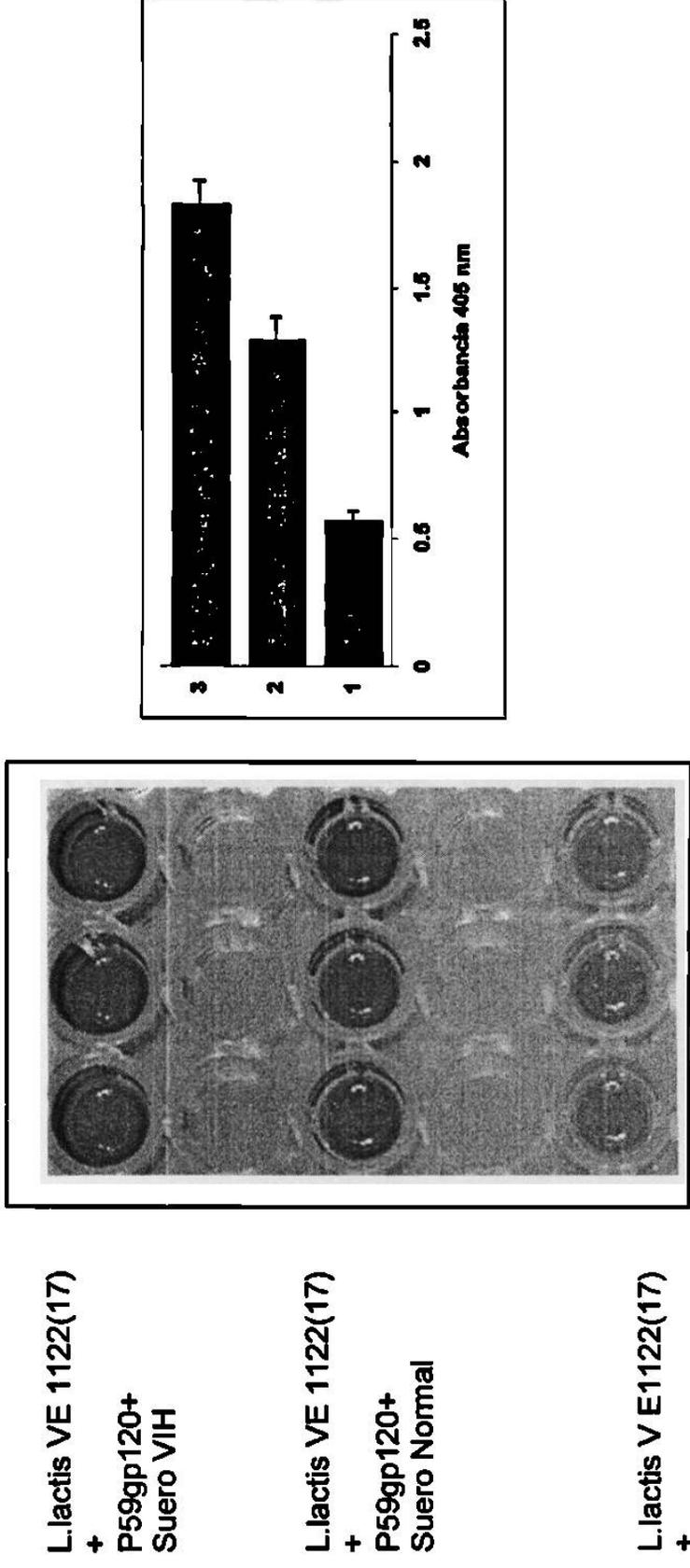


Fig 22. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por WholeCell-ELISA



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

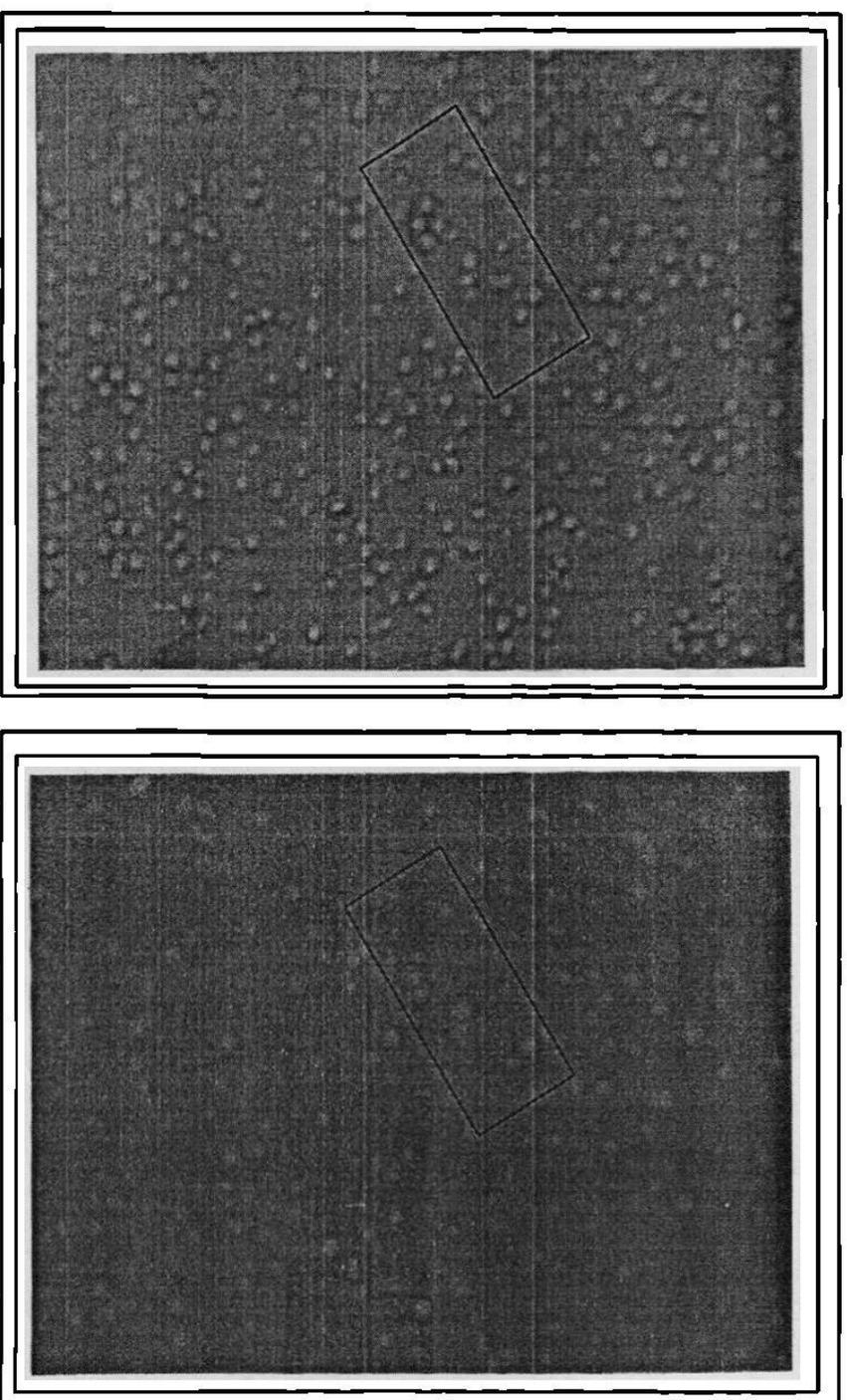
L.lactis VE 1122(17)
+
P59gp120+
Suero Normal

