intestinal puede ser único en su habilidad para funcionar como un importante sitio para la maduración extratimica 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 extratimicamente, 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 l a acumulación de células T efectoras de memoria en este sitio. (Papadakis, K,A.2000).

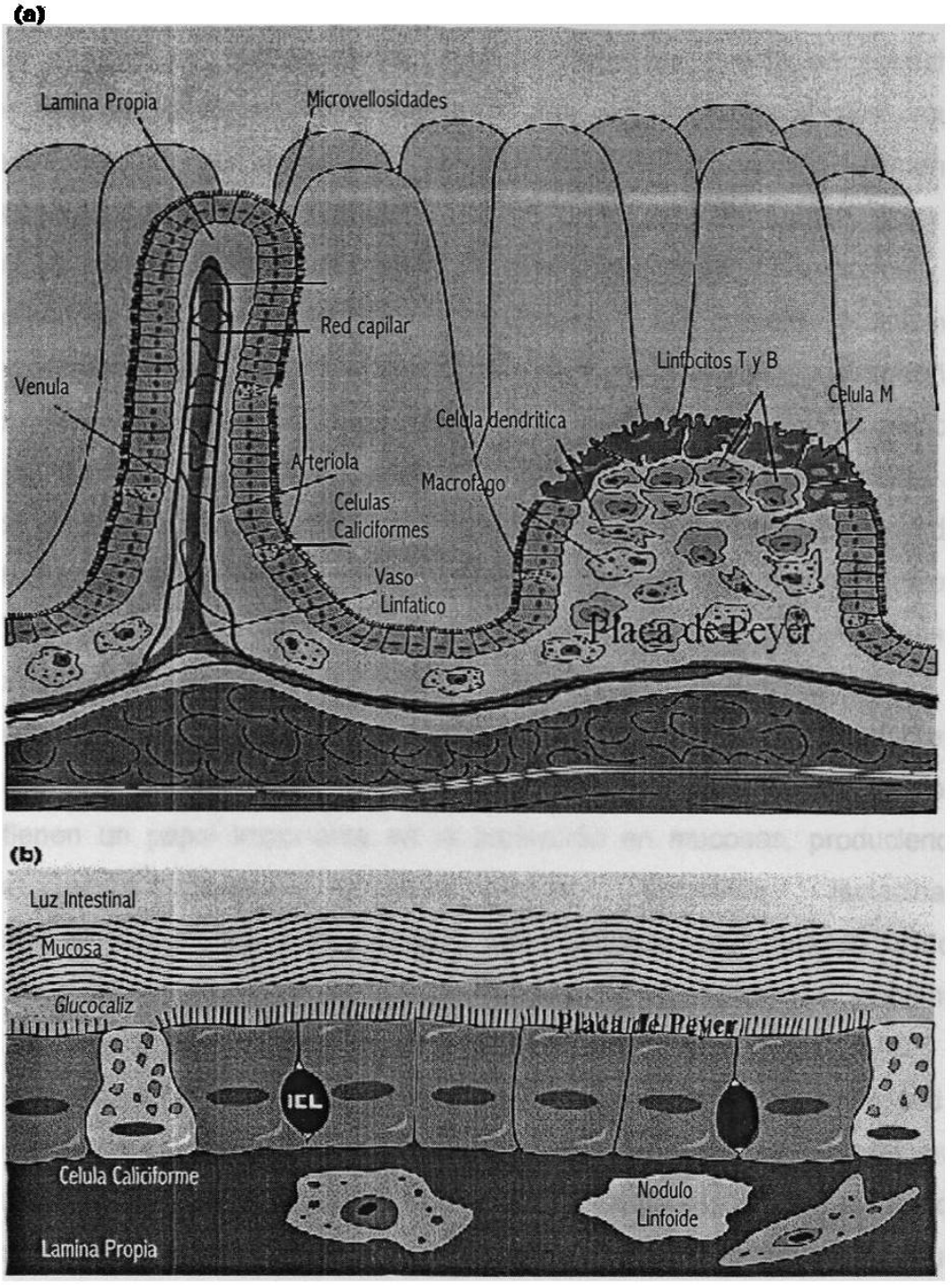


Fig 9. Sistema Inmune en Mucosas.

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 protectivas.

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 cuasar 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 glicolipidos 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 acidos grasos volatiles, y ácidos biliares modificados químicamente que creean un ambiente local que es infavorable para el crecimeto 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 e 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* enteropatogénica (EPEC) la cual se adhiere a la superficie del epitelio intestinal por la destrucción del microvilli y rearegla la actina del citoesqueleto para formar un pedestal sobre la superficie celular del hospedero. Tomando lo anterior en cuanta un aspecto importante en cuanto a la

interacción de las bacterias con el epitelio es la repuesta 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-estimulatorias 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 glicolipidos (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, estan las células especializadas M del epitelio, las células dendríticas y células epiteliales. En estudios recientes se demostró que las células M de raton en un sistema exvivo son capaces de transportar el VIH a las células mononucleres. (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 unea a la glicoproteína gp 120 del VIH a traves de una lecitina tipo C, permitiendo la captura del VIH (sin infección) para su subsecuente presentación a las células T y diseminación a organos linfoides secundarios. (Geijtenbeek THB, 2000). Las células epiteliales son el linaje célular 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 mostro que el VIH puede ser translocado a traves de una delgada capa de células epiteliales por una via tmasitotica, a traves del principal receptor expresado en estas células, el galactosil ceramida (Gal-Cer), en adición esta células también expresan el coreceptor para macrófagos CCR 5, utilizado por el VIH. (Bomsel M, 1997). Veazey et al, demostró que durante los primeros dias de la infección de VIS (virus de la inmunideficiencia en simios) en macacos , los macrófagos infectados eran raros, y que las células T infectadas eran mas 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 ce´lulas T CD4 activaadas en la lamina propia que en la sangre. Después de 7-14 dias de infección , las células T CD4 de la mucosa colonica e intestinal son rapidamente 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 esta asociada con la atrofia del villi y mala absorción, consistente con la enteropatia 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 peptidos quimioatractantes 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 *Salmonella y Shigella , E.coli*, y actualmente se han propuesto más como *Francisiella, Cholera*. El agente vivo más utilizado es *Salmonella 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 descontinuada 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 practico y confiable para los programas de vacunación, 6) el tropismo de los vectores bacterianos por células dendríticas y macrófagos en el tejido linfoide 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 *lactococos* , *lactobacilos* o ciertas cepas de *Stafilococos y Streptococos.* Sin embargo dependiendo del vector utilizado y el sitio de liberación la calidad de la respuesta inmune varia ampliamente. Algunos de los que han sido estudiados extensamente son:

