

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INDUCCIÓN DE INMUNIDAD EN MUCOSAS CONTRA EL VIH MEDIANTE LA
SECRECIÓN DEL ASA V3 FUSIONADA A LA SUBUNIDAD A₂B DE LA TOXINA
DEL CÓLERA EN *Lactococcus lactis*.

Por

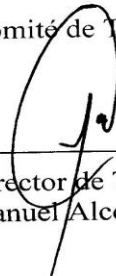
M.C. ITZA ELOISA LUNA CRUZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Marzo, 2011

INDUCCIÓN DE INMUNIDAD EN MUCOSAS CONTRA EL VIH MEDIANTE LA
SECRECIÓN DEL ASA V3 FUSIONADA A LA SUBUNIDAD A₂B DE LA TOXINA
DEL CÓLERA EN *Lactococcus lactis*.

Comité de Tesis



Director de Tesis

Dr. Juan Manuel Alcocer González



Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla



Vocal

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales



Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides



Vocal

Dr. Ricardo Gómez Flores

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Reyes Tamez Guerra** y la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**.

Agradezco por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, en el Laboratorio de Inmunología y Virología. Por confiar en mi y por el gran apoyo y asesoría brindada a lo largo de este tiempo.

Al **Dr. Juan Manuel Alcocer**.

Gracias por su valioso apoyo, asesoría y tiempo dedicado a este trabajo. Por ser mi maestro y formarme en esta disciplina.

A la **Dra. Lydia Gpe Rivera Morales**, al **M.C Juan Manuel Adame Rodríguez**, al **Dr. Pablo Zapata Benavidez**, y al **Dr. Ricardo Gómez Flores**. Agradezco enormemente la amistad, tiempo dedicado a este trabajo y el apoyo incondicional brindado.

Agradezco igualmente a mis amigos y compañeros de Laboratorio, por su apoyo y amistad brindada durante la realización de este trabajo: **Martha, Lucy, Teodora, Laura, Linda, Irma, Manuelito, Beto, Chago, Claudio, Diana** y todos los que colaboran en el Laboratorio de Inmunología y Virología.

A mis grandes amigas **Elva Arechiga** y **Verónica Ortega** por su incondicional apoyo.

Agradezco profundamente a **Angel Ruvalcaba**, por creer en mi, por enseñarme a ver la vida de otra manera, y por su cariño y pequeños detalles que continuamente me brindó durante este tiempo, superando lo amargo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico para la realización de mis estudios. No. de registro 144541

DEDICATORIA

A TI SEÑOR

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

A MIS PADRES

Sr. Pedro Luna Cabriales
Sra. Fausta Cruz de Luna

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

A MIS HERMANOS:

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

Los quiero mucho.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
1.INTRODUCCIÓN	1
2.HIPÓTESIS	3
3.OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivos específicos	4
4.ANTECEDENTES	5
4.1 Generalidades del VIH	5
4.2 Estructura del VIH	7
4.3 Ciclo de replicación del VIH	10
4.4 Epidemiología del VIH	12
4.4.1 Situación epidemiológica del SIDA en México	13
4.5 Mecanismos de transmisión del VIH	14
4.6 El papel de la mucosa gastrointestinal en la transmisión de VIH	14
4.7 Mecanismos de eliminación de células infectadas por el VIH	16
4.8 Papel de la proteína de la envoltura en la patogénesis del VIH	18
4.8.1 Importancia del asa V3 de la gp120 en la patología del VIH	20
4.9 La respuesta inmunológica contra el VIH	22
4.9.1 Respuesta inmune humoral contra el VIH	24
4.9.1.1 Anticuerpos monoclonales contra la región V3	24
4.9.2 Respuesta inmune celular contra el VIH	27

4.10 Vacunas contra el VIH	28
4.10.1 Proteínas y subunidades peptídicas	29
4.10.2 Virus vivos atenuados	29
4.10.3 Partículas o vacunas completas inactivadas	29
4.10.4 Vectores vivos recombinantes	30
4.10.5 Vacunas de ADN	31
4.11 Adyuvantes utilizados en formulación de vacunas contra el VIH	31
4.12 La toxina del cólera y su aplicación como adyuvante de mucosas	35
4.13 Inmunidad en las mucosas	37
4.13.1 La inmunidad humoral en las mucosas	38
4.13.2 La inmunidad celular en las mucosas	39
4.14 La microbiota en el tracto gastrointestinal	41
4.15 Uso de bacterias como vehículos para vacunas contra el VIH	43
4.15.1. Bacterias atenuadas como vehículos para vacunas contra el VIH	45
4.15.2 Bacterias comensales como vehículos para vacunas contra el VIH	48
4.16 Expresión de proteínas heterólogas en bacterias lácticas	50
4.16.1 <i>Lactococcus</i> en el desarrollo de vacunas	51
4.17 Regulación por nisina de la expresión de proteínas heterólogas en bacterias lácticas	54
 5. METODOS	 57
5.1 Construcción de los plásmidos recombinantes	57
5.1.1 Diseño de oligonucleótidos	57
5.1.2 Amplificación de los genes por PCR	57
5.1.3 Clonación de los genes en el vector pGEM-t easy	58
5.1.4 Subclonación de los genes V3, A ₂ B y su fusión en el vector pSEC:NUC	59
5.2 Transformación de <i>Lactococcus lactis</i> con los plásmidos recombinantes	60
5.2.1 Preparación de las células electrocompetentes de <i>L. lactis</i>	60
5.2.2 Transformación de <i>Lactococcus lactis</i> por electroporación	60
5.3 Detección de la expresión de las proteínas recombinantes en <i>L. Lactis</i> por Western Blot	61
5.4 Grupos experimentales	62
5.5 Obtención de muestras	63
5.5.1 Suero	63
5.5.2 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica	63
 5.5.3 Lavados de mucosa intestinal	 63

5.5.4 Tejido intestinal	64
5.5.5 Células de Bazo	64
5.6 Inducción de inmunidad humoral y celular en mucosas contra VIH mediante la administración oral o genital de <i>L. Lactis</i> recombinante	64
5.6.1 Medición de anticuerpos específicos anti-V3 IgG e IgA en suero y lavados intestinales por ELISA	64
5.6.2 Inducción específica y cuantificación de IL-2 e INF- γ en linfocitos de bazo y PBMC	65
5.7 Determinación de la expresión de citocinas Th1/Th2 en mucosa intestinal y genital de ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> recombinantes	66
5.7.1 Obtención de ARN y cADN de la mucosa intestinal y genital	66
5.7.2 Determinación de la expresión de citocinas Th1/Th2 en mucosas por PCR multiplex	66
6.RESULTADOS	67
6.1 Construcción de los plásmidos recombinantes	68
6.1.1 Amplificación del asa V3 de la proteína gp 120 del VIH y de la subunidad A ₂ B de la toxina del cólera	68
6.1.2 Clonación de los genes del asa V3 y de la subunidad A ₂ B en el vector pGEM-T	70
6.2 Subclonación del gen del asa V3 del VIH y de la subunidad A ₂ B de la toxina del cólera en el vector de expresión de <i>L. lactis</i>	73
6.3 Detección de la expresión de las proteínas recombinantes en <i>L. lactis</i> por Western Blot	77
6.4 Inducción de inmunidad humoral y celular en mucosas contra VIH mediante la administración de <i>L. lactis</i> recombinante	81
6.4.1 Medición de anticuerpos IgG e IgA anti-V3, en suero y lavados intestinales por ELISA	81
6.4.1.1 Anticuerpos en suero	81
6.4.1.2 Anticuerpos en lavado intestinal	83
6.4.2 Evaluación de la respuesta inmune celular	85
6.4.2.1 Medición de IL-2 en células PBMC y linfocitos de bazo	85
6.4.2.2 Medición de INF- γ en células PBMC y linfocitos de bazo	86
6.4.3 Determinación de la expresión de citocinas Th1/Th2 en mucosas de ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> recombinantes	91
7. DISCUSIÓN	93