L.lactis VE 1122(17)
+
Suero VIH

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

8.4.2 ANALISIS DE INMUNOFLUORESCENCIA

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



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

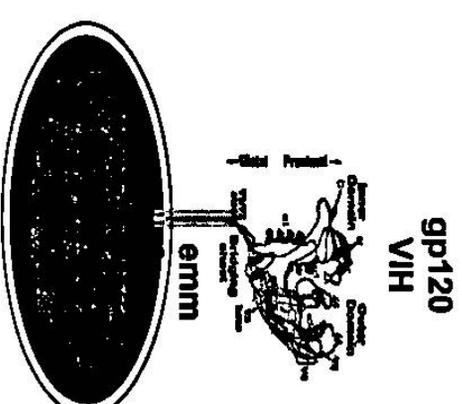
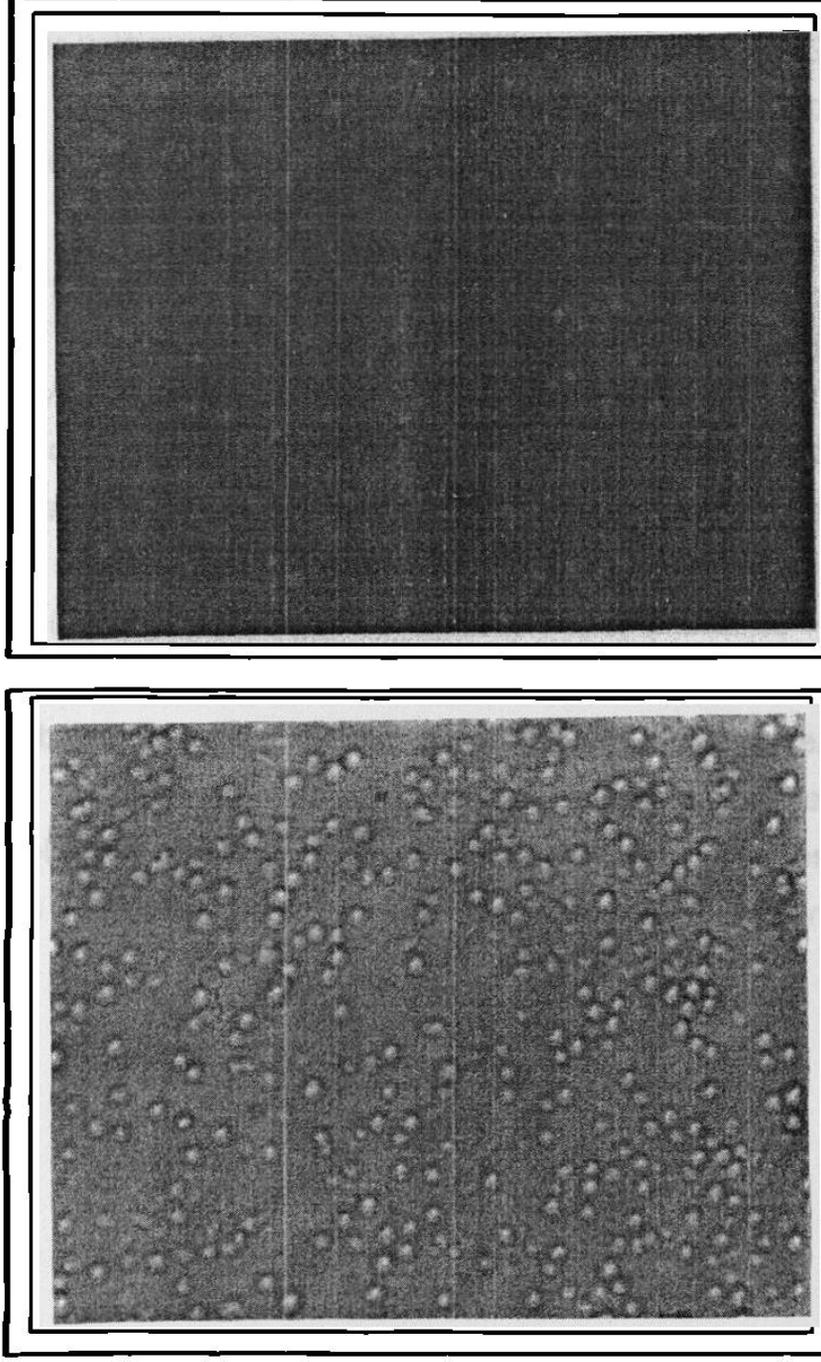


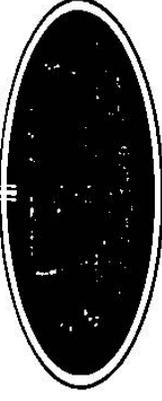
Fig 24. Detección de la Expresión en Superficie de la Proteína gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por Inmunofluorescencia



gp120
VIH



emm



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

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

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

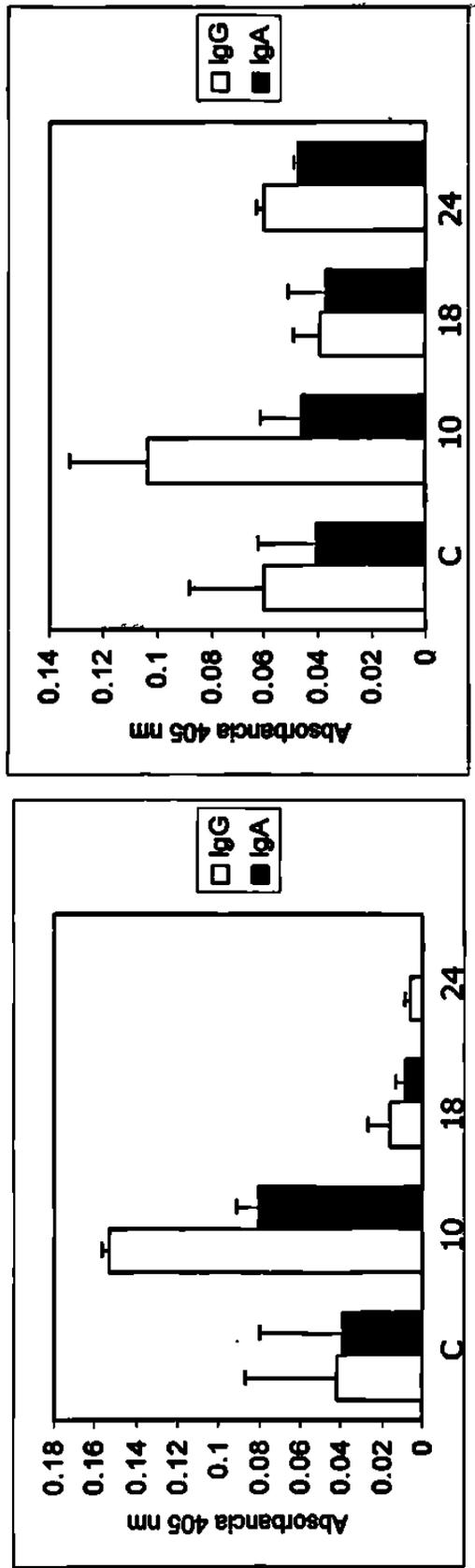
Para determinar si *L.lactis* recombinante que expresa la gp 120 en superficie externa es capaz de inducir inmunidad humoral en mucosas, se realizaron varios experimentos, administrando por vía oral con un catéter de teflón 10^9 bacterias vivas en una sola dosis de *L.lactis* recombinante y en tres dosis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

