu, Walker, W. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):1124S-1130S.
- Li L, Meng G, Graham M, Smith P. 1999. Intestinal macrophages display reduced permissiveness to HIV-1 and decreased surface CCR5. *Gastroenterology* 1999.;116:1043-53.
- Liljeqvist,S. 1999. Surface display of functional fibronectin-binding domains on *Staphylococcus carnosus*. *FEBS lett.* 446,299-304.
- Lubeck MD, Natuk R, Myagkikh M. Long-term protection of chimpanzees against high-dose HIV-1 challenge induced by immunization. *Nature Med* 1997; 3:651-658.
- Lugosi,L. 1989. Genetic Transformation of BCG. *Tubercle* 70, 159-170.
- Maassen CBM, Holten NC, Balk F, Bak GJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJA, Claassen E. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strain. *Vaccine* 18(2000) 2613-2623.
- Macpherson,A. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000;288:2222-26.
- Magis-Rodríguez C, Bravo-García E, Anaya-López L, Uribe-Zúñiga P. "La situación del SIDA en México a finales de 1998". *SIDA ETS (México)*. Vol. 5, no. 4, oct/dic 1998 (en prensa).
- Marjorie,R. IgG surfaces as an important component in mucosal protection. *Nature Medicine*. 2000;vol.6,2;129-130.
- Mascola, J.R. G, Stiegler, Van Cott, T, Katinger, H, Carpenter,C, Hanson, C, Beary,H, Hayes,D, Frankel,S, Birx, D, Lewis,M. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nature Medicine*.2000.
- Masopust,D, Jiang,J, And Lefrancois, L. Direct analysis of the dynamics of the intestinal mucosa CD8 T cell response to systemic virus infection. *J.Immunol* 2001;166:2348-56.

- Matsumoto,S. 1998. Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin secreting merozoite surface protein1 (MSP1) induce protection against rodent malaria parasite infection depending on MSP1-stimulated interferon gamma and parasite-specific antibodies. *J. Exp.Med.* 188,845-854.
- McGhee JR, Kiyono H. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. *Infect Agents Dis.* 1993 Apr; 2 (2):55-73.
- Medaglini,D. 1995. Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *S. gordonii* after oral colonization. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 92,6868-6872.
- Medaglini, D. 1997. Commensal bacteria as vector for mucosal vaccines against sexually transmitted diseases: vaginal colonisation with recombinant streptococci induce local and systemic antibodies in mice. *Vaccine* 15,1330-1337.
- Mercenier,A. 1999. Acid Lactic bacteria as live vaccine. In *Probiotics: A critical review* (Tannock, G.W. ed.) pp 113-127, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Mesnage S, Weber-Levy M, Haustant M, Mock M, Fouet A. Cell surface -exposed tetanus toxin fragment C produced by recombinant bacillus anthracis protects against tetanus toxin. *Infect Immun* 1999 Sep;67(9):4847-50.
- Mestecky J, McGhee JR. Prospects for human mucosal vaccines. *Adv Exp Med Biol* 1992;327:13-23.
- Morrow CD, Porter DC, Ansardi DC, Moldoveanu Z, Fultz PN. New approaches for mucosal vaccines for AIDS: encapsidation and serial passages of poliovirus replicons that express HIV-1proteins on infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10 Suppl 2:S61-6.
- Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD. Nucleic acid structure and expresión of the human AIDS/Lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 1985;313:450-458.
- Muster T, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Trkola A, Schlz P, Grassauer A, Engelhardt O, Garcia A, Palese P. Mucosal model of immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a chimeric influenza virus . *J of Virology*, 1995 Nov;69 (11):6678-6686.
- Navarre and Schneewind. Surface proteins of Gram-positive Bacteria. *Microbiol.Mol.Biol..Rev.*1999; 63:191-194.
- Nagler C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature reviews immunology* 2001;1:59-67.