8. CONCLUSIÓN	99
LITERATURA CITADA	100
RESUMEN BIOGRÁFICO	132

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Anticuerpos monoclonales anti-V3, aislados de pacientes infectados	26
2. Proteínas heterólogas expresadas en <i>Lactococcus lactis</i>	53
3. Reacción de amplificación de los genes V3 y A ₂ B por PCR	58
4. Condiciones para la amplificación de los genes V3 y A ₂ B por PCR	58
5. Condiciones de la reacción de MPCR	66

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura general del Virus de Inmunodeficiencia Humana	6
2. Estructura proteica del Virus de inmunodeficiencia Humana	9
3. Ciclo de Replicación del Virus de la Inmunodeficiencia humana en la célula	11
4. Estructura de la proteína gp120 del VIH	19
5. Esquematización de la fusión de las proteínas de envoltura del VIH con la membrana celular	20
6. Representación gráfica del asa V3 del VIH	21
7. Estructura de la toxina del cólera	33
8. Representación esquemática de la mucosa y las células inmunológicas presentes en el MALT	40
9. Representación esquemática de la Nisina	54
10. Sistema de expresión de genes controlados por Nisina	56
11. Estrategias de expresión de las proteínas recombinantes	67
12. Gradiente de temperaturas para la amplificación por PCR del asa V3 de la proteína gp 120	68
13. Gradiente de temperaturas para la amplificación por PCR de la subunidad A ₂ B de la toxina del cólera	69
14. Mini prep rápido de las colonias obtenidas en la ligación del vector pGEM-T	

con los genes clonados del asa V3 o de la subunidad A ₂	70
15. Purificación del plásmido pGEM-T V3	71
16. Purificación del plásmido pGEM-T A ₂ B	71
17. Caracterización enzimática del plásmido pGEM-T V3	72
18. Caracterización enzimática del plásmido pGEM-T A ₂ B	72
19. Purificación de los plásmidos pSEC:V3 y pSEC:A ₂ B	73
20. Caracterización enzimática del plásmido pSEC:V3	74
21. Caracterización enzimática del plásmido pSEC:A ₂ B	74
22. Caracterización enzimática de los plásmidos pSEC:V3, pSEC:A ₂ B, y pSEC: V3A ₂ B	76
23. Caracterización por PCR de las fusiones V3A ₂ B y V3V3A ₂ B	76
24. Detección de la expresión del asa V3 de la gp120 del VIH en <i>Lactococcus lactis</i> por Western Blot	78
25. Detección de la expresión de la subunidad A ₂ B de la toxina del cólera en <i>Lactococcus lactis</i> por Western Blot	79
26. Detección de la expresión de una o dos asas V3 fusionadas a la subunidad A ₂ B de la toxina del cólera en <i>Lactococcus lactis</i> por Western Blot	80
27. Títulos de anticuerpos IgG e IgA anti-V3 en suero de ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> recombinantes vía oral o genital mediante ELISA	82
28. Títulos de anticuerpos IgG e IgA anti-V3 en lavados intestinales de ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> recombinantes vía oral o genital mediante ELISA	84

29. Medición de la inducción de IL-2 en PBMC de ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> recombinantes	87
30. Medición de la inducción de IL-2 en linfocitos de bazo de ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> recombinantes	88
31. Medición de la inducción de INF- γ en PBMC de ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> recombinantes	89
32. Medición de la inducción de INF- γ en linfocitos de bazo de ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> recombinantes	90
33. Expresión de interleucinas Th1/Th2 en la mucosa por PCR multiplex	92

NOMENCLATURA

ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADE	Anticuerpos Dependientes de Anticuerpos
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CCR	Receptor de Quimiocinas
Co A	Concanavalin A
CTL	Linfocito T citotóxico
DAP	Diaminopimelico
ECM	Proteínas Extracelulares de Matriz
ELISA	Análisis de Enzima Ligada Inmuno Absorbente
EPEC	<i>E.coli</i> Enteropatógena
FHA	Filamentos de Adhesión
GALT	Tejido Linfoide Asociado a Intestino
IEL	Linfocitos Intraepiteliales
IL	Interleucina
INF- γ	Interferón gamma
kDa	Kilodaltons
LP	Lámina Propia

MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
mL	Mililitros
μL	Microlitros
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PP	Placas de Peyer
RRE	Elemento de Respuesta a rev
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
SIgA	Inmunoglobulina A Secretoria
TAR	Elemento de Respuesta a Transcripción
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante beta
TLPs	Receptores Parecidos a Toll
TR	Transcriptasa Reversa
VLP	Partículas Pseudovirales
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VIS	Virus de la Inmunodeficiencia del Simio

RESUMEN

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) continúa siendo una importante prioridad sanitaria en el mundo. Aunque existe un avance importante en la prevención de nuevas infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y en la reducción del número anual de defunciones relacionadas con el SIDA, el número de personas que viven con el VIH sigue en aumento. Si partimos de que el principal mecanismo de infección viral es a través del contacto sexual, el cual involucra a la mucosa genital, el propósito de esta investigación es el desarrollar una estrategia de inmunización basada en bacterias lácticas, mediante el uso ingeniería molecular para modificar genéticamente a la bacteria para que exprese antígenos virales en el sitio de entrada del patógeno y genere inmunidad humoral y celular específica contra el VIH. Para esta estrategia utilizamos *Lactococcus lactis* como vector bacteriano de expresión del antígeno V3 del VIH, así como la fusión de éste a la subunidad A₂B de la toxina del cólera como un segmento con actividad adyuvante, para la generación de inmunidad contra el virus infectante. Después de la construcción de las bacterias recombinantes, inmunizamos ratones de 6 semanas por vía oral o genital, para demostrar la generación de inmunidad humoral mediante anticuerpos específicos IgG e IgA anti-V3, así como inmunidad celular mediante la inducción de la interleucina-2 (IL-2) e interferón-gamma (INF- γ) en linfocitos de bazo y de sangre periférica. Ambos tipos de inmunidad específica contra el VIH se generaron a nivel sistémico en suero y a nivel local en mucosas. Este vector bacteriano recombinante seguro para consumo humano representa una nueva estrategia para el envío dirigido a las mucosas de antígenos del VIH asociado o fusionado a un segmento proteico que aumenta la inmunogenicidad a la región V3 del virus. Esta estrategia de inmunización puede ser optimizada y evaluada como una nueva alternativa de vacuna segura y efectiva que genere inmunidad neutralizante a nivel de las mucosas del VIH.