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

8.5.1.1 ANTICUERPOS EN LAVADO ESTOMACAL:

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

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

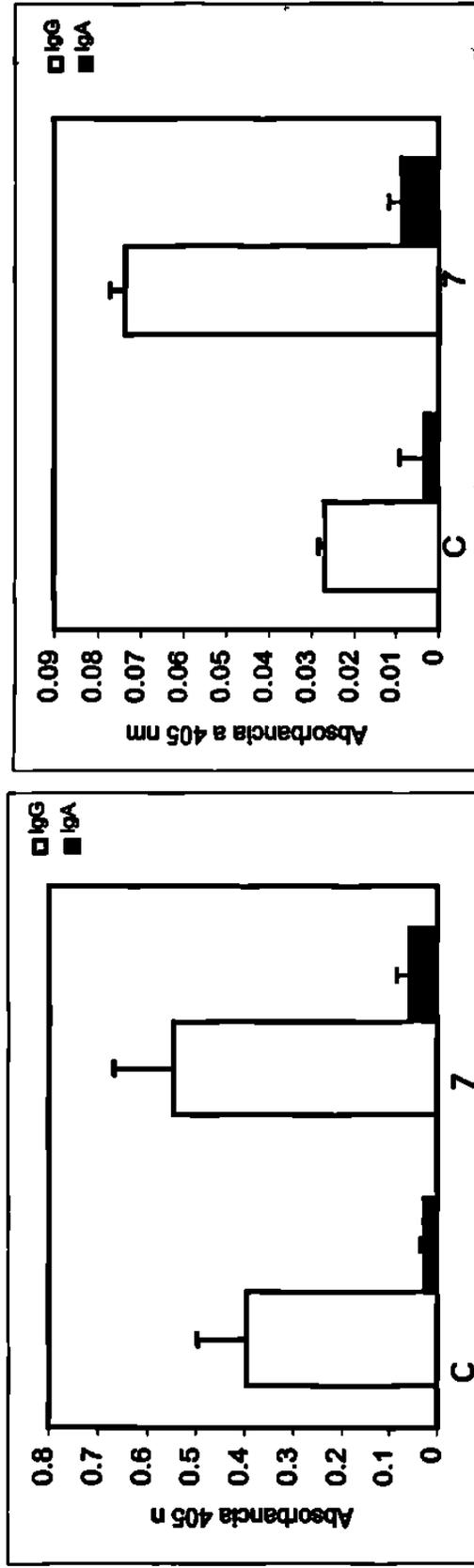


Analisis por ELISA Comercial

Analisis por ELISA con *L. lactis*

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

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



Analisis por ELISA Comercial

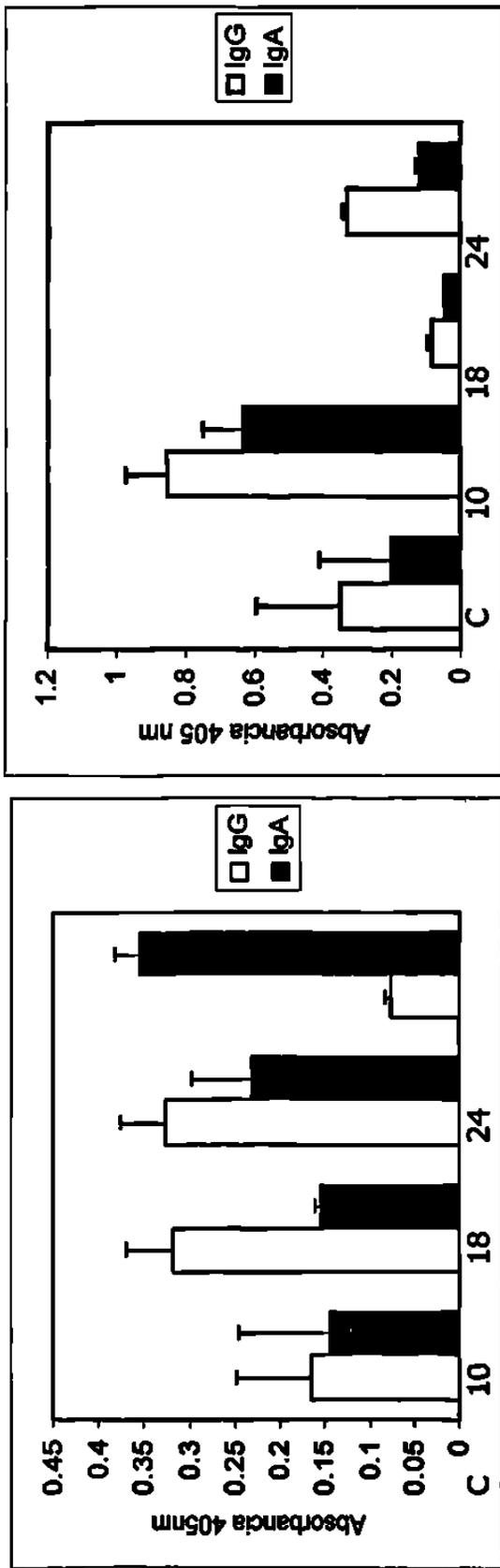
Analisis por ELISA con *L. lactis*

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

8.5.1.2 ANTICUERPOS EN LAVADO INTÉSTINAL:

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

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

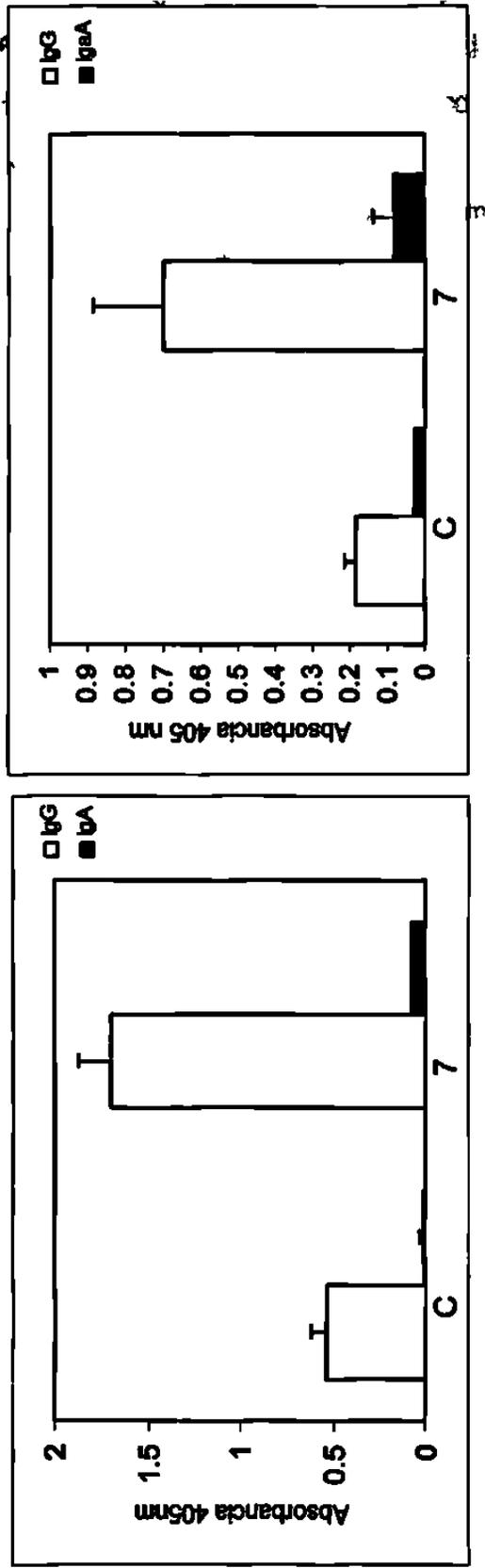


Analisis por ELISA Comercial

Analisis por ELISA con *L. lactis*

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

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



Analisis por ELISA Comercial

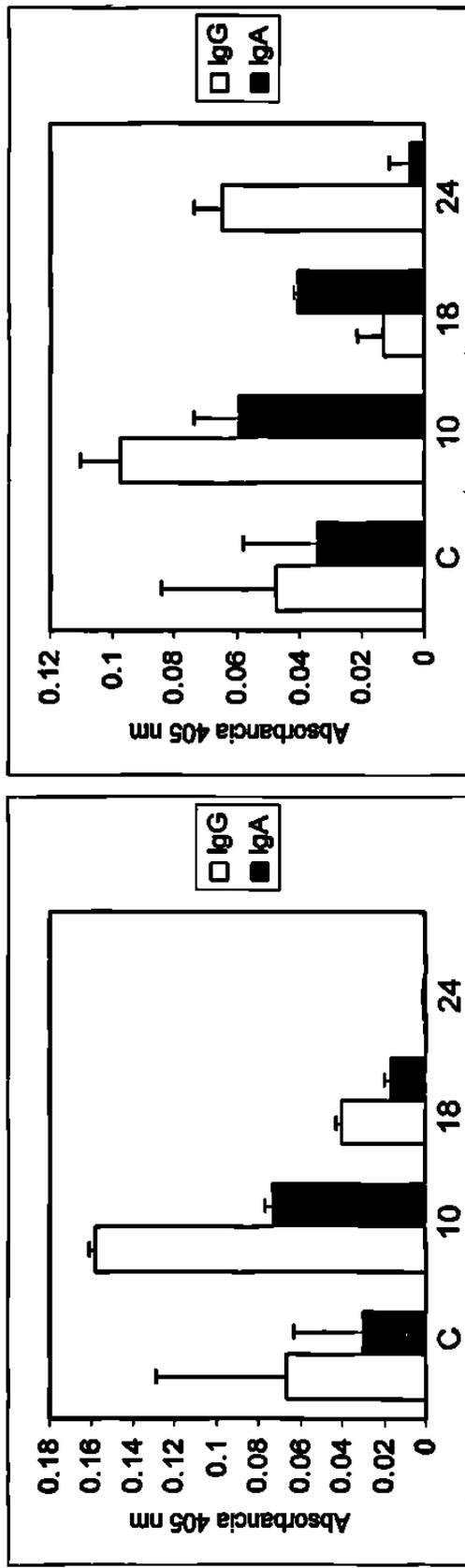
Analisis por ELISA con *L. lactis*

Fig. 29 Niveles de Anticuerpos en Lavado Intestinal con 10^9 Bacterias en 3 Dosis