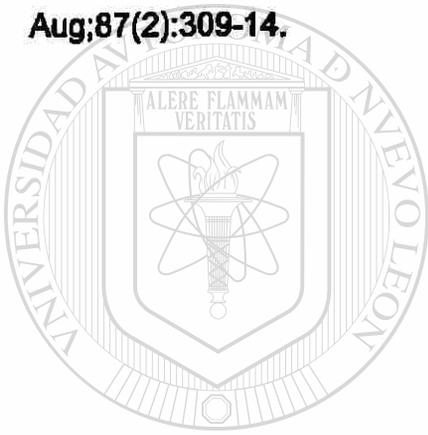
- Newell M. Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV-1. *AIDS* 1998;12:831-837.
- Nguyen,T.N. 1993. Cell-surface display of heterologous epitopes on *Staphylococcus xylosus* as a potential delivery system for oral vaccination. *Gene* 128:89-94.
- Noriega,F.R. 1994. Construction and characterization of attenuated Δ aro A Δ virG *Shigella flexneri* 2^a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. *Infect. Immun.* 62,5168-5172.
- Noriega, F.R. 1996. Engineered Δ guaBA Δ virG *Shigella flexneri* 2^a strain CVD1205:construction,safety,immunogenicity, and potencial efficacy as a mucosal vaccine. *Infect.Immun.*64,3055-3061.
- Norton PM, Le Page RWF, Wells JM. Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol (Praha)* 1995;40(3):225-30.
- Oggioni,M.R. 1995. Immunization of mice by oral colonization with live recombinant commensal streptococci. *Vaccine.*13,775-779.
- Ogra,p.L. 1980. Viral vaccination via the mucosal routes. *Rev.Infect.Dis.*2, 352-369.
- Osek J, Truszczynski M. Mucosal immunity with implications for use in developing a new generation of vaccines. *Postepy Hig Med Dosw.* 1995;49(4):469-86.
- Paglia,P. 1998. Gene transfer in dendritic cells induced by oral DNA vaccination with *S. typhimurium* results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* 92,3172-3176.
- Papadakis,K. The role of Thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *J. Immunol.* 2000;165:5069-76.
- Phalipon,A. And Sansonetti, P. 1995. Live attenuated *Shigella flexneri* mutants as a vaccine candidates against shigellosis and vector for antigen delivery. *Biologicals* 23, 125-134.
- Piard,J. Hauterfort,I. Fischetti,V. Ehrlich,D. Fons,M. Gruss,A. Cell Wall Anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various Lactic Acid Bacteria. *J.Bacteriology*, May 1997;3068-72.
- Pirofski, Liise-Anne and Casadevall, A. 1998. Use of Licensed Vaccines for Active Immunization of the Immunocompromised Host. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan p . 1-26.

- Podolsky, D.K. Mucosal Immunity and Inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am.J. Physiol.* 1999;277:G495-G499.
- Poussier,P. Edouard,P. Lee,C. Binnie,M. And Julios,M. Thymus-independent development and negative selection of Tcell expressing evidence for distintic circulation patterns of gut and thymus-derived T lymphocytes. *J.Exp.Med* 1992;176:187-199.
- Pouwels PH, Leer RJ, Boersma WJ. The potencial of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *JBiotechnol* 1996. Jan 26;44(1-3):183-92.
- Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M, Heijne den Bak-Glashower MJ, Tielen FD, Smit E, Martinez B, Jore J, Conway PL. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *J Food Microbiol* 1998 May 26;41(2):155-67.
- Powell,R.J. 1996. In Introduction of eukaryotic expression cassettes into animal cells using a bacterial vector delivery system, *Vaccine,96: Mol. Appro. To the control of Infectious Disease*, pp. 183- 187, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Pozzi, G. 1992. Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. *Infect.immunol.*60,1902-1907.
- Remoué,F. 1997. Local transient induction of inflammatory cytokines after intranasal administration of recombinant *Bordetella pertusis* . *Microb.Pathog.*22,305-313.
- Renauld-mongénie,G. 1996. Induction of mucosal immune response against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertusis*. *Proc. Natl. Acad. SCi. U.S.A.* 93,7944-7949.
- Robinson, K. 1997. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat. Biotechnol.*15,653-657.
- Robinson,J. K.Blanchard, Tg. Levine,AD. Emancipator, SN. And Lamm, ME. A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo. *J. Immunol.* 2001;166:3688-92.
- Rush Cm, Hafner Lm, Timms P. Genetic modification of a vaginal strain of *Lactobacillus fermentum* and its maintenance within the reproductive tract after intravaginal administration. *J Med Microbiol* 1994 Oct;41(4):272-8.
- Samuelson,P. Hasson, M. Aalborg, N. Andreoni,C. Gotz,F. Bachi,T. Nguyen,H. Binz, H. Huyen,M. Stahl,S. Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*. *J. Bcterial* 1995;177,1470-1476.

- Schafer,R. 1992. Induction of a cellular immune response to a foreign antigen by a recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine. *J.Immunol.*149, 53-59.
- Schleifer,K.H. and Kloos,W. 1975. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended description of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and description of three new species: *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, and *S. xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25,50-61.
- Schleifer,K.H. and Fischer,U. 1982 Description of a new species in the genus *Staphylococcus*: *S. carnosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32,153-156.
- Shalaby WS. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995 Feb;74(2):127-34.
- Shen ,H. 1995. Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle for the induction of protective anti-viral cell-mediated immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 92,3987-3991.
- Sizemore, D.R. 1995. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science*270,299-302.
- Sizemore, D.R. 1997. Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Vaccine* 15,804-807.
- Smith,PD. Wahl SM. Immunobiology of mucosal HIV-1 infection . *Mucosal immunology*, 2 ed. San diego: Academic;1999.
- Steidler,L. 1998. Mucosal delivery of murine interleukin -2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect.Immun.* 66,3183-3189.
- Steidler,L. Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeir F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine Colitis by *Lactococcus lactis* secreting Interleukin-10. *Science*200;289:1352-1355.
- Steimer KS, Van Nest G, Dina D, Barr PJ, Luciw PA, Miller ET. Genetically engineered human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 produced in yeast is the target of neutralizing antibodies. In: *Vaccines* 87. Edited by Ginsberg H, Brown F, Lerner RA, Chanock RM. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1987; 236-241.
- Stites, D,P.; A,I, Terr y T,G, Parslow. 1994. *Inmunología Básica y Clínica*.8 ED. El Manual Moderno,S.A de C.V. pp 884.