ABSTRACT

AIDS remains a major health priority in the world. Although there has been significant progress in preventing new HIV infections and reducing the annual number of AIDS-related deaths, the number of people living with HIV continues to rise. Given that the main mechanism of viral infection is through sexual contact involving the genital mucosa. The aim of the present research is to develop an immunization strategy based on lactic acid bacteria using molecular engineering to genetically modify the bacterium to express viral antigens in the pathogen entry site and generate specific humoral and cellular immunity against HIV. For this, we used *Lactococcus lactis* as a vector to express loop V3 antigen of HIV and their fusion to A₂B subunit of cholera toxin as an adjuvant activity segment for the generation of immunity to the infecting virus. After the construction of recombinant bacteria, 6 week old mice were immunized by oral or genital via, demonstrating the generation of humoral immunity by specific IgG and IgA V3 antibodies, as well as cellular immunity by inducing interleukin IL-2 and INF- γ in spleen lymphocytes and peripheral blood cells. Both types of HIV-specific immunity are generated at a systemic level in serum and locally in mucosa. The recombinant bacterial vector, which is safe for human consumption represents a new strategy aimed at sending mucosal HIV antigens associated or fused to a protein segment that increases the immunogenicity of the V3 region of the virus. This immunization strategy can be optimized and evaluated as a new safe and effective alternative vaccine to generate neutralizing immunity at the mucosal HIV.

1. INTRODUCCIÓN

A más de 20 años de su aparición, el SIDA continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial. ONUSIDA en el 2009 estimó que el número de casos de personas que viven con SIDA en el mundo es de 33.3 millones (31.4–35.3 millones). En México, hasta el 30 de Noviembre del 2010 el número de casos de personas que viven con VIH es de casi 225 mil personas (CENSIDA, 2010), donde Nuevo León ocupa el décimo lugar en el número de casos por entidad federativa. La mayoría de los casos se encuentran en un grupo de 20 a 44 años de edad, y la principal vía de transmisión es la sexual. El incremento constante en la población de personas que vive con el VIH refleja los efectos combinados de las tasas persistentemente altas de nuevas infecciones por el VIH y la influencia benéfica del tratamiento antirretroviral. Aunque no es una enfermedad nueva, su constante incremento proyecta un severo problema a nivel económico. En el año 2007 la medición del gasto en salud (MEGAS) estimado para VIH/SIDA en México fue de \$3,913.4 millones de pesos (CENSIDA. MEGAS 2008). Otro punto de interés es que aún no se cuenta con una vacuna comercial, a pesar de los enormes esfuerzos que se suscitan para el desarrollo de ésta, ya que ninguna de ellas ha logrado hasta el momento ser lo suficientemente efectiva para inducir inmunidad capaz de eliminar el virus. Por otra parte el uso del tratamiento farmacológico, representa un riesgo a largo plazo, así como la generación de resistencia al fármaco por parte del paciente. Por los motivos anteriormente mencionados es urgente el desarrollo y aplicación de una vacuna que disminuya las tasas de morbilidad y mortalidad de esta infección.

Debido a que el principal mecanismo de infección viral es a través del contacto sexual, el cual involucra a la mucosa genital, el propósito de ésta investigación es el desarrollar una vacuna basada en bacterias lácticas modificadas genéticamente, y aprovechar su característica natural de ser comensales, tener la capacidad de sobrevivir y colonizar las mucosas y ser ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, para que expresen antígenos virales en el sitio de entrada del patógeno y generar una respuesta inmune humoral y celular específica que pueda neutralizar y/o eliminar el virus infectante.

2. HIPÓTESIS

La modificación genética de *Lactococcus lactis* con un antígeno del VIH fusionado a un segmento con actividad adyuvante puede inducir una mayor inmunogenicidad cuando este vector bacteriano se administra en mucosas.

3. OBJETIVOS

3.2 Objetivo General

Inducción de una mayor inmunogenicidad en las mucosas contra antígenos del VIH mediante la administración oral de *Lactococcus lactis* recombinante como vector de expresión del antígeno V3 de la gp120, fusionado a la subunidad A₂B de la toxina del cólera como segmento adyuvante.

3.2 Objetivos Específicos

- 1.- Amplificar y clonar los segmentos génicos del asa V3 de la gp120 del VIH y el segmento de la subunidad A₂B de la toxina del cólera.
- 2.- Construir y clonar las fusiones genéticas formadas por el segmento del asa V3 de la gp120 del VIH y el segmento de la subunidad A₂B de la toxina del cólera (V3A₂B y V3V3A₂B).
- 3.- Obtener las clonas recombinantes de *Lactococcus lactis* para los genes V3, A₂B y las fusiones V3A₂B y V3V3A₂B.
- 4.- Demostrar la producción en *Lactococcus lactis* de las proteínas recombinantes V3, A₂B y las fusiones V3A₂B y V3V3A₂B.
- 5.- Determinar el nivel de inmunidad humoral y celular en las mucosas producido por la administración oral y genital de *Lactococcus lactis* que expresa las proteínas recombinantes V3, A₂B y las fusiones V3A₂B y V3V3A₂B.

4. ANTECEDENTES

4.1 Generalidades del VIH.

En el año 1981 apareció una nueva enfermedad, que afectaba a un tipo de población muy característica y considerada marginal desde un punto de vista social, se trataba de los heroinómanos y de los homosexuales. Todos ellos tenían en común la aparición de un cuadro clínico caracterizado por la presencia de una inmunosupresión de tipo celular, acompañada de infecciones oportunistas, como neumonía por *Pneumocystis carinii*, así como algunas neoplasias poco frecuentes, como el sarcoma de Kaposi. Esta patología, con criterio de pandemia, es una de las mayores del siglo XXI.

En 1983 se identificó al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA). El VIH, es un retrovirus humano perteneciente a la familia de los Lentivirus, dentro de esta familia se encuentra también, el virus de la inmunodeficiencia felina, el virus de la inmunodeficiencia de los simios, el virus visna de ovejas, el virus de la inmunodeficiencia bovina y el virus de la anemia infecciosa equina. El VIH es un virus que posee envoltura y presenta ARN, su nombre se debe al hecho de que el proceso de transcripción se realiza en relación inversa de ARN a ADN por medio de una enzima viral llamada transcriptasa reversa antes de que el genoma viral pueda incorporarse al genoma de la célula huésped y se inicie la replicación viral.

En base a sus características genéticas y antigénicas se pueden distinguir dos tipos de Virus de Inmunodeficiencia Humana: el VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el tipo más frecuente en Estados Unidos, Europa y África Central, mientras que el VIH-2 que produce una enfermedad similar, es frecuente en África Occidental e India.

El VIH es un virus esférico que mide aproximadamente 80-100 nm, se caracteriza por estar formado por un genoma de ARN de cadena única constituido por dos hebras idénticas de polaridad positiva que contiene genes encargados de codificar los componentes de la partícula vírica (genes estructurales) y de regular la expresión de los mismos (genes reguladores). Los genes estructurales codifican las proteínas de la cápside, en cuyo interior se encuentra el material genético y las enzimas necesarias para la replicación viral y las proteínas de la envoltura vírica, que es una bicapa lipídica derivada de la célula huésped donde se insertan las glicoproteínas virales (Fig. 1).