3.1.1 PATÓGENOS ATENUADOS:

Bacilo Calmette-Guerin

El BCG es una cepa de *Mycobacterium bovis* y ha sido utilizada como vacuna para la tuberculosis, como vacuna es seguro 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 protectiva 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 especifico a MSP1 en los bazos de ratones inmunizados. Cuando los ratones vacunados fueron retados con eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* , se observo 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 especificas 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 intradermal 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 esta 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 (Langermann,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 genero 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 desarrollo 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* aro mutante portando el gen *lac Z* de *E. coli* bajo el control de un poromotor 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* (Δ.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 hospedera. Sizemore y cols. demostraron la liberación del plásmido reportero p CMVβ 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 Δ.asd* llevando pCMVβ-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 especificas para la proteína (Fennely,G.J. 1999).

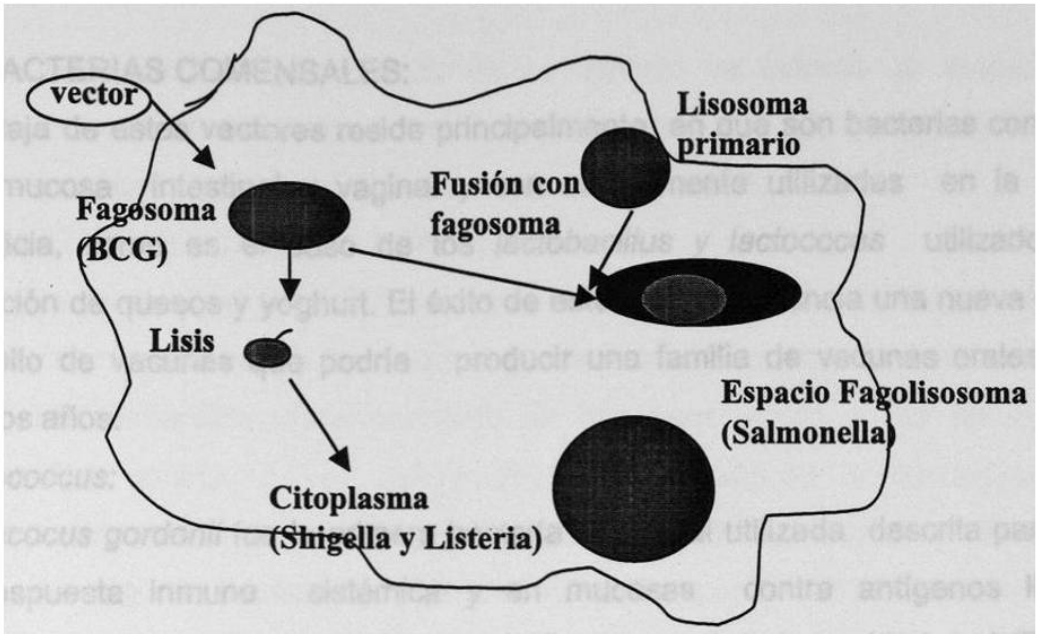


Fig 10. Tropismo intracelular de vectores de BCG, *Listeria monocytogenes, Salmonella y Shigella*. BCG permanece en un fagosoma temprano y previene la fusión con el lisosoma, mientras que *Salmonella* promueve el desarrollo de un espacio fagolisosoma después de la fusión con el lisosoma primario, *Listeria 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.), asi como el 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 lactococos* 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:

Streptococus 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 *Streptococus 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).

Staphylococos

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, ademas 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-produjó el dominio B3 de la proteína B de fibronectina unida a *S. disgalacticae* la respuesta fue incrementada en uno o dos ordenes 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-expreasada 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 inmunicidad 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 significante 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)

