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 transcienden 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 especifica de CTL). Diversas estrategias para desarrollar vacunas (virus muertos, vacunas de subunidades peptidicas, 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 $1x10^9$ bacterias a una sola dosis y un cuarto grupo con de ratones a tres dosis a los 0,14 y 28 días con $1x10^9$ 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 estimulo 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 nivles de IgG fueron significativamente altos en los lavados de ratones inmunizados con 3 dosis de 10^9 bacterias. Respecto a los niveles de IgA monomerica 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 despues 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 despues de la inmunización con la bacteria. Los niveles de IgA en intestino son significativamente altos a los 24 días despues de la inmunización en el ELISA comercial, sin embargo son significativos solamente a los 10 días despues 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 despues 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 despues de la inmunización con la bacteria en el ELISA comercial; mientras que en el sistema con *L. lactis* los niveles de IgG estan elevados con respecto al control a los 24 días despues de la inmunización. Los niveles de IgA en suero aparentemente se encuntran ligeramente elevados a los 10 y 18 días deapues 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 especifica con dos concentraciones de antígeno del VIH induce la proliferación especifica de linfocitos de bazo obtenidos a los 10, 18 y 24 días despues de la inmunización y que el numero de clonas 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 analisis 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 inmunohistoquimica 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 dias, 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.

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.(Gottieb 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).