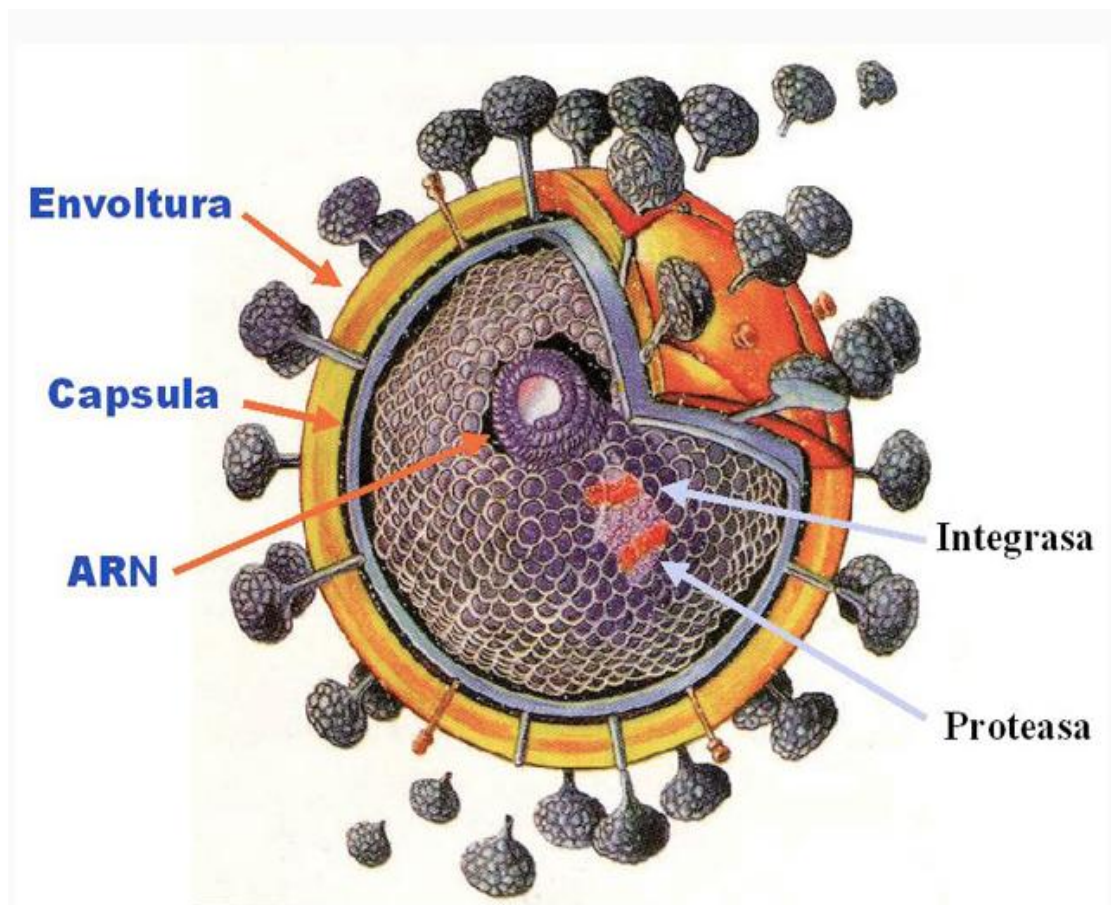


Fig. 1. Estructura general del Virus de Inmunodeficiencia Humana.

4.2 Estructura del VIH-1.

La estructura genómica del VIH es de 9.8 kilobases. Los genes del VIH codifican por lo menos nueve proteínas (Muesing *et al.*, 1985). Ambos extremos se flanquean por una secuencia repetida conocida como LTR. La estructura del virus se puede dividir en tres partes:

1.- Proteínas estructurales principales (Gag, Pol y Env). Las proteínas de la cápside se codifican en la región *gag*. El precursor es la proteína p55 de 55 kilodaltons (kDa), la cual se modifica durante el proceso de maduración viral en 4 proteínas designadas como MA (matriz, p 17), CA (cápside, p24), NC (nucleocápside p9, y p6).

La proteasa viral (Pro, p10), integrasa (In, p31), RNAsa H (p15) y el homodímero de la transcriptasa reversa (RT, p66-p51), son enzimas necesarias para la replicación viral y se expresan en el contexto de un precursor *gag-pol* y producidas como una poli proteína (p160), y se procesa mediante la proteasa viral.

La región genómica *env* codifica las proteínas de la envoltura del VIH-1 y media la entrada del virus por su unión al receptor específico celular en la célula blanco. El precursor de la envoltura gp160 (160 kDa) se escinde por una proteasa celular en dos subunidades: la transmembranal gp41 y la soluble gp120. Las subunidades gp41 y gp120 se unen no covalentemente y forman trímeros en la superficie de la partícula del VIH (Fig. 2).

2.- Proteínas regulatorias (Tat y Rev). Tat (Trans activador transcripcional) es un importante factor de la regulación viral para la expresión génica de VIH, se encuentra en el núcleo y el nucléolo, y se une a una porción del ARN conocida como TAR (elemento de respuesta a la transactivación) que se localiza en el extremo 5' terminal del ARN viral; la unión de tat a TAR activa la transcripción del VIH al menos 100 veces.

Otro factor de la regulación es Rev, presente en el núcleo y el nucléolo, e induce la transición de la expresión de proteínas tempranas a tardías, y también actúa como puente entre el núcleo y el citoplasma mediante la unión a RRE (elemento de respuesta a Rev), lo que promueve el transporte de ARN del núcleo al citoplasma.

3.- Proteínas accesorias (Vpu, Vpr, Vif y Nef)

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

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

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

Nef es una proteína multifuncional de la membrana plasmática y del citoplasma, de 27 kDa que actúa en la regulación de los linfocitos CD4, incrementa la infectividad viral y es necesaria para el mantenimiento de la producción de virus.

En cuanto a los genes accesorios, las regiones largas terminales repetidas (LTR) son importantes regiones regulatorias para la transcripción inicial y la poliadenilación (Korber *et al.*, 1998).

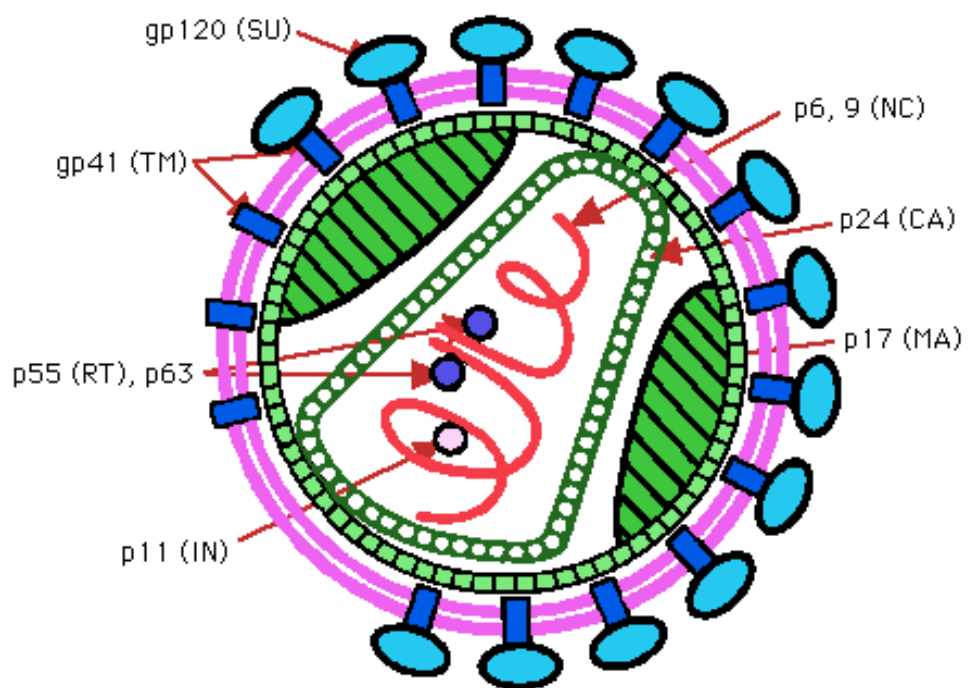


Fig. 2. Estructura proteica del Virus de Inmunodeficiencia Humana.