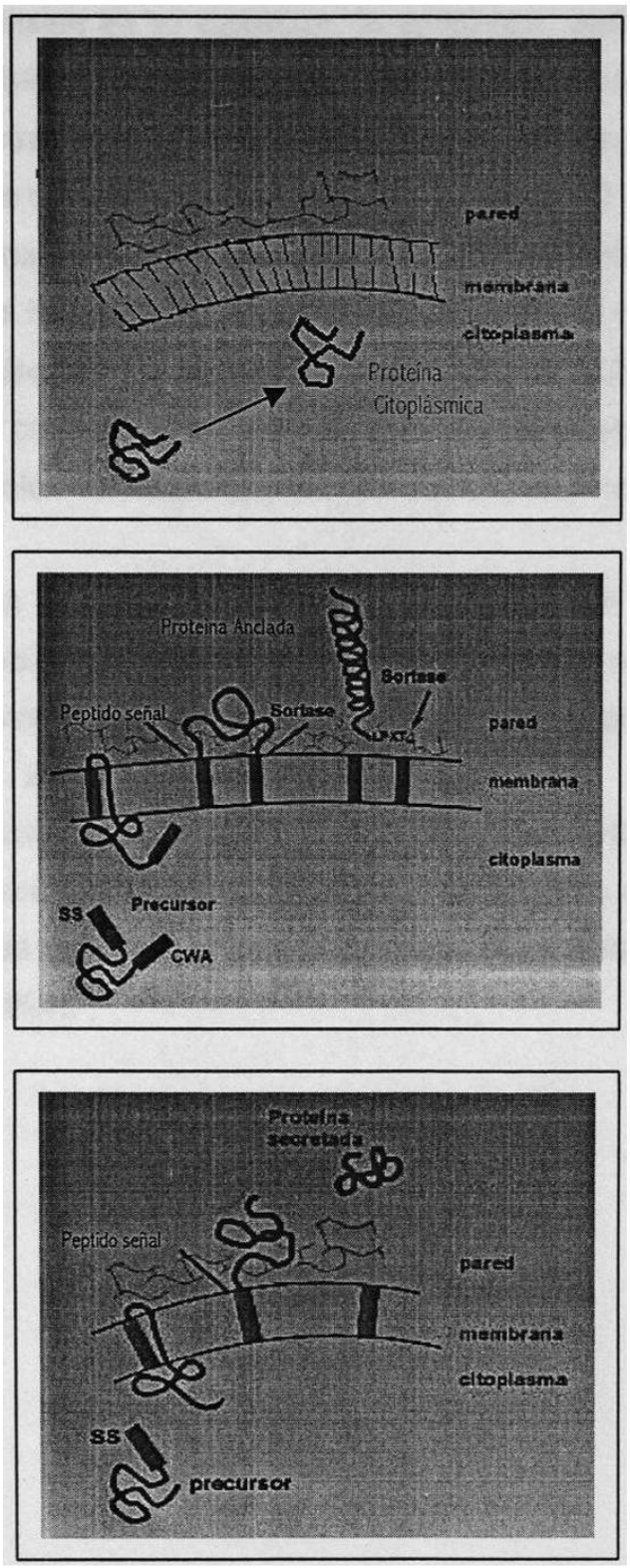


Fig 11. Sistemas de Expresión de Proteínas en Bacterias Lácticas. a) Proteína citoplasmática, b) Proteína anclada a pared, c) Proteína secretada.

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

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

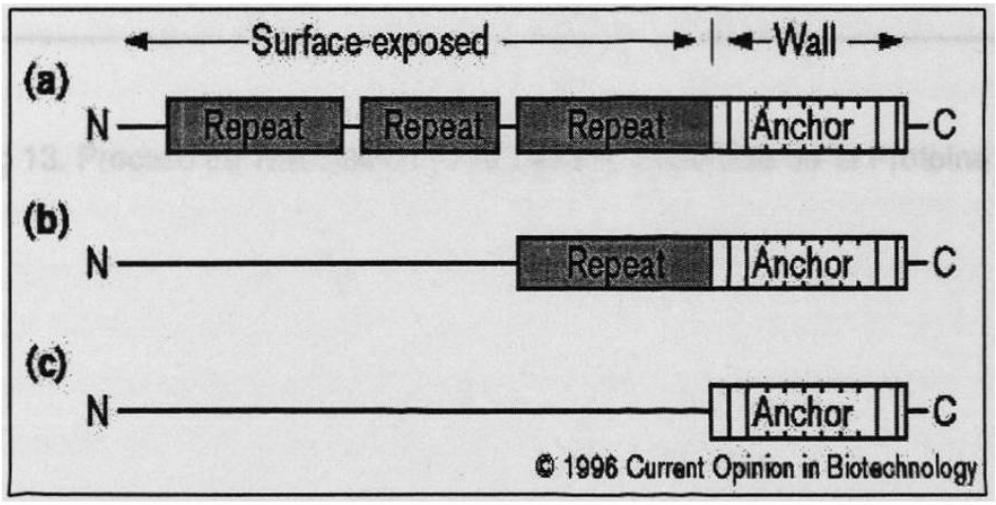
La familia de proteínas de superficie streptococal M esta compuesta por las proteínas Emm (Clase I y II), Mrp (FcrA) y Enn. Estas proteínas son moléculas dimericas elongadas alfa-hélice super enrolladas que además de unir moléculas Ig, también unen fibrinógeno, kininogeno, plasminógeno y albúmina, también 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 fosfolipidos cargados negativamente sobre la cara citoplasmática, respectivamente. La proteína de unión a membrana es posicionada para permitir el procesamiento del motivo LPXTG. Una enzima sorteasa putativamente rompe a la treonina y crea una unión amida con un grupo amino libre de un peptido 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 azucares, nisinas, dependientes de temperaturas, de pH, así como sistemas de proteínas blancos, y sistemas de expresión constitutiva han sido desarrollados. (Willem, M. 1999).