8.5.1.3 ANTICUERPOS EN HECES:

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

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

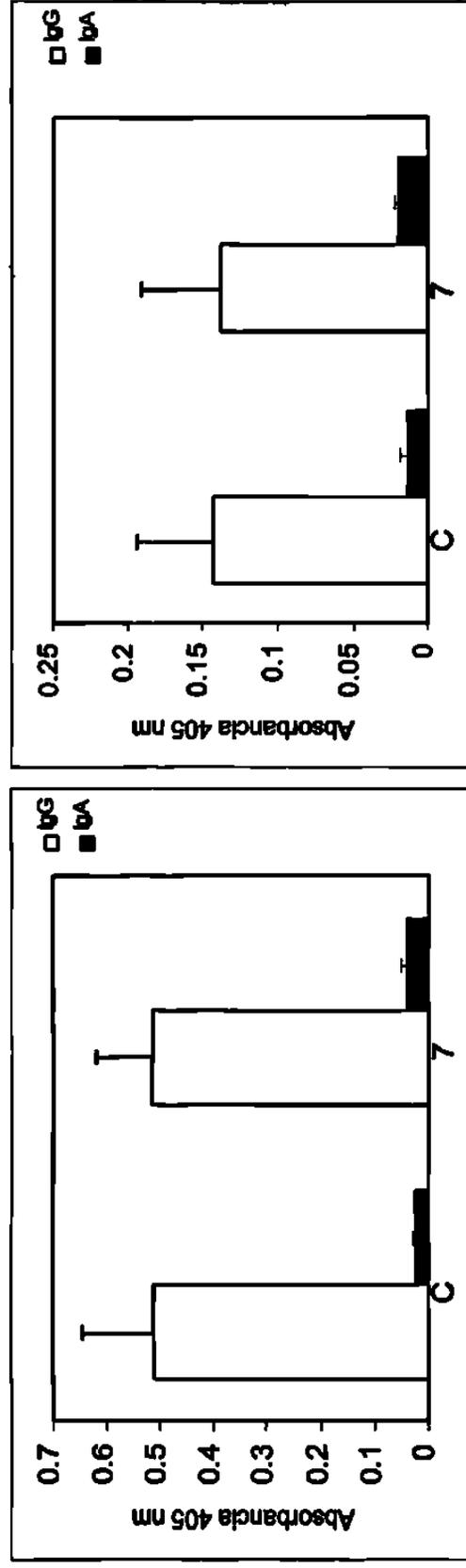


Analisis por ELISA Comercial

Analisis por ELISA con *L. lactis*

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

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



Análisis por ELISA Comercial

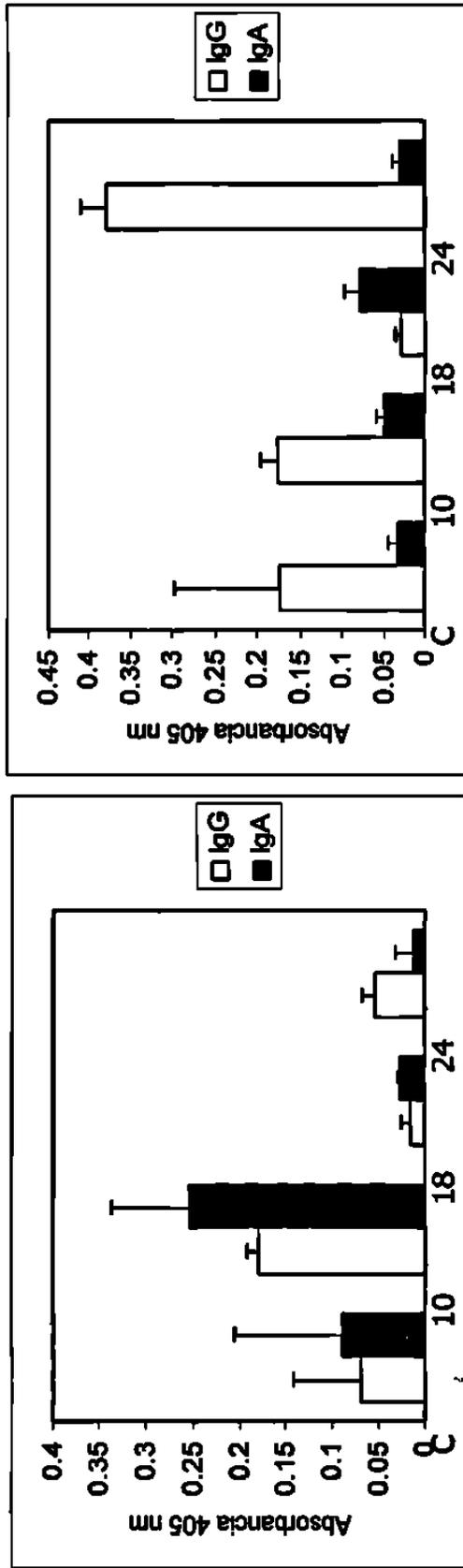
Análisis por ELISA con *L. lactis*

Fig. 31 Niveles de Anticuerpos en Heces con 10^9 Bacterias en 3 Dosis

8.5.1.4 ANTICUERPOS EN SUERO:

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

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

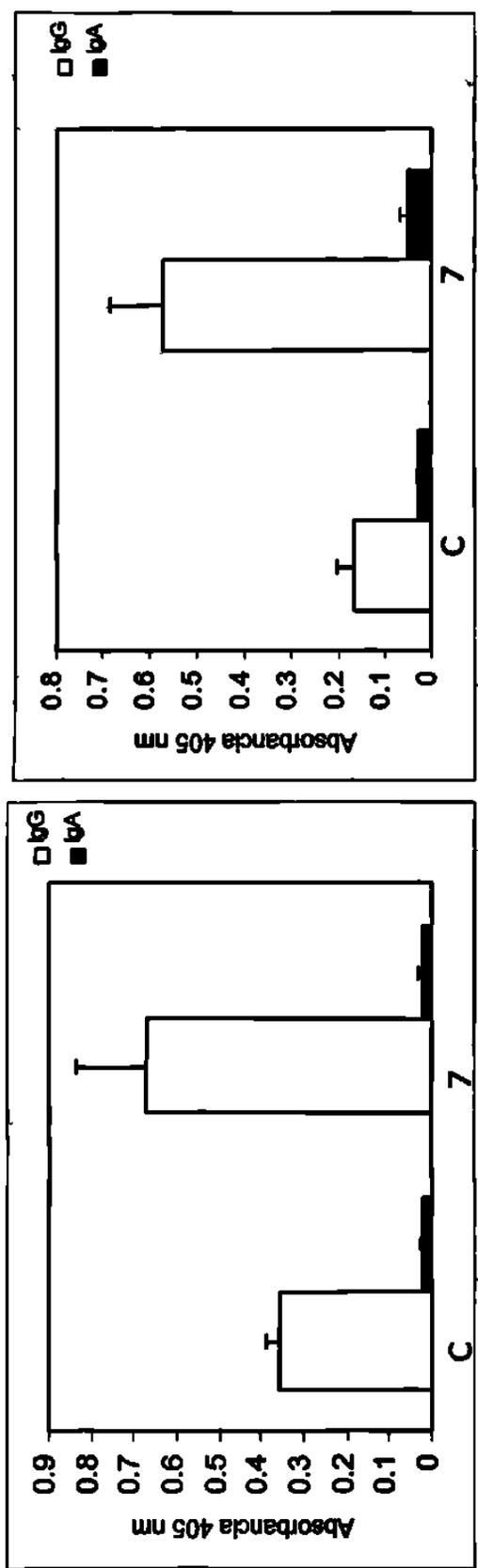


Analisis por ELISA Comercial

Analisis por ELISA con *L. lactis*

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

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



Analisis por ELISA Comercial

Analisis por ELISA con *L. lactis*

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