4.3 Ciclo de Replicación del VIH.

El ciclo de replicación del VIH-1 incluye las siguientes etapas, descritas posteriormente a detalle: 1.- entrada del virus, 2.- transcripción reversa, 3.- integración del ADN viral en el ADN genómico celular, 4.- transcripción, 5.- expresión de las proteínas virales, 6.- ensamblaje del virus, 7.- salida del virion y maduración de las proteínas de la envoltura viral (Fig. 3).

El VIH es un retrovirus que, gracias a la interacción de la glicoproteína gp 120 de su membrana con los receptores celulares como el CD4, y los dos más bien definidos correceptores celulares CXCR4 y CCR5, miembros de las subfamilias de receptores de quimiocinas CXC y CC respectivamente, son la clave para la entrada del virus a la célula. Otros miembros de familia de receptores de la quimiocina CC, como CCR2b y CCR3, también pueden funcionar como correceptores para la entrada del virus, aunque generalmente de una manera menos eficiente que el CCR5 (Doranz *et al.*, 1996; Bjorndal *et al.*, 1997). La resistencia casi total a la infección de individuos portadores de una delección de 32 pares de bases en los dos alelos del gen CCR5, confirma la importancia de ésta molécula en la transmisión del VIH-1 *in vivo* (Samson *et al.*, 1996). El uso del correceptor también se correlaciona altamente con la capacidad de inducir sincitios. La unión del dominio externo de la gp120 viral con el receptor CD4 celular, lleva a un cambio conformacional en la gp120 y así se expone el sitio de unión a un correceptor de quimiocina. Esta unión provoca otro cambio conformacional de modo que las regiones de la proteína gp41 del VIH interactúan para formar un dominio de fusión, lo que permite que las membranas viral y celular se unan.

El material genético contenido en un núcleo proteico se libera dentro de la célula huésped (Kowalski *et al.*, 1987), a través de una desnudez parcial del núcleo viral para exponer el ARN viral. Como resultado el núcleo viral entra al citoplasma, una vez en el citoplasma, comienza la actividad de la transcriptasa reversa y la conversión del ARN viral a ADN. La transcriptasa reversa sintetiza una doble cadena de ADN copia de una cadena sencilla de ARN viral para la generación del provirus.

El ADN viral migra y entra al núcleo de la célula huésped (proceso facilitado por la proteína vpr) y se integra al genoma celular con la ayuda de la integrasa. El provirus permanece latente o inactivo, posteriormente se sintetizan los productos para las nuevas generaciones de viriones. Dentro del núcleo, la ARN polimerasa II transcribe el ADN viral a ARNm.

La transcripción del ARNm resulta en la síntesis de polipéptidos: env y gag. Las proteínas de la envoltura (gp160) pasan a través del retículo endoplásmico y aparato de Golgi para procesar la gp120 y gp41. Durante el movimiento a través del aparato de Golgi, ocurre la glicosilación de la gp120. El virus sale de la célula, por gemación donde adquiere una capa lipídica celular, que lleva la gp120 y gp41. Finalmente las células infectadas se destruyen como consecuencia a la acción patógena del VIH (Vincent *et al.*, 1997).

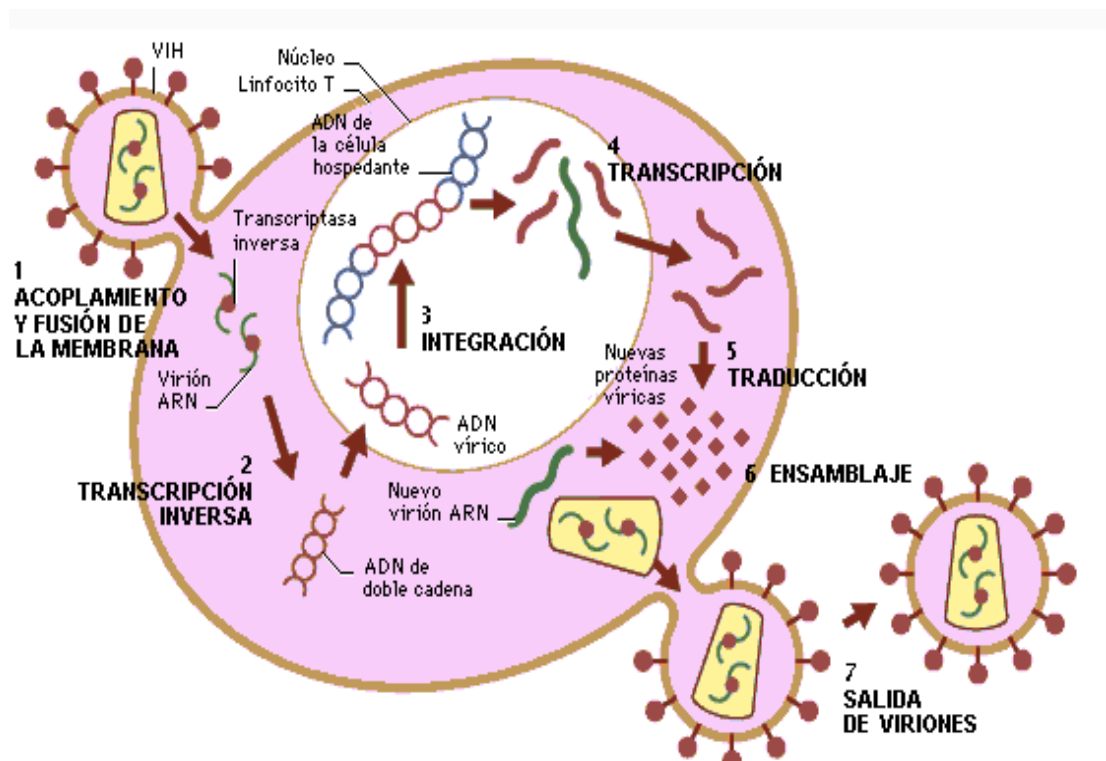


Fig. 3. Ciclo de replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en la célula.

4.4 Epidemiología del VIH.

Debido a las importantes diferencias moleculares que se generan en las propiedades biológicas del VIH, los epidemiólogos designaron subtipos y subclases del virus y los respectivos CRF (Formas Recombinantes Circulantes), como una herramienta poderosa para rastrear el curso de la pandemia del VIH (Peeters *et al.*, 2000). De manera que el VIH-1 se divide en tres grupos, el M, O y N. Recientemente se detectó un nuevo subtipo, el cual aún está en controversia y fue denominado grupo P, éste virus se aisló en una mujer de Camerún, y se relaciona con una variedad de inmunodeficiencia en gorila (Gürtler *et al.*, 1994). A su vez el grupo M se divide en varios subtipos que van de la A a la J, originalmente definidos en base a las secuencias de los genes *gag* y *env*. Las formas virales predominantes en la epidemia mundial son los subtipos A y C, seguido por el subtipo B y las recombinantes CRF01-AE y CRF02-AG (McCutchan, 2000).