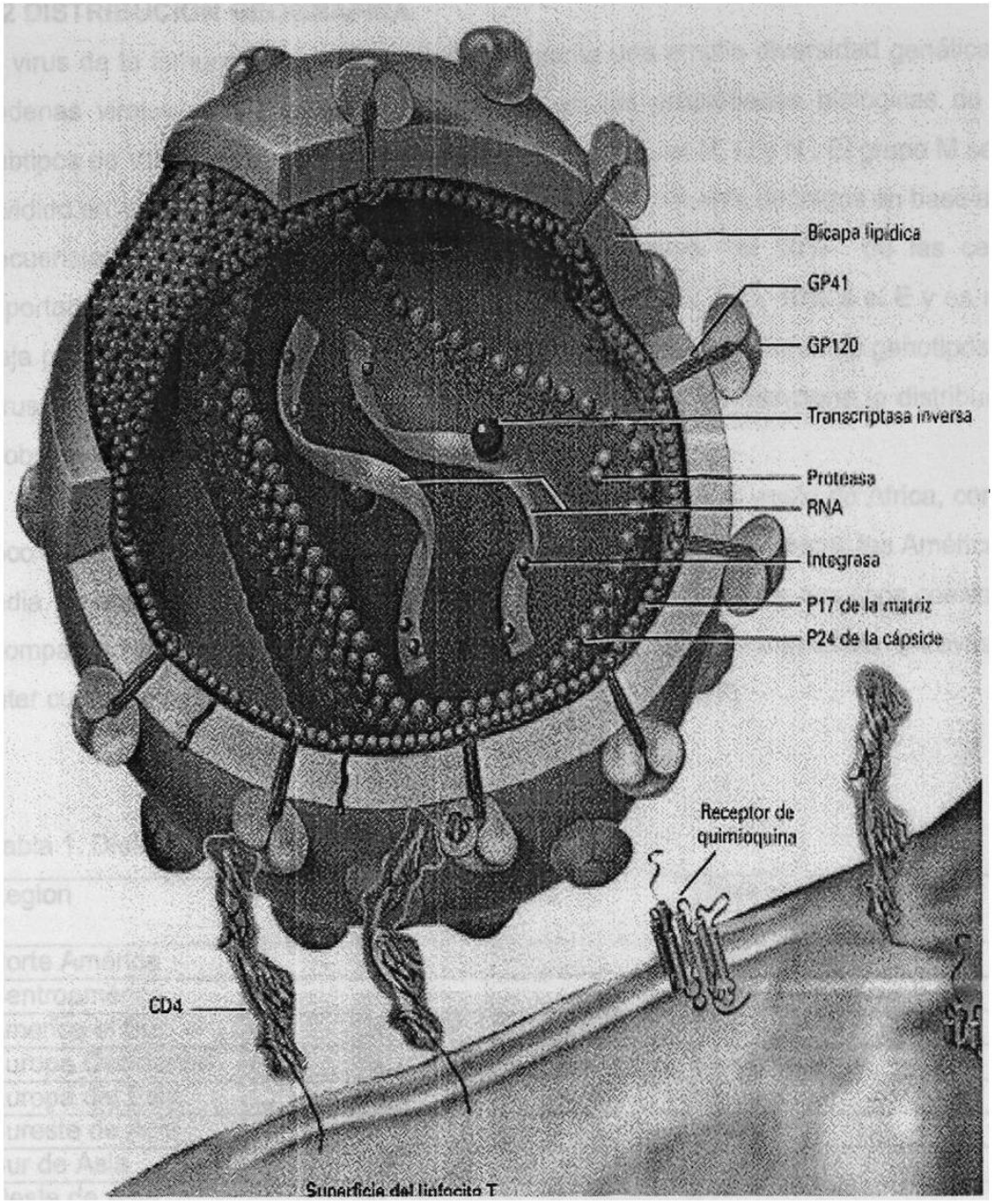

Fig 1. Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

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	
America 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	
Africa del Oeste	A	C,D
Africa Central	A	B,C,D,E,F,G,H,O
Africa del este	A	D
Sud Africa	C	B,D
Australia	B	