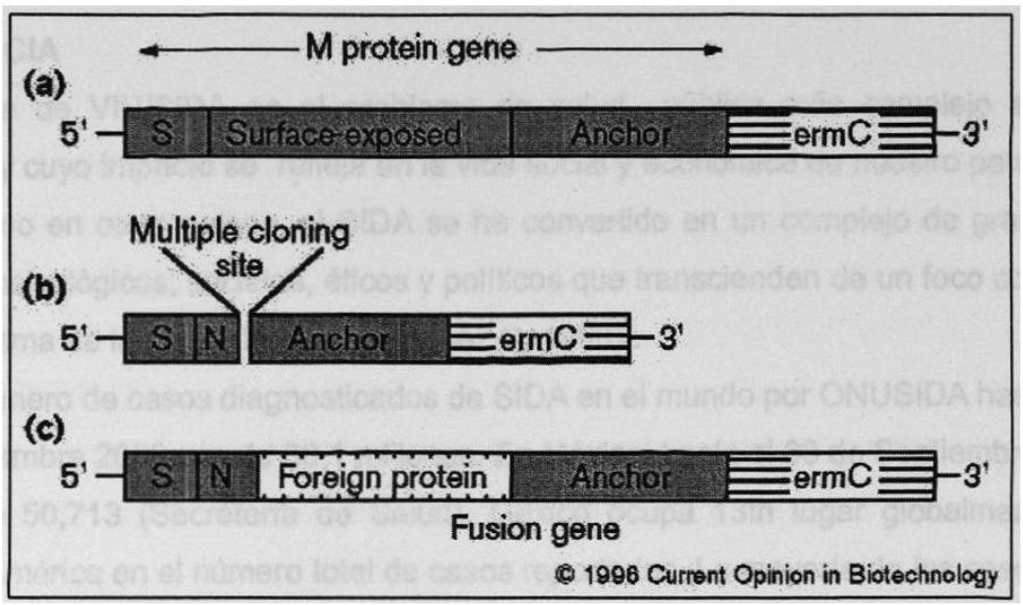


Fig 12. Estructura de la Proteína de Anclaje M6

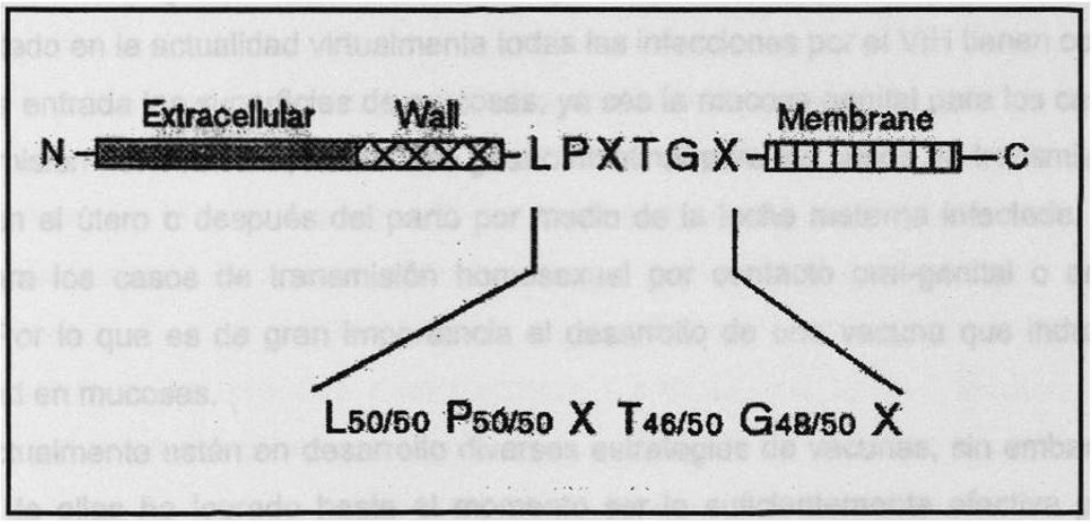


Fig 13. Proceso de Translación y Anclaje a la Superficie de la Proteína M

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 transcienden 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 especifica 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 µl.

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

Reactivo GIBCO	Cantidad (Volumen)
Buffer de Amplificación 10X	5 µl
$MgCl_2$ 50 mM	1.5µl
dNTPs mix 10 mM	1µl
Oligonucleotido1 10mM	1µl
Oligonucleotido 2 10mM	1µl
Templado	1µl
Taq Polimerasa 5u/µ	0.5µl
H_2O_{pcr}	39µl

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
Reperir 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.*

Crecer 200 mL de la cepa de L.lactis (MG1363) la cual es una bacteria sin plasmidos 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 mas, 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 H_2O_{pcr}, se coloca en ebullición por 5 minutos y se toma una alícuota para realizar el PCR.

7.3 DETECCION DE LA EXPRESION DE LA PROTEÍNA gp120 DEL VIH EN *L.lactis.* POR Western Blot

Para determinar si el lactococcus esta 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 bloqueo 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 adiciono 3 ml del sustrato peroxidasa, luminol 1:1 (Pierce súper signal), después de 5 minutos se coloco 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 enjuago en agua y se coloco por un minuto en solución fijadora (Kodak), volviendo a enjuagar en agua al final del proceso.

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

7.4.1 ANÁLISIS DE WHOLE- CELL ELISA:

Crecer 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 µl 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 150µl 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 µl 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 100µl del anticuerpo conjugado anti-IgG humano peroxidasa. Incubar 1 hora a 37°C, Lavar 3 veces con PBS-tween al 0.5% y adicionar 100µl 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:

Crecer 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 ultima 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 tiñeron con Hematoxilina y Eosina. Tambien se obtuvieron cortes de ratones inmunizados con una sola dosis de bacteria viva recombinante para la realización de Inmunohistoquimica 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 200µl 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 antigeno por medio de la adicion 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 antigeno es purificado con isopropanol frio en una relación de 2:1, se incubó por 20 minutos a 4°C y se centrífugo 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 CO_2. 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 0.2μm, se deja secar el filtro y se le añade aproximadamente 500 μl de liquido de centelleo (Amersham International). La incorporación de timidina tritiada se analizo en un contador de centelleo liquido marca Beckman.

7.8 ANALISIS HISTOLOGICO DE LOS EPITELIOS EN ESTOMAGO E INTESTINO DELGADO

Para el análisis histologico de los epitelios en estomago e intestino, se obtuvieron 2 piezas de tejido de estomago 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 coloco 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 inmunohistoquimica (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 retrival 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 construyo 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 x 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).