La mayor diversidad genética del VIH-1 se encuentra en África, especialmente en África Central. En general los subtipos A, C y CRF02 son más comunes, pero todos los grupos y subtipos coexisten en este continente (Vidal *et al.*, 2000). En el sur y el este de África predomina el subtipo C (Heyndrickx *et al.*, 2000). En el este y oeste de África Central, la mayoría de los virus son CRF02-AG (Montavon *et al.*, 2000). Diferentes subtipos circulan en Asia, pero el subtipo que predomina es el C en la India y CRF01-AE en el sureste de Asia. En América del Norte, México, Europa y Australia, el subtipo B es por mucho el más común. Sin embargo, otro grupo de subtipos de virus del grupo M u O, incluso, se reportó en los EE.UU. (Brodine *et al.*, 1995; Womack *et al.*, 2001) y varios países europeos (Alaeus *et al.*, 1997; Heyndrickx *et al.*, 1998) y allí los subtipos inusuales parecen ir en aumento (Dietrich *et al.*, 1997).

La prevalencia exacta de las cepas recombinantes no se conoce muy bien, ya que pocos estudios sistemáticos se realizaron para hacer frente a este problema, aunado a que la distribución mundial de las distintas formas de VIH-1 es un proceso dinámico. A medida que más variantes del VIH-1, inevitablemente, se entremezclan en diferentes partes del mundo, la probabilidad de generar nuevos virus recombinantes se incrementará y el patrón de mosaicismo se volverá aún más complejo, ya que la participación de virus recombinantes, va a producir más recombinación. Se necesita de un continuo monitoreo para determinar el futuro papel de los virus subtipo no B en América del Norte y Europa, y para trazar el surgimiento de nuevos subtipos y CRF predominantes en todo el mundo.

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

4.4.1 Situación Epidemiológica del SIDA en México.

México se clasifica como un país con una epidemia de SIDA concentrada en los grupos que mantienen prácticas de riesgo: 12,6% de prevalencia de VIH en hombres que tienen sexo con hombres (HSH), 6.1% en trabajadores del sexo comercial y 1.2% en usuarios de drogas intravenosas. De acuerdo a las estimaciones más recientes del Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CENSIDA, 2010), en México hasta el 30 de Noviembre del 2010 existen cerca de 225,000 casos de personas que viven con VIH. Las personas de 15 a 44 años de edad constituyen el grupo más afectado con 78.6% de los casos registrados. La transmisión sexual es la causante del 95% de los casos acumulados de SIDA en México, de los cuales 51.8% corresponden a hombres que tienen sexo con hombres y el 48.2% a heterosexuales. El 4.7% se originaron por vía sanguínea, de los cuales 2.8% corresponden a transfusión sanguínea y el 1.2% se asocia al consumo de drogas inyectables, 0.5% a donadores y 0.2% a hemofílicos.

4.5 Mecanismos de Transmisión del VIH.

El VIH se encuentra en sangre, semen, saliva, lágrimas, tejido del sistema nervioso, leche materna y secreciones del tracto genital femenino; sin embargo sólo la sangre, semen, secreciones del tracto genital femenino, y leche materna transmiten la infección.

El patrón global de transmisión de VIH varía por región y país, y es influenciado por cultura, valores, condiciones sociales, dinámica sexual, y situación socioeconómica. En la mayoría de los países desarrollados la principal vía de transmisión del VIH, es la sexual y sólo secundariamente a través de transfusiones.

Otras formas de contagio son la inoculación accidental, la transfusión de sangre, agujas contaminadas o hemoderivados, el transplante de órganos infectados, el parto y la lactancia. En los casos pediátricos iniciales (menores de 15 años), la transmisión era por vía sanguínea, sin embargo actualmente se cambió a una transmisión perinatal con pocas incidencias de transmisión sexual (CENSIDA, 2010).

4.6 El Papel de la Mucosa Gastrointestinal en la Transmisión de VIH.

Excluyendo las infecciones adquiridas parenteralmente, virtualmente las infecciones de VIH se adquieren vía mucosa gastrointestinal y genital, sitios comunes de entrada del virus (Smith and Wahl, 1999). Para la vía de transmisión sexual, la mucosa del tracto genital es el sitio de entrada del virus, en la transmisión vertical, la mucosa del tracto gastrointestinal es el portal de entrada del VIH, como consecuencia del paso de fluido amniótico en útero, sangre infectada, secreciones cervicales intrapartum y leche materna infectada postpartum (Newell, 1998). 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 lámina propia, rica en células mononucleares, son por medio de las células especializadas M del epitelio, las células dendríticas y las células epiteliales.

En estudios recientes se demostró que las células M de ratón en un sistema *ex-vivo* son capaces de transportar el VIH a las células mononucleares (Amerongen *et al.*, 1991). Por otro lado las células dendríticas son altamente eficientes presentadoras de antígeno que expresan CD4 y recientes estudios indican que las células dendríticas se unen a la glicoproteína gp 120 del VIH a través de una lecitina tipo C, lo que permite la captura del VIH para su subsiguiente presentación a las células T y diseminación a órganos linfoides secundarios (Geijtenbeek *et al.*, 2000). Las células epiteliales son el linaje celular más abundante de la mucosa intestinal del colon y son un conducto potencialmente importante para la entrada del VIH. Un reciente estudio de la translocación en mucosa del VIH, donde utilizaron células epiteliales demostró que el VIH puede ser translocado a través de una delgada capa de células epiteliales por una vía transitótica, a través del principal receptor expresado en estas células, el galactosil ceramida (Gal-Cer), en adición estas células también expresan el correceptor para macrófagos CCR5, utilizado por el VIH (Bomsel, 1997).

Veazey *et al.*, 1998 demostró que durante los primeros días de la infección del Virus de la Inmunodeficiencia en Simios (VIS) en macacos, los macrófagos infectados eran raros, y que las células T infectadas eran más las presentes en la mucosa intestinal que en la sangre, dado a que el virus se replica más eficientemente en células T activadas y a la gran abundancia de células T CD4 activadas en la lámina propia que en la sangre. Después de 7-14 días de infección, las células T CD4 de la mucosa colónica e intestinal se depletan rápidamente, probablemente a consecuencia de lisis celular y apoptosis, este proceso ocurre principalmente en lámina propia. Es de interés notar que, la alta carga viral en la mucosa intestinal se asocia con la atrofia de las vellosidades y mala absorción, consistente con la enteropatía inducida por el VIS. La lámina 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, lo que lleva a la inflamación de la mucosa y a la liberación de péptidos quimioattractantes que reclutan monocitos y linfocitos, los cuales sirven como un nuevo blanco para la perpetuación de la replicación local del virus (Janoff *et al.*, 2001).

4.7 Mecanismos de Eliminación de Células Infectadas por el VIH.

A la enfermedad causada por el VIH, se le denominó síndrome de inmunodeficiencia adquirida, debido a la particularidad de eliminación progresiva del subgrupo CD4, de los linfocitos T, por lo tanto revierte la proporción normal CD4: CD8 y agrava la inmunodeficiencia. Esto es debido al tropismo del VIH por éstas y otras células que poseen el receptor CD4, ya que la superficie de ésta molécula funciona como entrada para el virus. Las células T CD4, y esto no es de sorprender, es el tipo celular más infectado por el virus. El VIH conlleva a la enfermedad como resultado de una depleción de las células cooperadoras CD4+ lo que causa una profunda inmunosupresión y la consiguiente inhabilidad para combatir infecciones oportunistas, por lo que el recuento de linfocitos T CD4 en la sangre guarda correlación con el grado de deterioro inmunológico. El paciente infectado por el VIH tiene una tasa mayor de lo normal de proliferación de células T CD4 como resultado de la estimulación inmunológica general y estas células son las dianas del VIH (que sólo infecta células T CD4+ activadas). Por tanto, el VIH induce una oferta constante de sus células diana, lo que produce mayores rondas de replicación y de destrucción inmunológica, lo que conlleva a la depleción de la parte del sistema inmune que pudiera controlar la replicación viral.