8.5.2 OBTENCION DEL ANTIGENO VIH-1

8.5.2.1 DETECCION DEL ANTIGENO VIH-1 POR Western BLOT

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

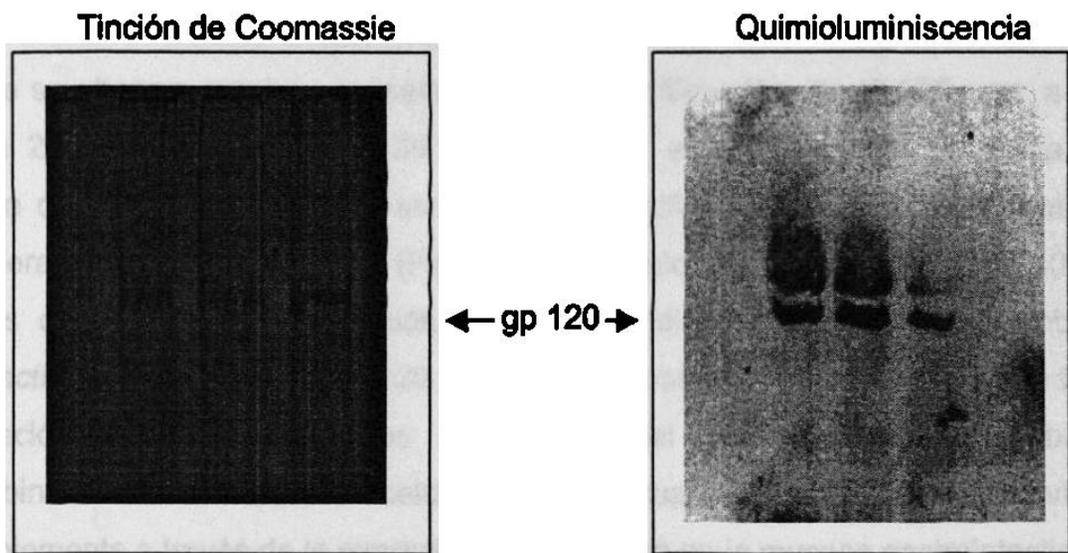


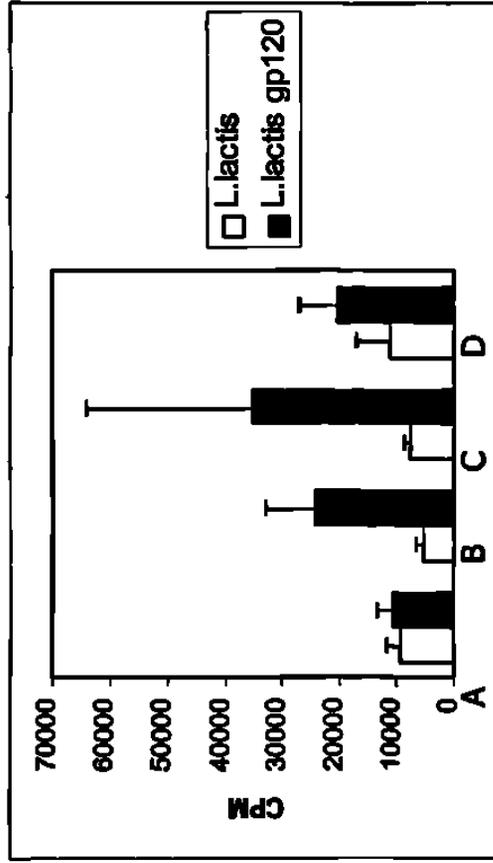
Fig 34.- Detección del Antígenos VIH-1 en Geles de Poliacrilamida y Western Blot .

8.5.3 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

8.5.3.1 ANALISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN LINFOCITOS DE BAZO

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

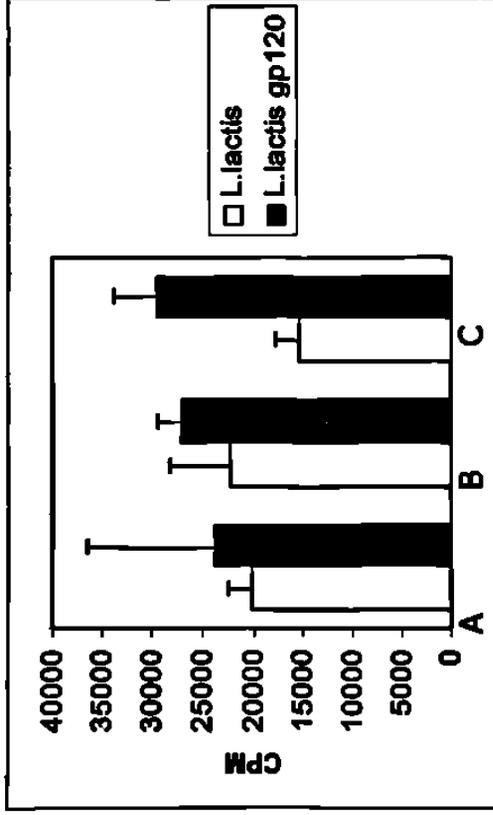
Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



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

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

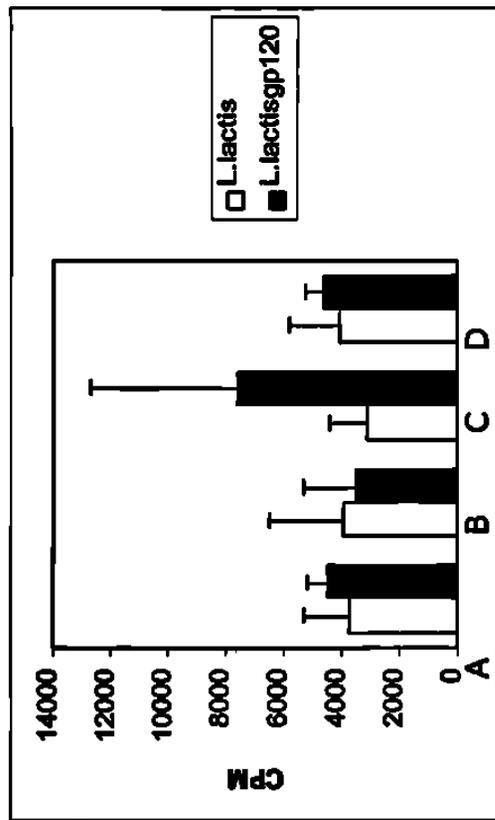
Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



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

Fig 36. Ensayo de Proliferación con Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 18 Días Después de la Inmunización con 10⁸ Bacterias en una Sola Dosis