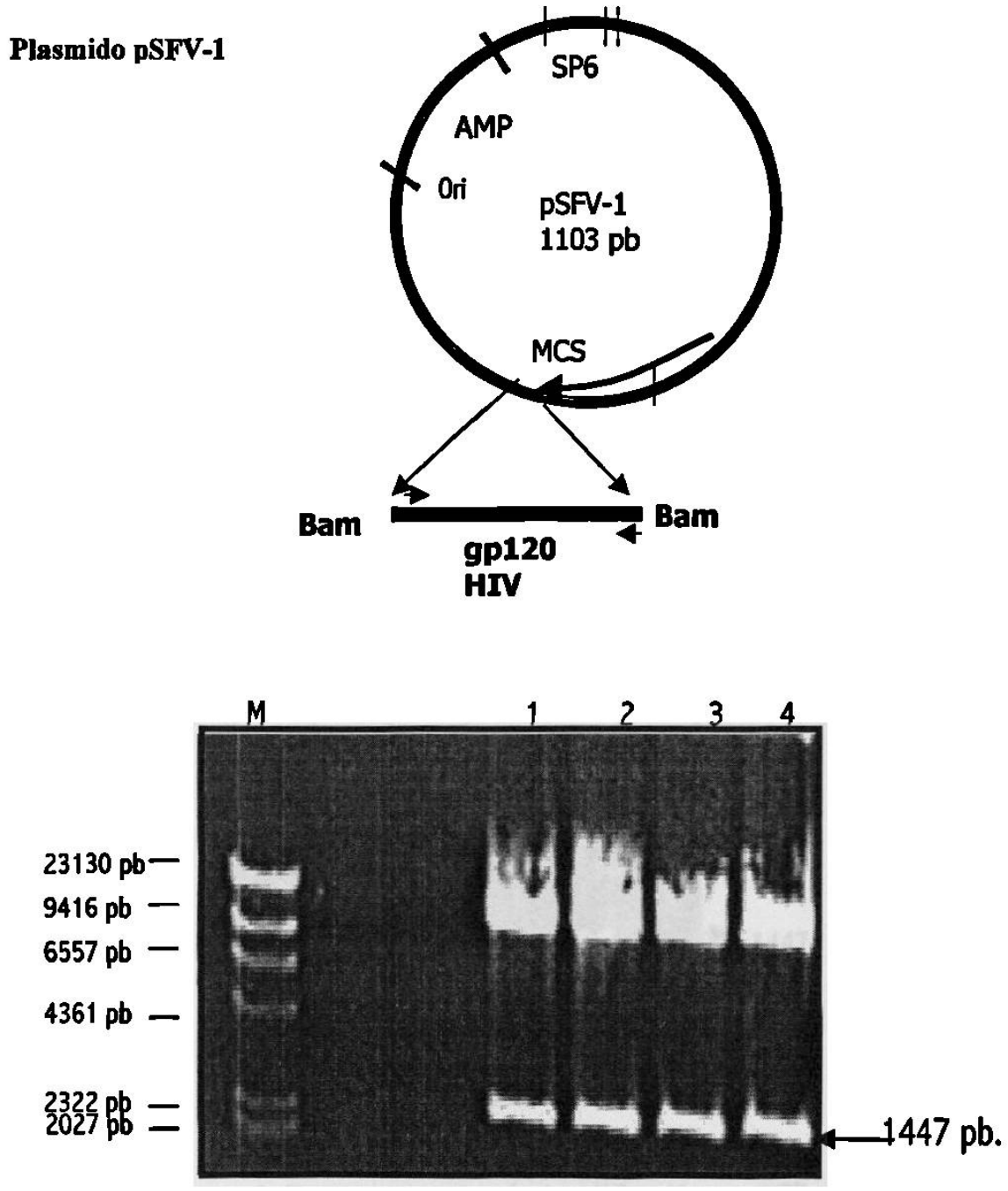
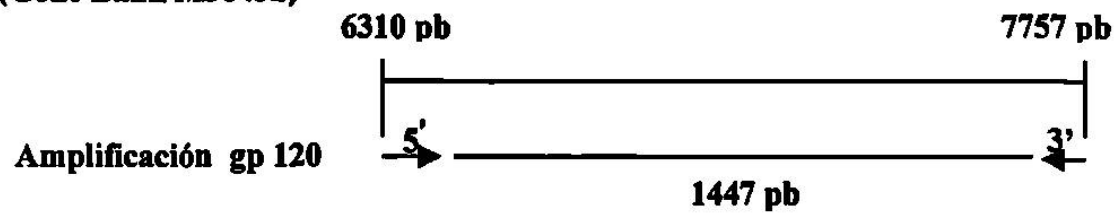


Fig 14. Caracterización del gen de la gp 120 en el Plasmido pSFV-1. M) DNAHind III. 1-4) Digestión enzimatica del plasmido pSFV-1 con Bam H 1, para la liberación del gen de la proteína gp 120 de 1447 pb.