Luego de la activación por un antígeno específico, las células T CD4 o se mueren o se convierten en células de memoria no proliferativas que se movilizan rápidamente si hay una re-exposición al antígeno. Este reservorio latente de células T CD4 infectadas puede permanecer muchos años, aún en la presencia de los fármacos anti-VIH actuales, como HAART (terapia anti-retroviral altamente activa) que parece suprimir completamente la replicación del VIH. Esto sucede porque cuando una célula T CD4 infectada se vierte a un estado de memoria, ya no replica el virus (o sea que ya no sintetiza proteínas virales ni ARN genómico) pero la célula aún alberga una copia de ADN del VIH (el pro virus) integrada en sus cromosomas. Así que cuando las células se reactivan mediante el antígeno, la replicación viral se reanuda.

La proteína gp120 del VIH, se une al CD4 expresado en linfocitos T, donde se replica con una cinética muy agresiva. Las células cooperadoras T CD4+, infectadas se vuelven diana de las células asesinas CD8+ VIH-específicas pero también se eliminan por otras causas.

A continuación se presentan los posibles mecanismos de inmunosupresión celular por el VIH:

Dstrucción de CD4 por efecto citopático. Se considera que la destrucción de los linfocitos CD4 por efecto citopático directo representa la causa más importante de destrucción. Los estudios de progresión matemática estiman que alrededor de 108 linfocitos CD4 se destruyen diariamente por el VIH por este mecanismo. Este modelo es cuestionable, ya que presupone una distribución y tráfico homogéneo de los linfocitos entre la sangre periférica (que contiene el 1% de los linfocitos totales) y los órganos linfoides. Sin embargo, algunos autores demostraron que la acumulación de virus en los ganglios origina un fenómeno de atrapamiento de linfocitos en los órganos linfoides en torno a las células dendríticas recubiertas de viriones, por lo que el número de linfocitos destruidos por efecto citopático tal vez sea menor. La existencia de este secuestro en ganglios linfáticos se confirma por la observación de que el aumento de CD4 que se produce en las primeras semanas tras el tratamiento antirretroviral representa, de hecho, una redistribución de linfocitos y no un aumento neto de los mismos.

Dstrucción secundaria a la acción de proteínas tóxicas del virus. La apoptosis o muerte celular programada representa un mecanismo fisiológico de muerte celular controlada. Este mecanismo cumple un papel muy importante en todos los sistemas de desarrollo: embriogénesis, proliferación y diferenciación hematopoyética, control de la proliferación tumoral y regulación de la actividad autoinmune. En éste último sistema se demuestra que el bloqueo de la molécula CD4 mediante anticuerpos monoclonales previamente a la activación del receptor para el antígeno lleva a la apoptosis de la célula activada. Por tanto, una activación asincrónica o incompleta de los linfocitos CD4 origina una activación anormal de la célula que la lleva a un programa de muerte por apoptosis en vez de inducir una respuesta inmune adecuada.

La apoptosis podría representar un mecanismo de destrucción de linfocitos CD4 en la infección por el VIH que afectaría no sólo a las células infectadas, sino que podría provocar la destrucción de linfocitos no infectados preactivados anormalmente por gp120 unida a sus receptores.

Bloqueo de la activación y proliferación de CD4 mediante anergia. La anergia se define como la falta de activación linfocitaria en respuesta a estímulos. Se describe que determinados componentes virales (sobre todo las proteínas gp120, Vpr y Tat) inducen anergia en distintos modelos *in vitro*. Este fenómeno se debe a un defecto en la transducción de señales en linfocitos T y se puede originar por distintos mecanismos: alteración en la síntesis de citocinas, interferencia con las proteínas de membrana implicadas en la activación celular T, interferencia con los mecanismos de presentación antigénica, defectos en la expresión de receptores para citocinas o síntesis de factores supresores.

Bloqueo en la regeneración linfocitaria. Para mantener el equilibrio, deben regenerarse tantas células linfocitarias como las que se destruyen. Parece ser que, en pacientes seropositivos, existe un bloqueo en la regeneración linfocitaria, que se pudiera deber tanto a un freno de producción a nivel central (timo y médula ósea) como periférico (ganglios linfáticos) (Salas, 2002).

4.8 Papel de la Proteína de la Envoltura en la Patogénesis del VIH.

La envoltura externa del virion maduro tiene 76 picos formados por dímeros o trímeros de complejos de gp 160. Las proteínas de la envoltura del VIH se codifican por el gene *env*, el cual contiene regiones conservadas, variables e hipervariables.

El gene *env* codifica un polipéptido de 188 kDa con un residuo de 21 cisteínas, la cual a través de enlaces disulfuro juega un papel esencial en la determinación de la conformación tridimensional de las proteínas de la envoltura externa. La división de ésta proteína en gp120 y gp41 se requiere para la infectividad del VIH.

La gp120 se compone de cinco regiones constantes (C1-C5) y cinco regiones variables (V1-V5), la estructura de la proteína se compone de tres dominios, un dominio interior (rojo) y otro exterior (amarillo), que se conectan por un tercer dominio, llamado puente de hoja (azul) (Fig. 4).

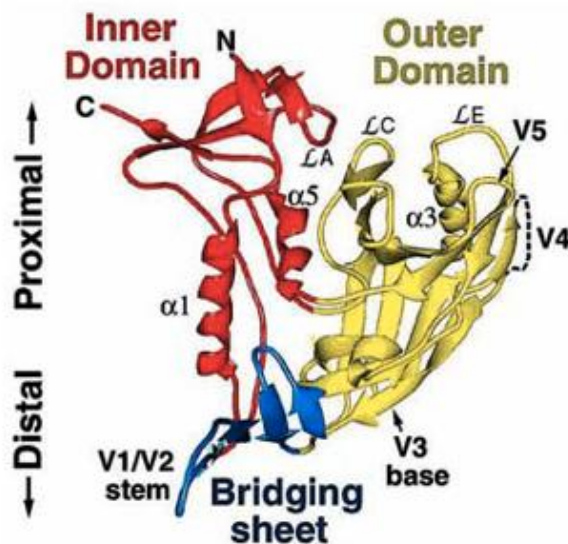


Fig. 4. Estructura de la proteína gp120 del VIH.

Sólo la mitad de la gp41 se encuentra expuesta en el ectodominio, separada por una región transmembranal, la parte intracelular de la gp41, se piensa que se ancla a la envoltura compleja de la matriz subyacente (Kwong *et al.*, 2000). El dominio interno de la gp120 contiene el conservado N y C-Terminal y se cree que interactúan con gp41 (Cao *et al.*, 1993). El dominio exterior es muy glicosilado y es relativamente variable. El puente de hoja consta de cuatro cadenas β anti-paralelas que se involucran en la unión de la gp120 al receptor de quimiocinas. El núcleo gp120 se compone de 25 cadenas β -plegadas, 5 α -hélices, y los segmentos de 10 asas, que se doblan en una estructura globular en forma de corazón (Kwong *et al.*, 1998).

La gp120 presenta un surco muy conservado asociado con el dominio del receptor CD4 parecido a la región amino terminal de las inmunoglobulinas, por lo tanto un cambio conformacional de la proteína resulta en la exposición de un sitio de unión al correceptor sobre la gp120.

Después de la interacción con el correceptor, más cambios conformacionales en el trímero gp41/gp120 activan la inserción del péptido de fusión gp41 en la membrana plasmática. Esto da lugar finalmente a la fusión de la membrana viral y celular y la inserción del núcleo viral en el plasma celular (Wyatt and Sodroski, 1998) (Fig. 5).