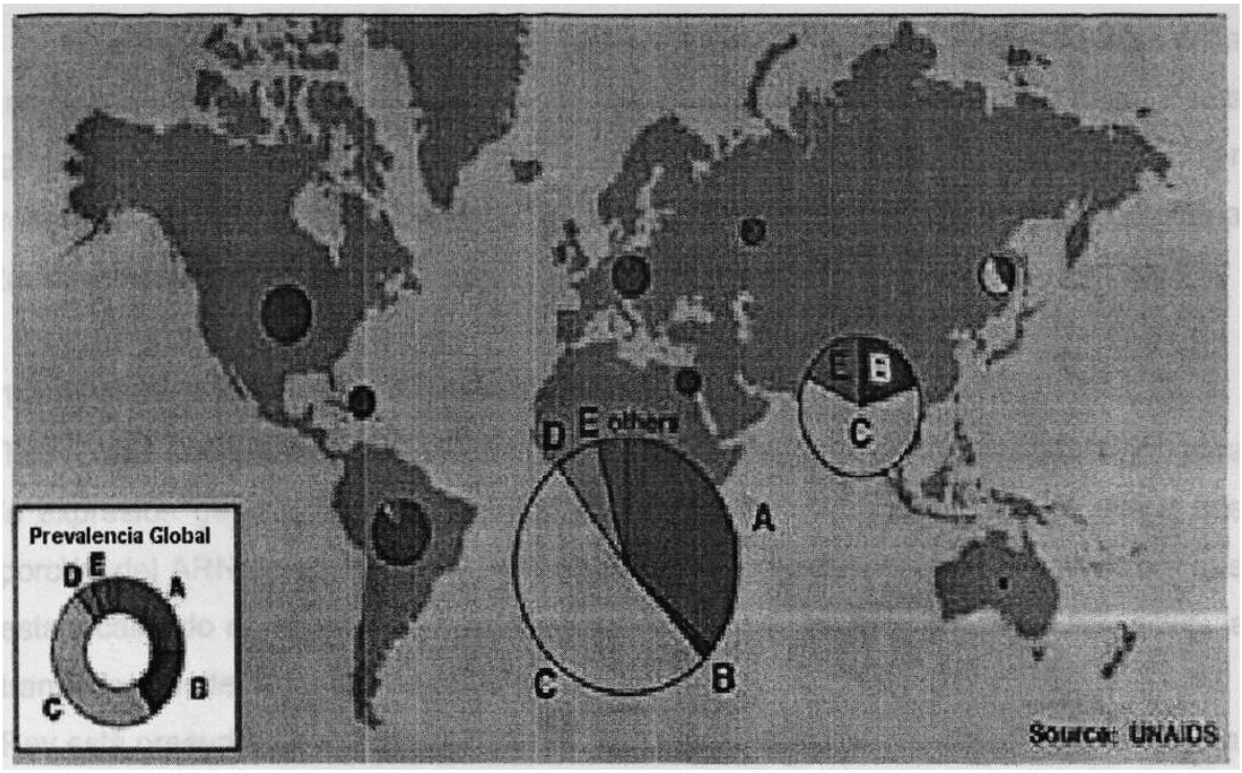

Fig 2. Distribución Geografica del VIH

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 capside 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 (capside, p24), NC (nucleocapside p9), y p6. (Fig. 3).

La proteasa viral (pro, p10), integrasa (In, p31), RNAsa H (p15) y el homo dímero de la transcriptasa reversa (RT, p66-p51) son expresadas en el contexto de un precursor gag- *pol*, producidas como una poli proteína 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 capside, 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 repuesta 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).