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

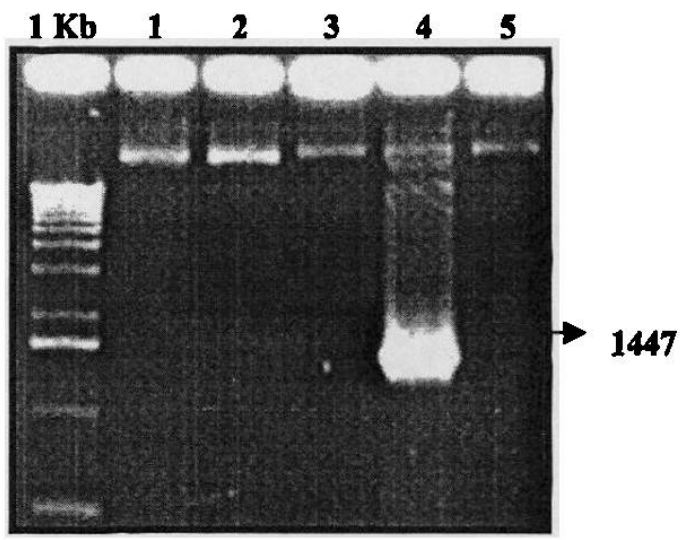
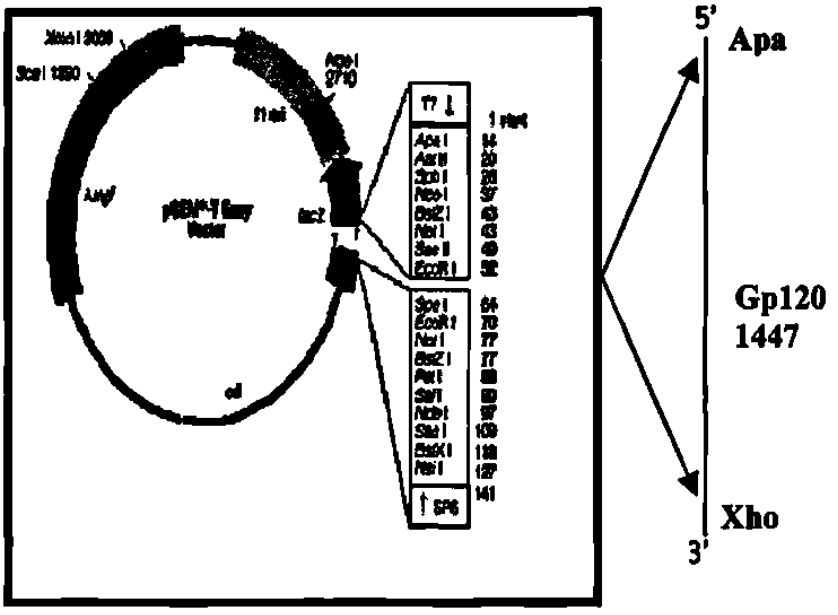


Fig 15. Gradiente de Temperaturas para la Amplificación por PCR del gen de la Proteina gp 120 del DNA del Plasmido pSFV-1.
M) 1 Kb 1-5) Temperaturas de amplificación de 60 a 64 °C respectivamnte .

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 Apal 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 Apal 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

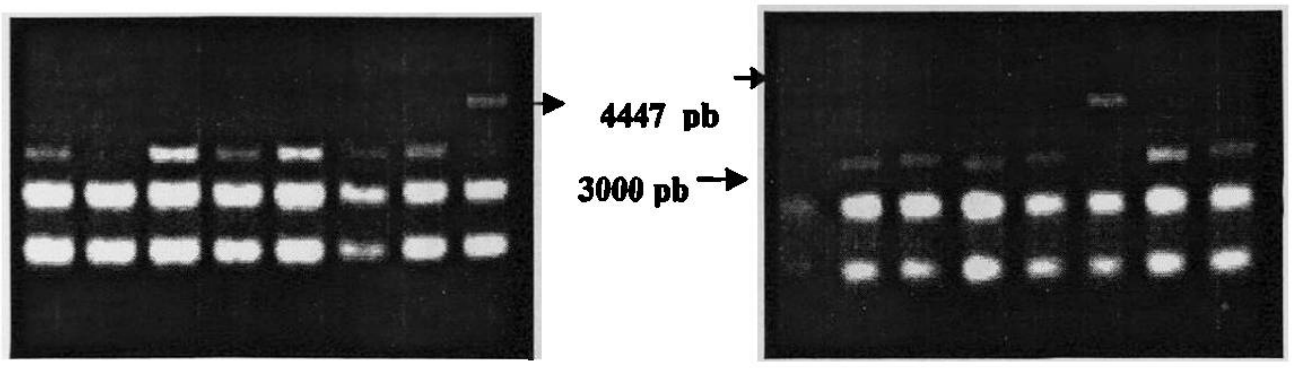


Fig 16. Clonación de la gp120 en el Vector pGEM-T.

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

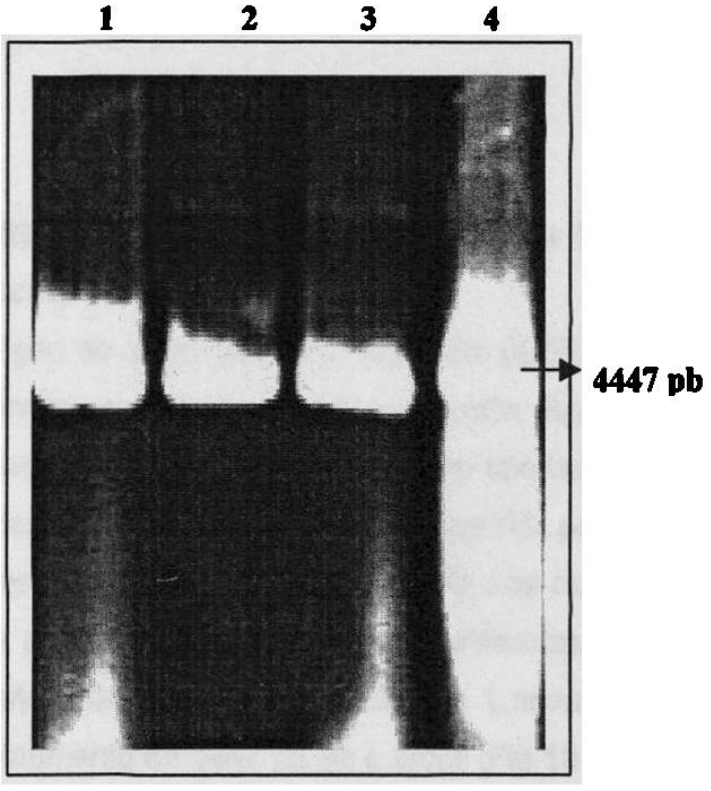


Fig 17. Purificación del Plasmido pGEMTgp120 por Maxi-Prep.
1-4) ADN plasmidico obtenido