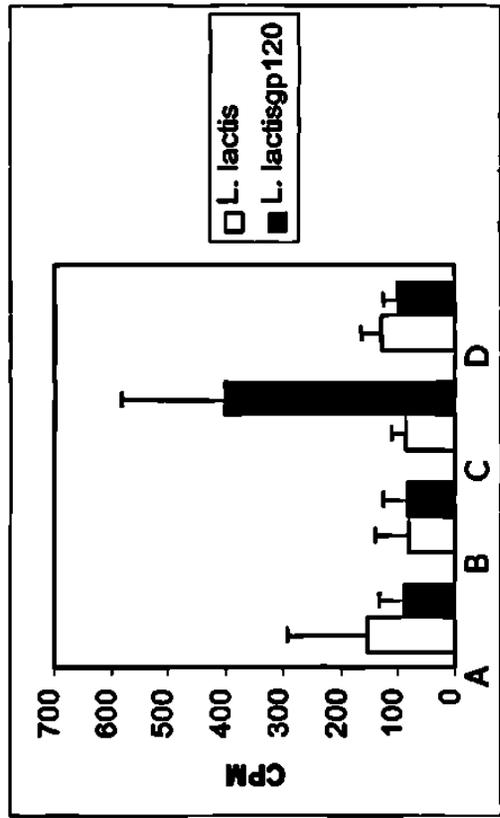
Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración Oral de *Lactococcus lactis* Recombinante que Expresa la gp120 en Superficie Externa



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

Fig 37. Ensayo de Proliferación con Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 24 Días Después de la Inmunización con 10^9 Bacterias en una Soja Dosis

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



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

Fig 38. Ensayo de Proliferación con Linfocitos de Bazo Obtenidos a los 7 Días Después de la Inmunización con 10^9 Bacterias en 3 Dosis..

8.5.4 ANÁLISIS HISTOLOGICO DE LOS EPITELIOS EN ESTOMAGO E INTESTINO DELGADO

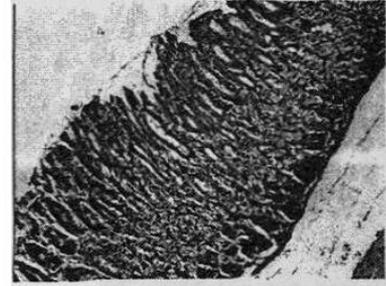
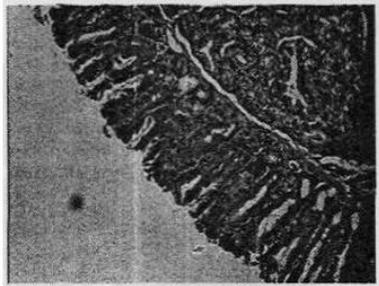
Con el objetivo de determinar si *L. lactis* recombinante produce alteraciones morfológicas en la mucosa, que sean indicativos de posible daño en ésta, se realizaron cortes histológicos de mucosa estomacal e Intestinal. El análisis histológico de las mucosas en el estomago a los 10, 18 y 24 días después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

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

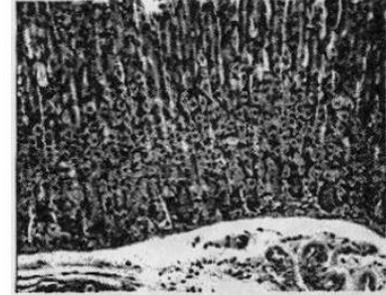
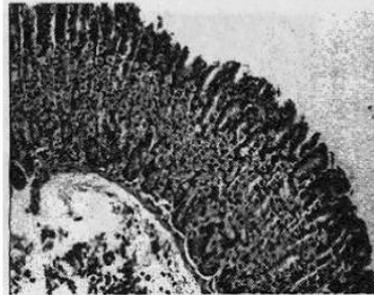
Control
(*L. lactis* normal)

Inmunizado
(*L. lactis* gp 120)

a)



b)



c)

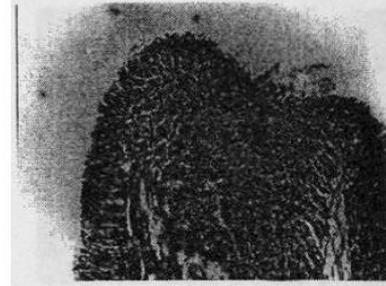
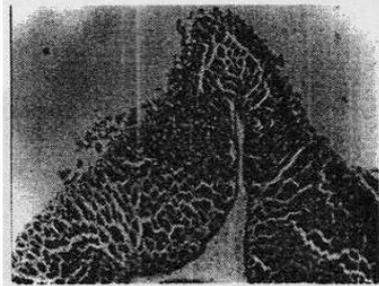


Fig. 39. Cortes Histológicas de la Mucosa del Estomago Teñidos con Hematoxilina y Eosina. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 (a), 18 (b) y 24 (c) días después de la administración oral de la bacteria normal y recombinante a una dosis de 10^9 .

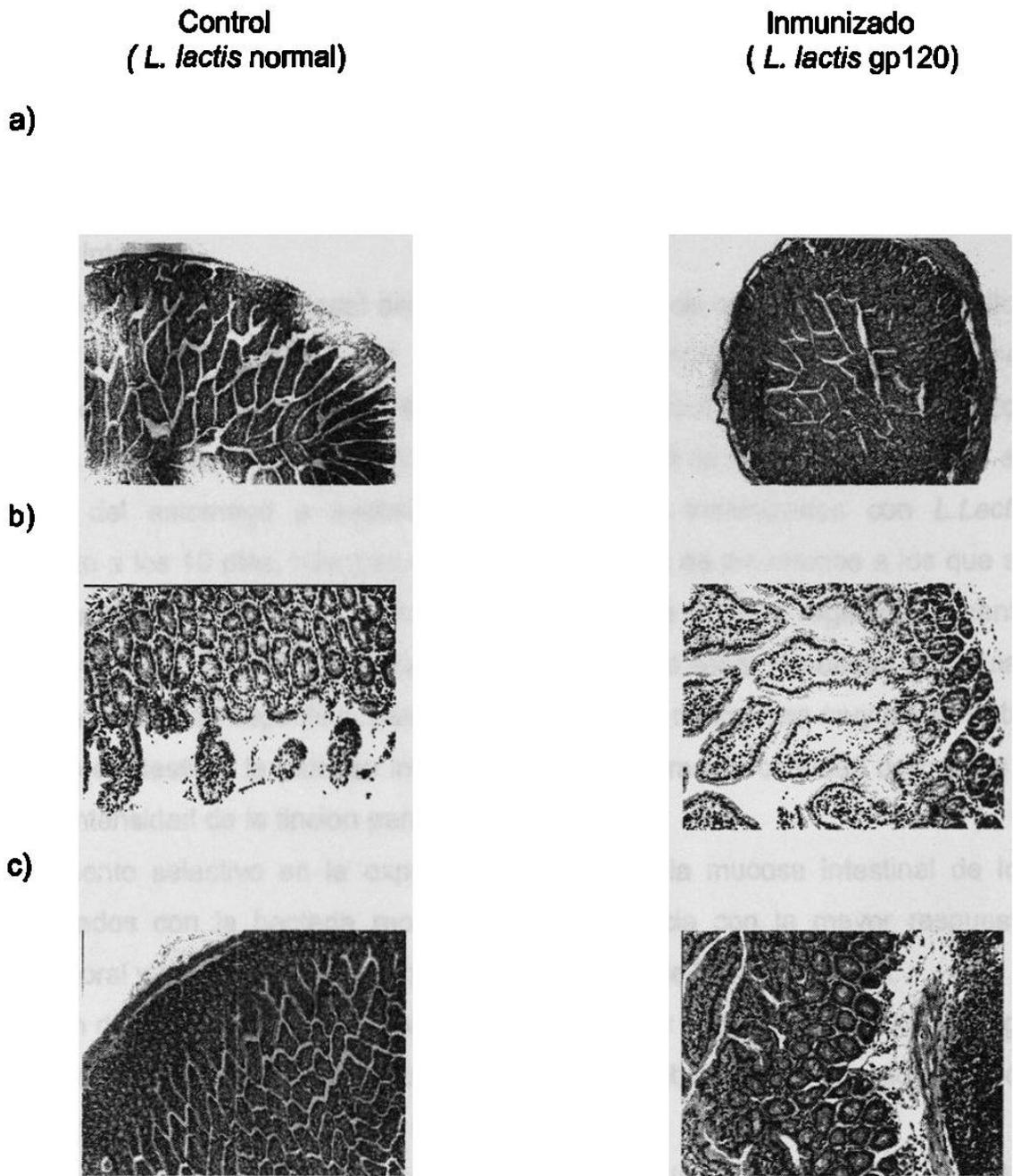


Fig 40. Cortes Histológicos de la Mucosa del Intestino Delgado Teñidos con Hematoxilina y Eosina. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 (a), 18 (b) y 24 (c) días después de la administración oral de la bacteria normal y recombinante a una dosis de 10^9 .