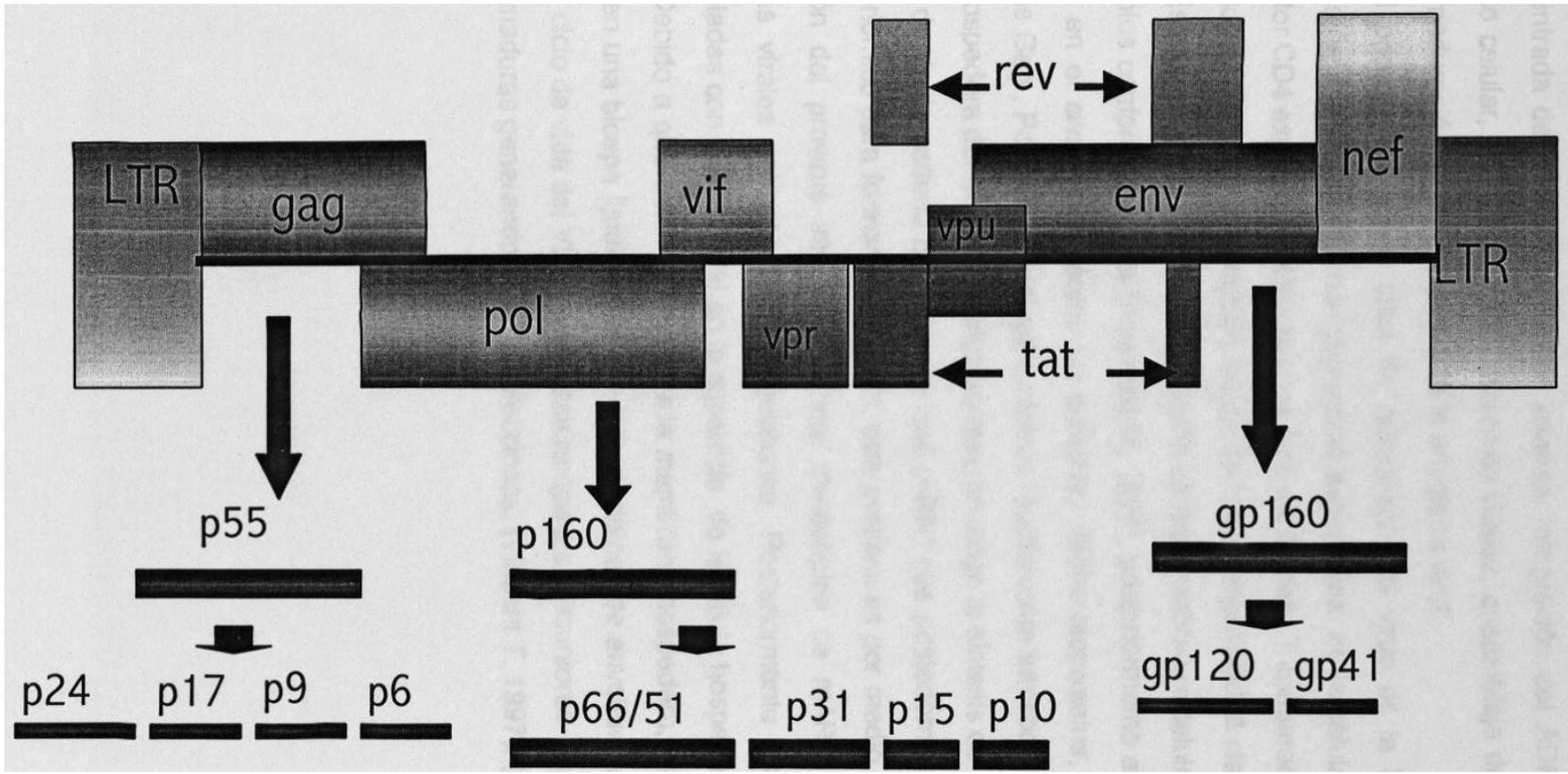

Fig 3. Organización Genómica del VIH.

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, tanscripción 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 transcriptos de mARN 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 lipidica 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).