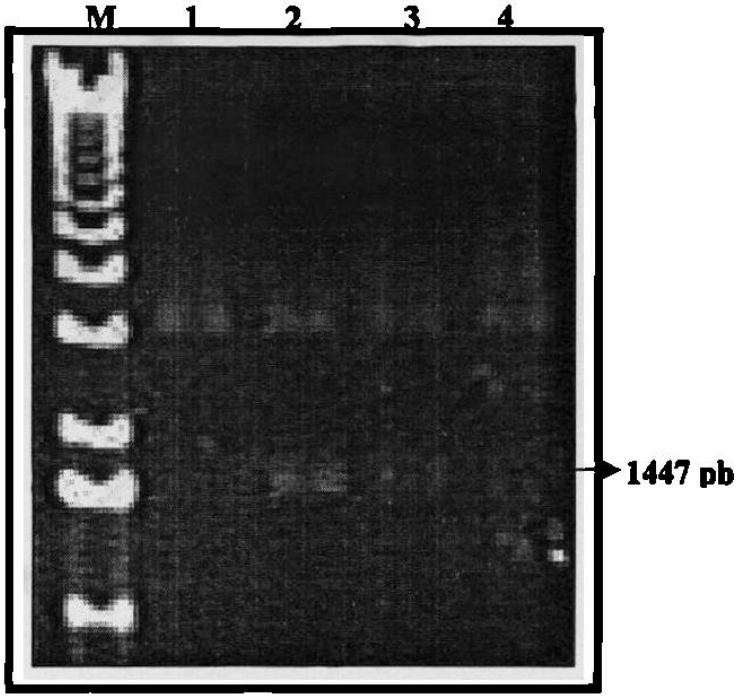
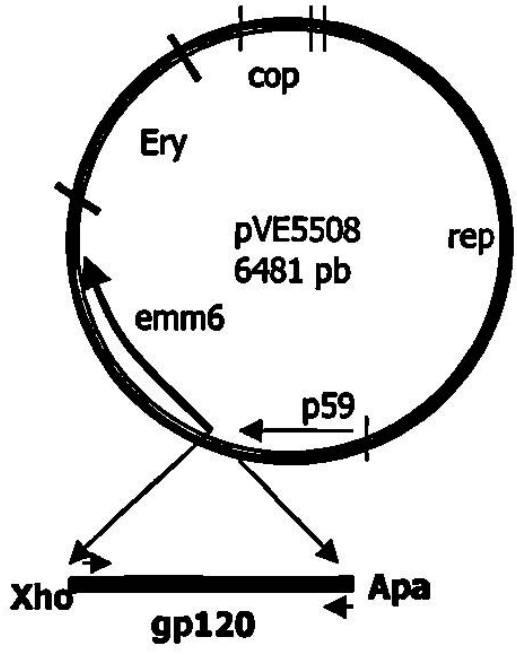


Fig 18. Caracterización del Plasmido pGEMTgp120. Liberación del plasmido por digestión enzimática con Apa I y Xho I. M) 1Kb, 1 y 4) clonas sin inserto, 2-3) clonas positivas.

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 Xho I 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 especifica 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).

A)



B)

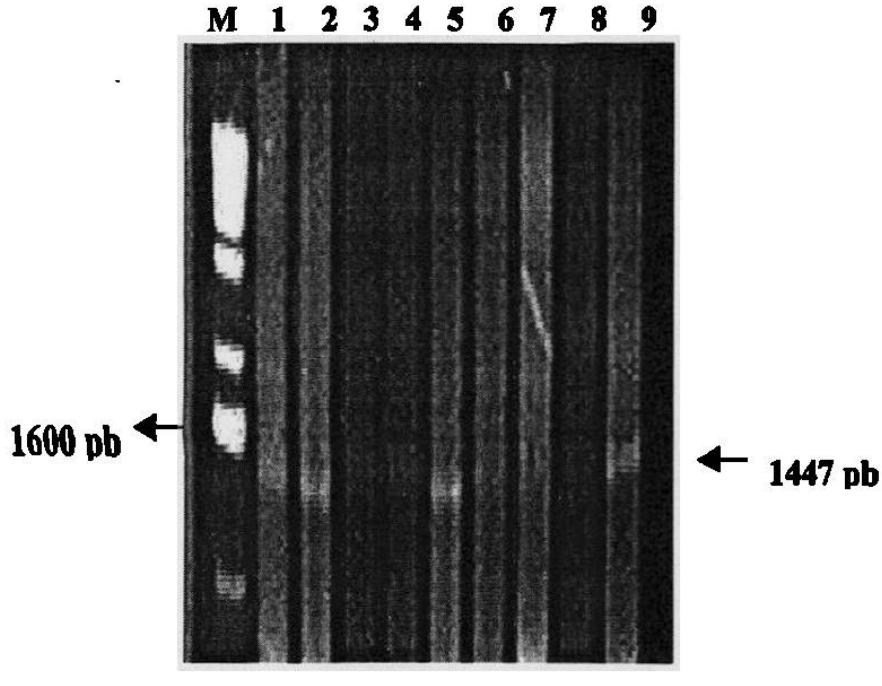
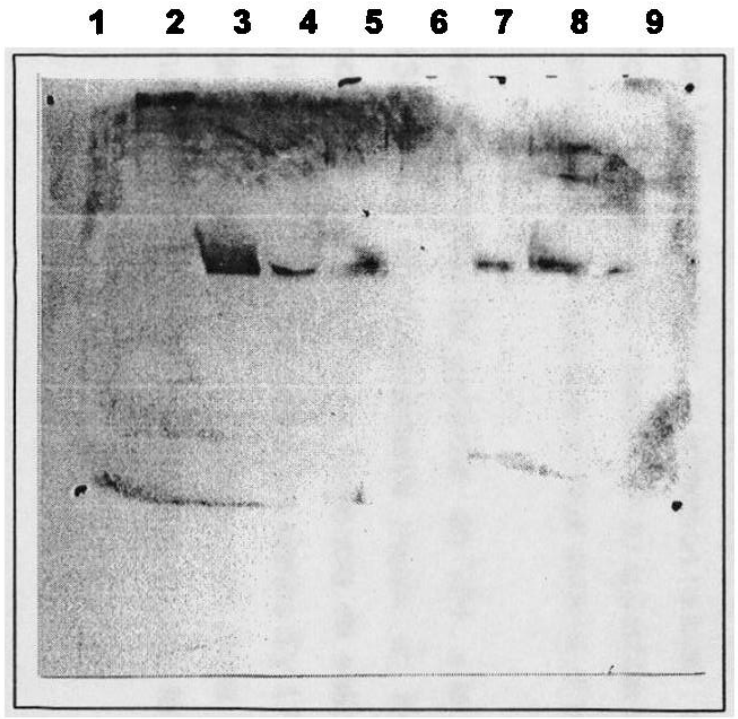
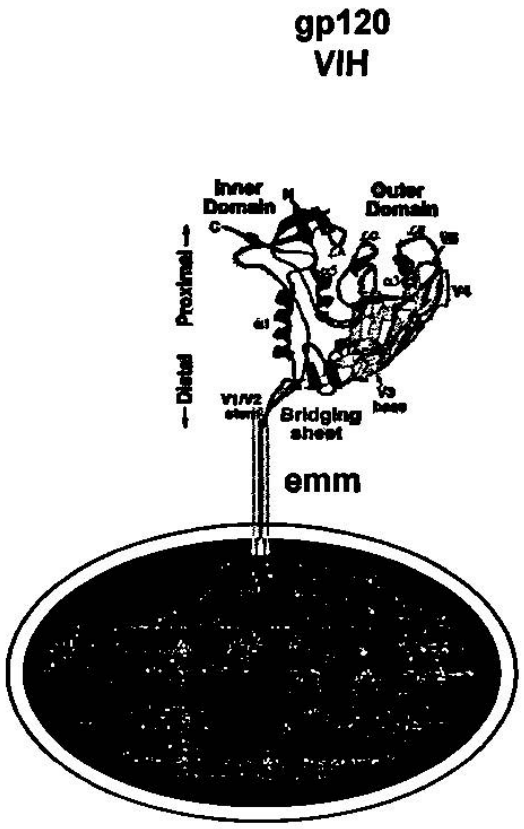