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

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

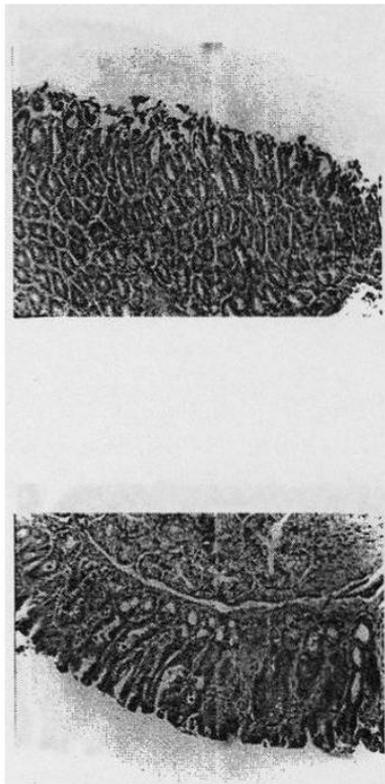
Esta inducción de inmunidad local debe ser acompañada de cambios en los linfocitos asociados a las mucosas, por esta razón realizamos la detección por inmunohistoquímica de la expresión de marcadores de linfocitos T(CD4) y macrófagos o monocitos (Mac). Se encontró un incremento significativo de la expresión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

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

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

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

Control
(*L. lactis* normal)



Inmunizado
(*L. lactis* gp120)

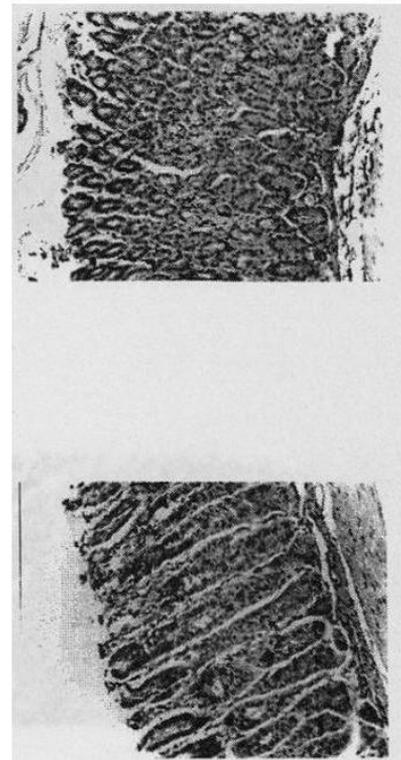
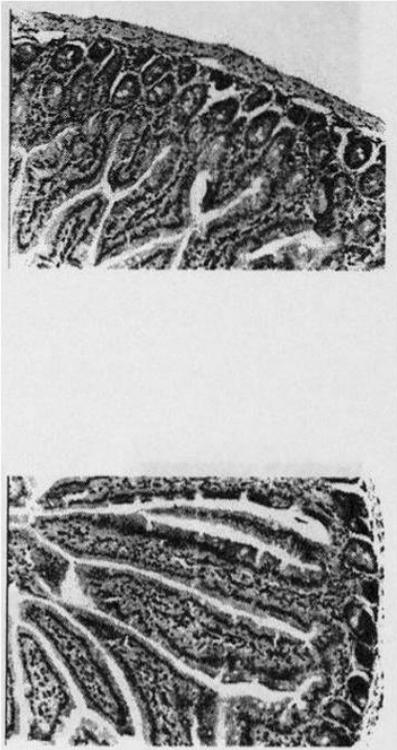


Fig. 41. Detección de la Expresión de CD4 por Inmunohistoquímica en la Mucosa del Estomago. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 días después de la administración oral con una dosis de 10^9 bacterias.

Control
(*L. lactis* normal)



Inmunizado
(*L. lactis* gp120)

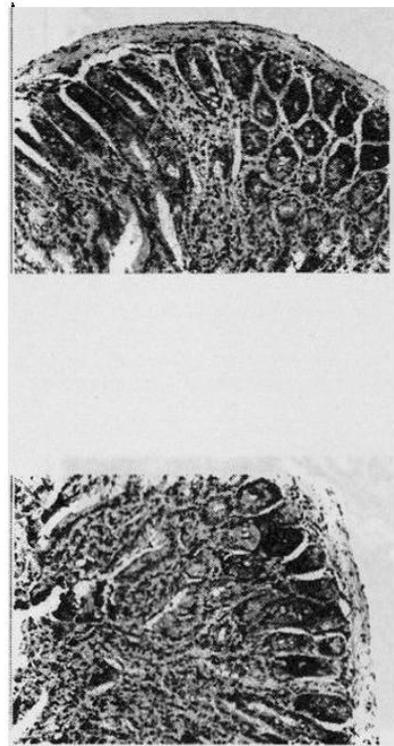
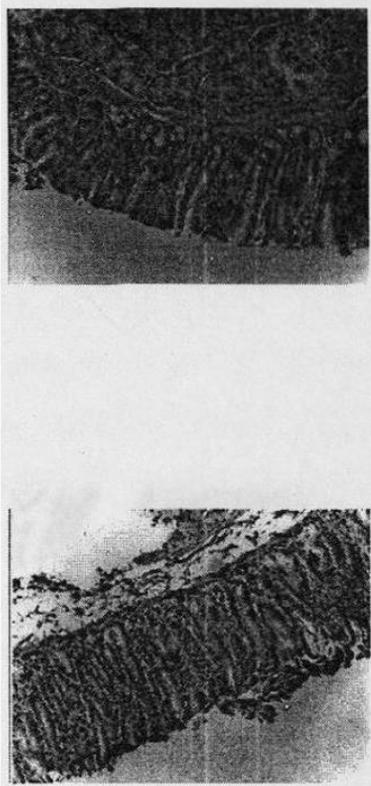


Fig. 42. Detección de la Expresión de CD4 por Inmunohistoquímica en la Mucosa Intestinal. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 días después de la administración oral con una dosis de 10^9 bacterias.

**Control
(*L. lactis* normal)**



**Inmunizado
(*L. lactis* gp120)**

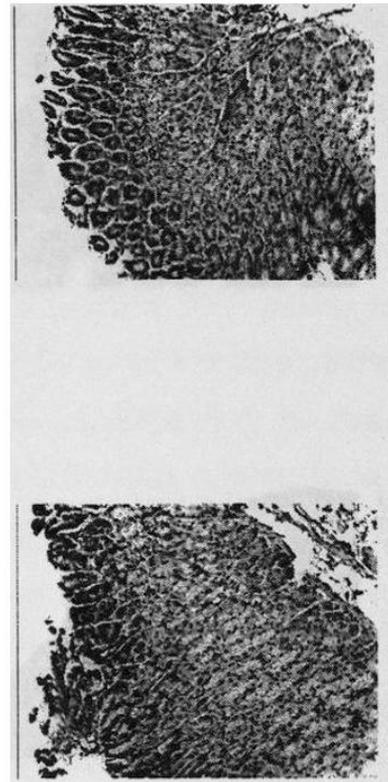
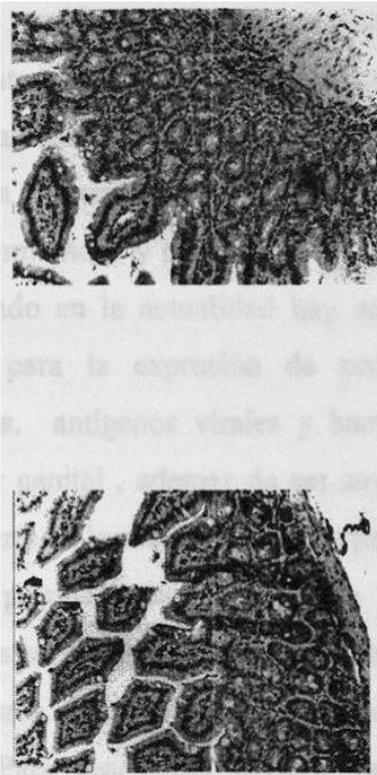


Fig 43. Detección de la Expresión de Mac por Inmunohistoquímica en la mucosa del Estomago. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 días después de la administración oral con una dosis de 10^9 bacterias.