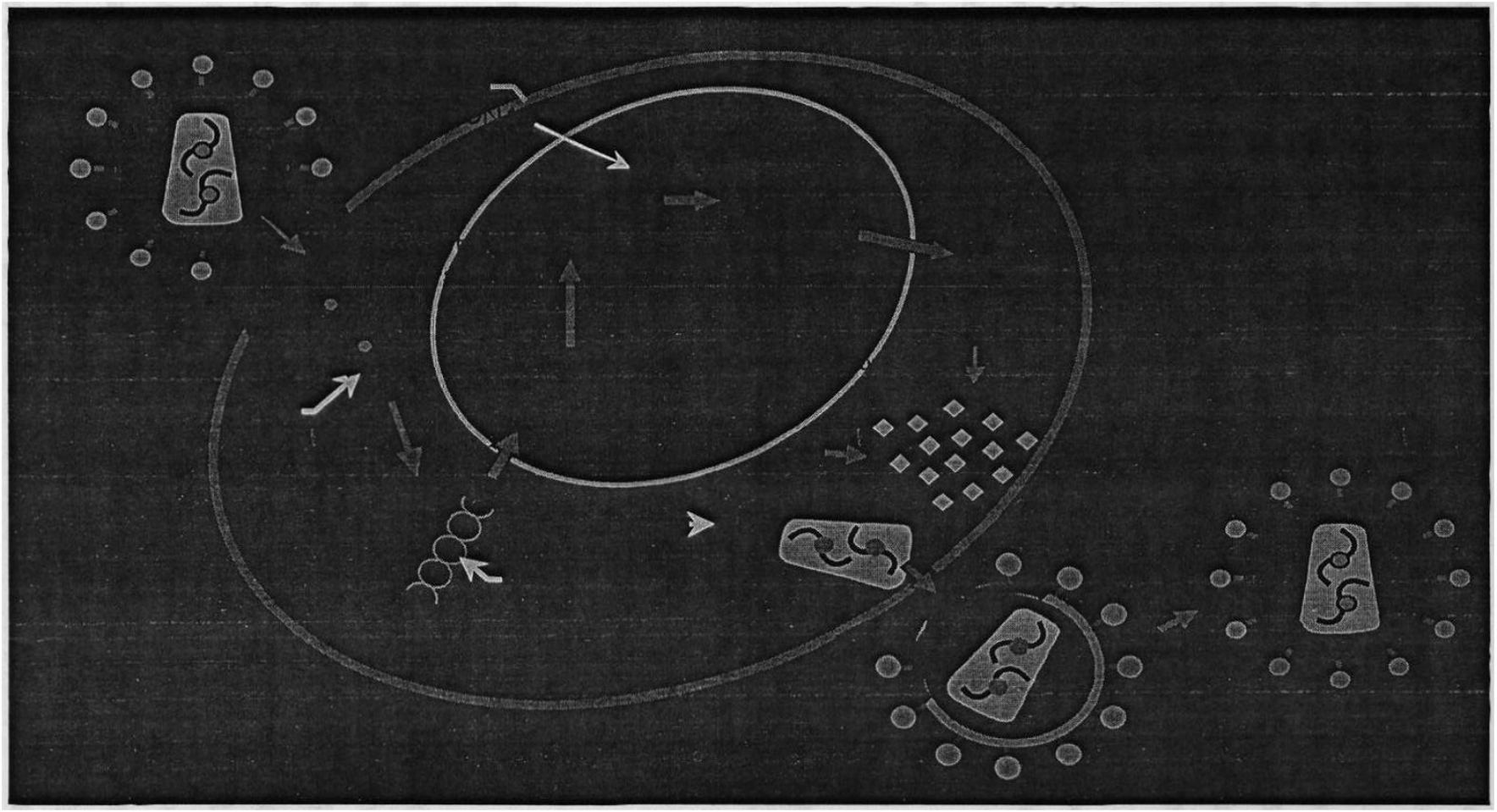

Fig 4. Ciclo de Replicación del VIH.

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 partículas virales por gemación a través de la membrana celular.

1.5 CARACTERÍSTICAS DE LA gp120 DEL VIH

El virión maduro del HIV es un 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 tri dimensional 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.

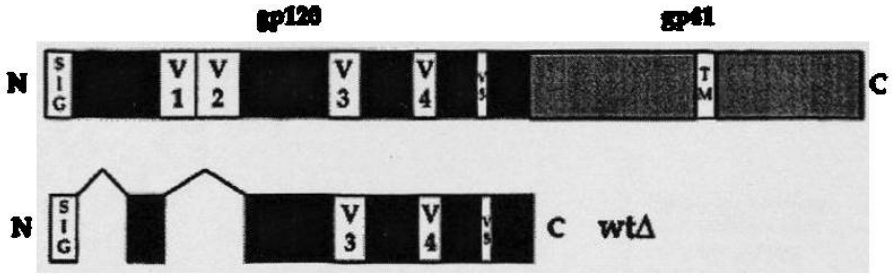

Fig 5. Glicoproteínas de la envoltura del VIH. Las regiones en negro y blanco son las regiones variables y conservadas.

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- desoximanoylmiricina 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
PQEVVLVNVTENFNMWKNDM VEQMHEDIIS LWDQSLKPCV
KLTPLCVSLKCTDLGNATNTNSSNTNSSSG EMMMEKGEIK NCSFNISTSI
RGKVQKEYAFFYKLDIIPID NDTTSYTLTS CNTSVITQAC PKVSFEPIPI HYCAPAGFAI
LKCNNKTFNG TGPCTNVSTV QCTHGIRPVV STQLLLNGS AEEEVVIRSA
NFTDNAKTII VQLNQSVEIN CTRPNNNTRK SIRIQRGPGR AFVTIGKIGN
MRQAHCNISR AKWNATLKQI ASKLREQFGN NKTIIFKQSS GGDPEIVTHS
FNCGGEFFYC NSTQ FNSTW FNSTWSTEGS NNTEGSDTIT LPCRIKQFIN
MWQEVGKAMY APPISGQIRC SSNITGLLLT RDGGNNNNGS
EIFRPGGGDMRDNWRSELYK YKVVKIEPLG VAPTKAKRRV VQREKR