Fig 19. Detección de la gp120 en Transformantes de *Lactococcus lactis* por PCR en Colonia. M) 1 Kb 1,2 5, 9 clonas positivas de *L. Lactis* para gp 120

8.3 DETECCION DE LA EXPRESION 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 checada 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 y2 donde se colocaron los extractos proteicos de las cepas control de *L.lactis* no se detecto 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).





1.- L. lactis MG 1363
2.- L. lactis VE5522
3.- MG 1363(1) + p59gp120
4.- MG 1363(5) + p59gp120
5.- MG 1363(10) + p59gp120
6.- VE5522(1) + p59gp120
7.- VE5522(14) + p59gp120
8.- VE5522(17) + p59gp120
9.- VE5522(20) + p59gp120

Anti-gp120 del HIV
monoclonal de raton (CHEMICON)
+
Anti-raton-Peroxidasa (SIGMA)
+
Detección por Quimiolumiscencia con SuperSignal (Luminol+Peroxido de Hidrogeno)
(PIERCE CHEMICAL)

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

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

8.4.1 ANÁLISIS DE WHOLE-CELL ELISA:

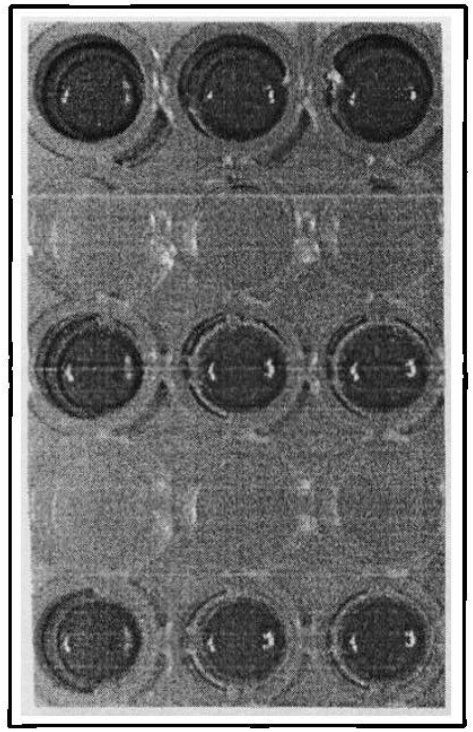
De los resultados obtenidos en el ensayo de Western blot seleccionamos 3 clonas de *L. lactis* recombinantes que expresan adecuadamente la gp120 , dado que un anticuerpo comercial reconoció específicamente una única proteína en los extractos de estas células , para determinar si estas clonas expresan 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



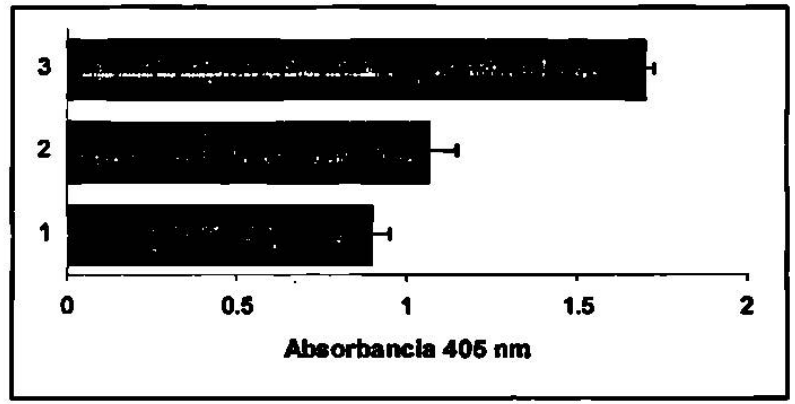


Fig 21. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por WholeCell-ELISA