Control
(*L. lactis* normal)



Inmunizado
(*L. lactis* gp120)

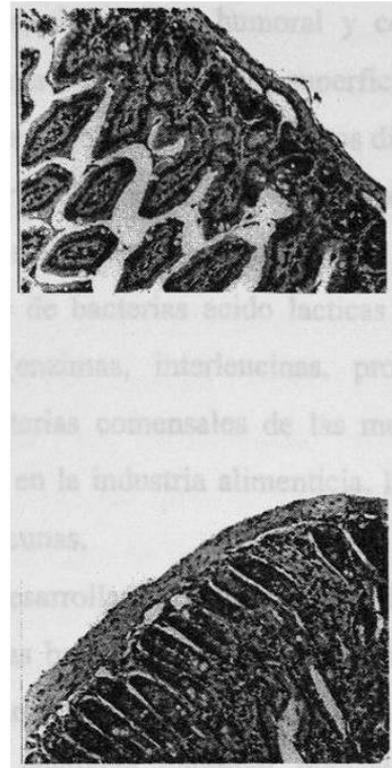


Fig 44. Detección de la Expresión de Mac por Inmunohistoquímica en la T Mucosa Intestinal. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 días después de la administraciom oral con una dosis de 10^9 bacterias.

CAPITULO 9

DISCUSIONES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPITULO 10

CONCLUSIONES

- 1.- Se desarrollo la tecnología para llevar a cabo la modificación genética de bacterias lácticas (*Lactococcus lactis*), lo cual permitirá a corto plazo llevar a cabo la manipulación de estas bacterias comestibles, para la producción y envío de proteínas con interés terapéutico al aparato gastrointestinal.

- 2.- Se desarrollo la tecnología para anclar en pared celular proteínas heterólogas como antígenos (gp120) en la superficie externa de *Lactococcus lactis*.

- 3.- Se desarrollo un sistema para inducir inmunidad humoral (IgG e IgA) en varias mucosas del aparato gastrointestinal y sistémica en suero contra la gp120 del VIH basado en la generación de *L.lactis* recombinante.

- 4.- Se desarrollo un sistema de Inducción de Inmunidad celular sistémica (Proliferación celular específica de antígeno) basado en la administración oral de *L.lactis* recombinante.

- 5.- La presente estrategia para inducir inmunidad contra el VIH basada en la administración oral de *L.lactis* recombinante puede ser optimizada para inducir inmunidad protectora contra la infección por el virus y evaluar en su momento su papel como vacuna más efectiva y segura para el VIH.

CAPITULO 11

PERSPECTIVAS

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

CAPITULO 12

BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Gunneriusson,E. Samuelson,P. Uhlen,M. Nygres,A.Stahl,S. Surface display of a functional single-chain Fv antibody on Staphylococcus. *J.Bacteriol.*1996;178:1340-1346.
- Hess,J.1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93,1458-1463.
- Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm AM. Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiology* 1992 Feb; 184 (2-3): 157-79.
- Holmgren J. Mucosal immunity and vaccination. *FEMS Microbiol Immunol.*1999 Dec;4(1):1-9.
- Hone,D.M. 1991. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9,810-816.
- Ikonomidis,D. 1994. Delivery of a viral antigen to the class I processing and presentation pathway by *Listeria monocytogenes* . *J. Exp. Med* 180,2209-2218.
- Izhar,M. 1990. Moderate immunodeficiency does not increase susceptibility to *Salmonella typhimurium aro A* live vaccines in mice. *Infect.Immun.* 58,2258-2261.
- Janoff, Edward. Smith P. Emerging concepts in gastrointestinal aspects of VIH-1 pathogenesis and management. *Gastroenterology* 2001;120:607-621.
- Kwak Y, Yoo S. Kim E. Cell surface display of human immunodeficiency virus type 1 gp120 on E. coli by using ice nucleation protein. *Clin and Diagnostic laboratory immunology*, July1999, 499-503.
- Kingsman AJ, Burns NR, Layton GT, Adams SE. Yeast retro-transposon particles as antigen delivery systems. *Ann NY Acad Sci* 1995; 754:202-213.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S. T-lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV. *Nature* .1984;312:767.
- Klein M R, Veenstra J, Holwerda AM. Gag-specific immune responses after immunization with p17/p24:Ty virus-like particles in HIV type 1-seropositive individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13:393-399.
- Klein M. Current progress in the development of human immunodeficiency virus vaccines: research and clinical trials.2001.*Vaccine* 19:2210-2215.
- Korber B, Kuiken C, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors J, and Sodroski J. *Human Retroviruses and AIDS* 1998. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, group T-10, Los Alamos National Laboratory , New Mexico, U.S.A.

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

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

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

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

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

- Strahan,K, 1992 Impaired resistance to infection does not increase the virulence of *Salmonella htr A* live vaccines for mice. *Microb. Pathog.* 12,311-317.
- Strauss,a and Gotz,F. In vivo immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*. *Mol. Microbiol.*1996;21:491-500.
- Suzuki,K. Gut cryptopatches:direct evidence for extrathymic anatomical sites for intestinal T Lymphopoiesis. *Immunity* 2000;13:691-702.
- Takeuchi,A. 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection . I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Pathol.* 50,109-136.
- The Jordan Report. 1998. Division of Microbiology and Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. pp 66-68.
- Tomoda,T. 1990. Immune response to *Bordetella pertusis* infection and vaccination. *J.Infect.Dis.* 163.559-563.
- Trauger R, Ferre F, Daigle AE. Effect of immunization with inactivated gp120-depleted human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) immunogen on HIV-1 immunity, viral DNA, and percentage of CD4 cells. *J Infect Dis* 1994;169 :1256-1264.
- Turner MS, Giffard PM. Expression of *Chlamydia psittaci*-and Human immunodeficiency Virus- Derived Antigens on the Cell Surface of *Lactobacillus fermentum* BR11 as Fusions to BspA. *Infect Immun* 1999 Oct;67(10):5486-5489.
- Understanding Vaccines. National Institutes of Health and National Institute of Allergy and Infectious Diseases. NIH Publication No. 98-4219 January 1998. pag. 3-6.
- Uribe, P, MD, Carlos Magis Rodríguez, MD Enrique Bravo García. AIDS in Mexico. November, 1998 *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care.*
- Van Ginkei,F,W. Partial IgA-deficiency with increased Th2-type cytokines in TGF- β 1 Knockout mice. *J. Immunol* 1999;163: 1951-1957.
- VanCott T, Kamiski R, Mascola J. HIV-1 neutralizing antibodies in the genital and respiratory tracts of mice intranasally immunized with oligomeric gp 120. 1998. *J of Immunology.* 2000-2012.
- Van de Wijgert J, Mason PR, Ray CS, Gwanzura L, Maphosfere C, Katzenstein D, Padian NS. Zimbabwe AIDS Prevention Project-University of Zimbabwe (ZAPP). Use of Intravaginal preparations, presence of *Lactobacillus* in the vagina, and risk for HIV in Zimbabwean women. *Int Conf AIDS.* 1996 jul7-12,11 (1):34.

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



DONATIVO