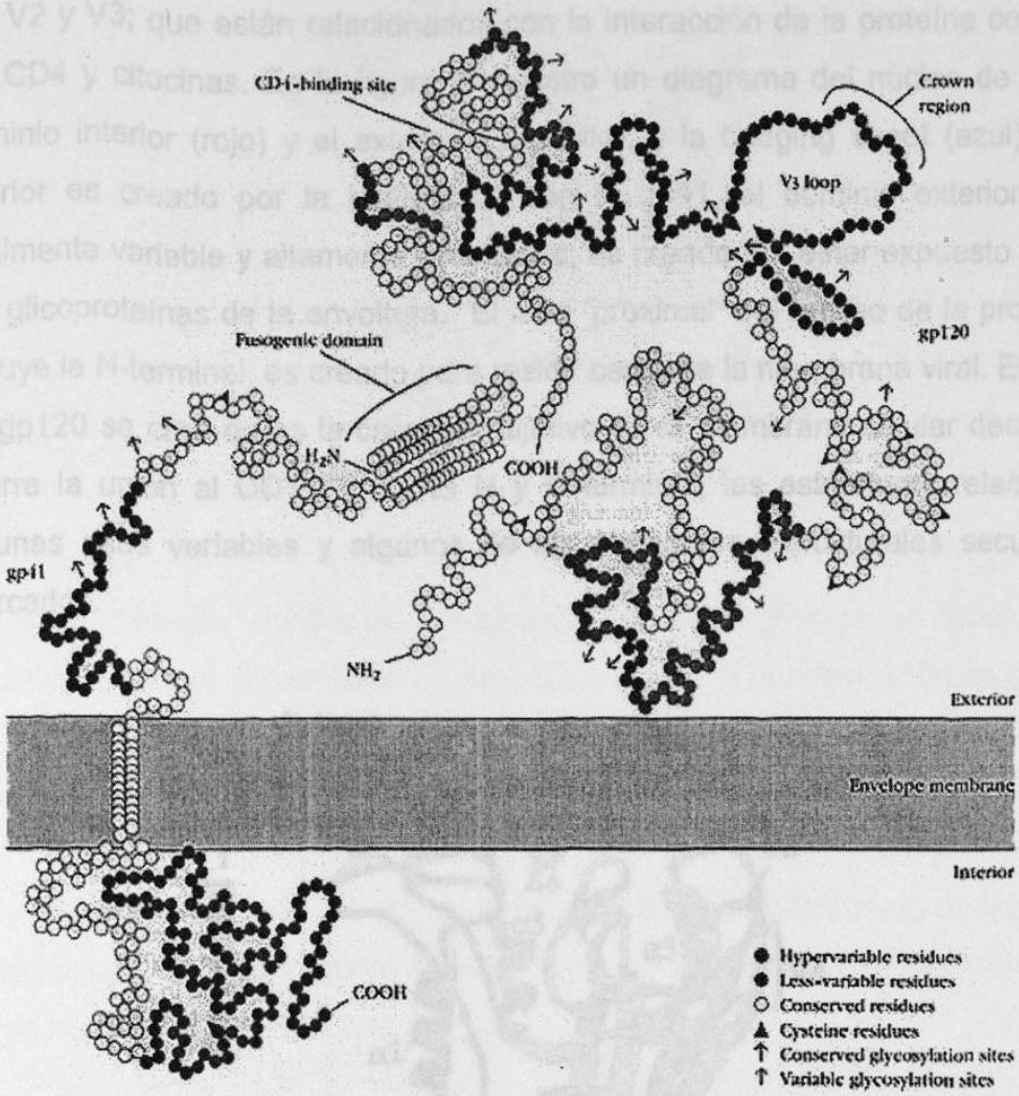

Fig 6. Asociación e Interacción de la gp120/gp41 con CD4.

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 qu 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 estrcuturales secundarios son marcados.