- Strahan,K, 1992 Impaired resistance to infection does not increase the virulence of *Salmonella htr A* live vaccines for mice. *Microb. Pathog.* 12,311-317.
- Strauss,a and Gotz,F. In vivo immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*. *Mol. Microbiol.*1996;21:491-500.
- Suzuki,K. Gut cryptopatches:direct evidence for extrathymic anatomical sites for intestinal T Lymphopoiesis. *Immunity* 2000;13:691-702.
- Takeuchi,A. 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection . I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Pathol.* 50,109-136.
- The Jordan Report. 1998. Division of Microbiology and Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. pp 66-68.
- Tomoda,T. 1990. Immune response to *Bordetella pertusis* infection and vaccination. *J.Infect.Dis.* 163.559-563.
- Trauger R, Ferre F, Daigle AE. Effect of immunization with inactivated gp120-depleted human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) immunogen on HIV-1 immunity, viral DNA, and percentage of CD4 cells. *J Infect Dis* 1994;169 :1256-1264.
- Turner MS, Giffard PM. Expresion of *Chlamydia psittaci*-and Human Immunodeficiency Virus- Derived Antigens on the Cell Surface of *Lactobacillus fermentum* BR11 as Fusions to BspA. *Infect Immun* 1999 Oct;67(10):5486-5489.
- Understanding Vaccines. National Institutes of Health and National Institute of Allergy and Infectious Disesses. NIH Publication No. 98-4219 January 1998. pag. 3-6.
- Uribe, P, MD, Carlos Magis Rodríguez, MD Enrique Bravo García. AIDS in Mexico. November, 1998 Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care.
- Van Ginkei,F,W. Partial IgA-deficiency with Increased Th2-type cytokines in TGF- β 1 Knockout mice. *J. Immunol* 1999;163: 1951-1957.
- VanCott T, Kamiski R, Mascola J. HIV-1 neutralizing antibodies in the genital and respiratory tracts of mice Intranasally immunized with oligomeric gp 120. 1998. *J of Immunology.* 2000-2012.
- Van de Wijgert J, Mason PR, Ray CS, Gwanzura L, Maphosfere C, Katzenstein D, Padian NS. Zimbabwe AIDS Prevention Project-University of Zimbabwe (ZAPP). Use of Intravaginal preparations, presence of *Lactobacillus* in the vagina, and risk for HIV in Zimbabwen womwn. *Int Conf AIDS.* 1996 Jul7-12,11 (1):34.

- Veazey RS, DeMarias M, Chalifoux LV, Gastrointestinal tract as a major site of CD4 T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 1998;280:427-431.
- Vincent T.; DeVita, Jr. S, Hellman; S, Rosenberg. 1997. *AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention* . 4 Ed. Lippincott-Raven. pp 29-39.
- Willem, M. Gene expression system for lactic acid bacteria. *Curr. Opinión In Microbiology* 1992;2:289-295.
- Wollowski I, Taek J, Bakalinsky A, Neudecker CH, Pool ZB. Bacteria Used for the Production of Yogurt Inactivate Carcinogens and Prevent DNA Damage in the Colon of Rats. *American Society for Nutritional Science* 1999.77-82.
- Zegers ND, Kluter E, Van Der Stap H, Van Dura E, Van Dalen P, Shaw M, and Baillie L. Expression of the protective antigen of bacillus anthracis by lactobacillus casei: towards the development of an oral vaccine against anthrax. *J Appl Microbiol.* 1999 Aug;87(2):309-14.

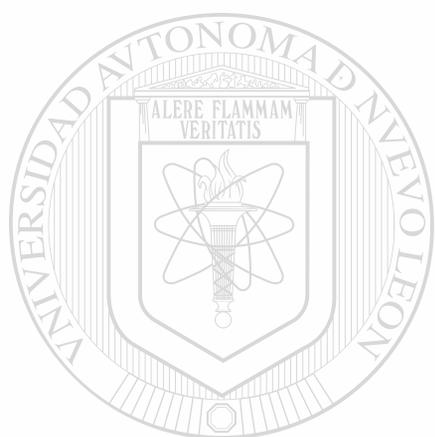


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