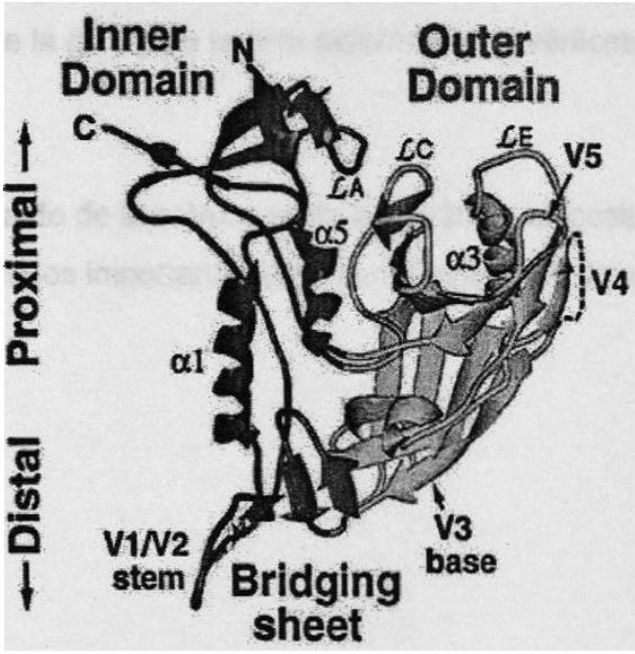

Fig 7. Núcleo de la gp120 ; dominio interno (rojo), dominio exterior (amarillo), puente de unión (azul).

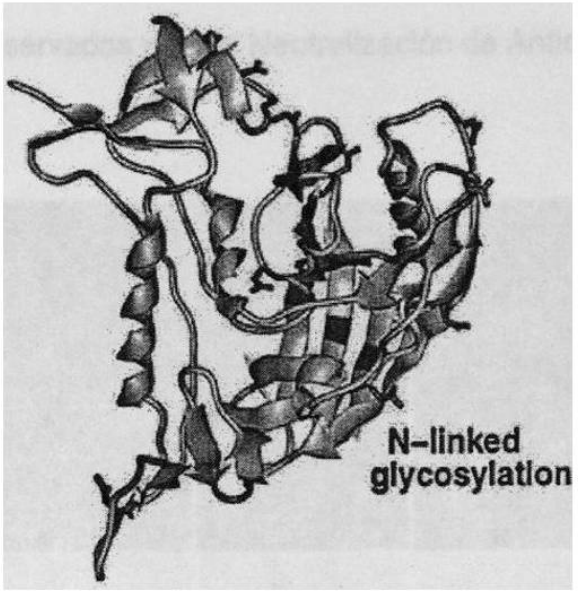

Fig 8. Imagen que muestra los residuos de asparagina (incluyendo cadenas laterales) modificadas por N glicosilación en azul. Se cree que la concentración de glicosilación en la superficie de la gp120 es la cara externa en los vértices de la glicoproteína de la envoltura.

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)

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

Epitopes inducidos de CD4 (CD4-i)	17b 48d	Asn88,Lys117, Lys121, Lys207, Ser256, Thr257, Asn 262, ΔV3, Glu370, Glu381, Phe382, Arg419,Ile420,Lys421, Gln422, Ile423, Trp427, Tyr435, Pro438, Met 475	Interferencia con la unión al receptor de citocinas	La unión al CD4 incrementa la exposición de los epitopes como resultado del movimiento del loop V2
2G12	2G12	Asn295, Thr297, Ser334, Asn386, Asn392, Asn397	Desconocido	La unión del anticuerpo depende de la propiedad de asociación a la 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 dencríticas, la cual funciona también como resevorio 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 pricipal 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 recpetores 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 lipidica, 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 proteinasa 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 numero 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 perdida 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: peptidos sintéticos o subunidades peptidicas, 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 peptidos 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 peptidicas, pueden ser producidos por síntesis química y estos incluyen ambos epítopes de células B y de células T ts también pueden estar conjugados con lípidos para estimular linfocitos citotóxicos . Actualmente están en evaluación: las subunidades gp 160, gp120 , p24 y peptidos 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 termino 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, seudoviriones

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 especifica 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 especificas 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 , canaryppox -VIH gp 160 y canaryppox -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, rhinovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la polio, elegido por sus características biológicas inertes, la patogenesis 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 coestimulatorias y con adjuvantes, 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.

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
Particulas/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 protectivo 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 protectiva. (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 protectivas especializadas que no se encuentran en otros sitios, las cuales incluyen peptidos antimicrobianos (Defensinas) (Ayabe,T.2000), Inmuno-globulina A secretoria (Macpherson, A.J. 2000) , mucinas y peptidos 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 toráxico, 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