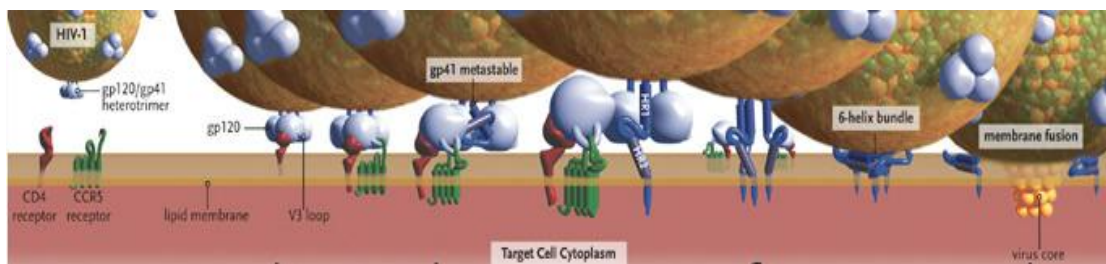


Fig. 5. Esquematización de la fusión de las proteínas de envoltura del VIH con la membrana celular.

4.8.1 Importancia del Asa V3 de la gp120 en la Patología del VIH

Una parte importante de la estructura de la gp120 es la localización de algunos epítodos conservados en la gp120, importantes para la generación de anticuerpos neutralizantes. CCR5 se utiliza como un correceptor por varios virus de inmunodeficiencia de primates, lo que sugiere que los residuos cerca de la hoja de puente, altamente conservados en la gp120, participan en la unión a CCR5 (Wang *et al.*, 1998,1999). Se cree que esta región sufre cambios conformacionales después de la unión a CD4, lo que resulta en una orientación hacia la célula diana, y facilita la unión al correceptor. Los anticuerpos neutralizantes VIH-1 que se dirigen a los epítodos gp120 que se exponen después de la unión a CD4, se llaman epítodos CD4 inductores (CD4i), y pueden bloquear la unión a CCR5 (Trkola *et al.*, 1996) (Fig. 6).

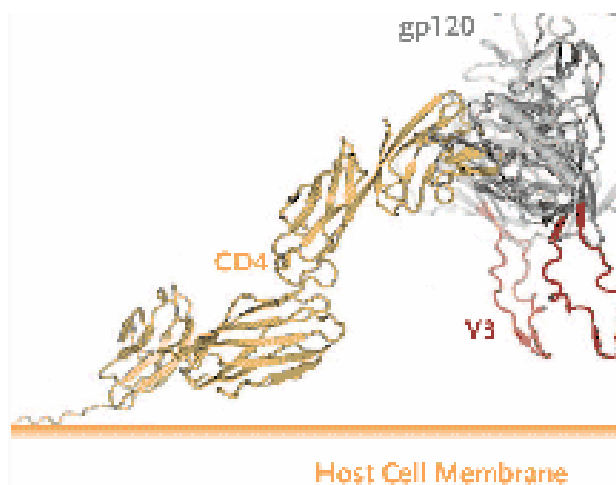


Fig. 6. Representación gráfica del asa V3 del VIH.

Específicamente el asa V3 es un determinante importante para el uso del correceptor del VIH-1. Incluso antes de que se reconociera el tropismo del VIH, el cual se explica en gran medida por la diferencia en el uso del correceptor, se constató que el asa V3 era un determinante importante para el fenotipo de virus formadores de sincitios (SI) (Trujillo *et al.*, 1996 Milich *et al.*, 1997; Briggs *et al.*, 2000). Más tarde se reconoció que incluso un cambio de un sólo aminoácido en V3 podrían cambiar el uso en el tipo de correceptor (Shimizu *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2000). Se descubrió que los residuos en las posiciones 306 y 322 en la región V3 específicamente son de gran importancia, por ser predictores de fenotipo, ya que uno o ambos de estos residuos de aminoácidos estaban cargados positivamente en el 98% de las variantes CXCR4 de VIH SI (Fouchier *et al.*, 1992). La participación de las mismas posiciones del dominio V3, relacionadas a el uso del correceptor se demostró para variantes del VIH-1 clado A y G (Tebit *et al.*, 2002), C (Zhang *et al.*, 2002) y E (Kato *et al.*, 1999).

Sin embargo, estudios recientes demuestran que el uso de CXCR4 no es un resultado directo de una alta carga positiva del asa V3 (Cormier and Dragic, 2002) sino que se asocia con la pérdida de un sitio de N-glicosilación que acompaña a una alta carga positiva de las secuencias V3 de aislados primarios (Pollakis *et al.*, 2001).

Actualmente se demostró que la pérdida de un sitio de N-glicosilación, N301, debido a la mutación del V3 mejora la infectividad de las variantes X4 y reduce la infectividad de variantes R5 (Polzer *et al.*, 2001), mientras que la misma mutación en las variantes X4R5 lleva a una imposibilidad de uso de CCR5 (Polzer *et al.*, 2002). A pesar de su aumentada asociación a CXCR4, este virus mutante X4R5 mostró una mayor sensibilidad a los anticuerpos neutralizantes y al ligando natural de CXCR4 (Schonning *et al.*, 1996 a, b).

Otro determinante importante es el residuo R 298 en la asa V3, el cual se conserva entre las variantes R5 y X4 del VIH, es importante para la unión al receptor CCR5 y CXCR4, pero no es específico de correceptor (Wang *et al.*, 2000). Actualmente se generaron cepas VIH-1 que pueden replicarse independiente de CD4 y se cree que en estos aislados virales, el sitio del correceptor vinculante ya se encuentra expuesto.

Todo esto presenta una importante relevancia en la generación de anticuerpos neutralizantes que sean dirigidos hacia las zonas conservadas o epítomos neutralizantes en las proteínas de la envoltura del VIH-1, incluyendo V1, V2, V3, CD4s, CD4i en gp120, y en la gp41 (Gorny *et al.*, 1989), ya que se encontraron anticuerpos contra el asa V3 de la gp120 y se postula que estos anticuerpos inhiben la infección del VIH (neutralizantes) mediante la prevención de la maduración de la gp120, lo que evita el cambio conformacional de la gp120 que se necesita para la entrada del virus a la célula hospedera o para su fusión a ella. Sin embargo en general, los niveles de anticuerpos de todas las proteínas disminuyen a medida que la infección VIH progresa a SIDA (Vincent *et al.*, 1997).

4.9 La Respuesta Inmunológica contra el VIH.

En el paciente infectado por el VIH se describe una respuesta inmune intensa que abarca prácticamente todos los mecanismos efectores del sistema inmunitario. Esta respuesta es amplia, ya que se desarrolla frente a numerosos epítomos y prácticamente todas las proteínas del virus, tanto estructurales como reguladoras, que se reconocen como extrañas.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) y los linfocitos T-cooperadores (Th) específicos para el VIH, son uno de los pilares para una potencial vacuna contra el VIH. Una serie de ensayos de vacunas y estudios *in vitro* se enfocan a la importancia de la interacción estrecha entre los dos brazos de la respuesta inmune en la infección por el VIH. Obviamente, también se necesita incluir en el diseño de vacunas, como el procesamiento del antígeno inmunógeno se lleva a cabo (Frahma and Brandera, 2005).

La respuesta inmune temprana al VIH es similar a la respuesta frente a otros virus, es eficaz para destruir virus presentes en la sangre, sin embargo es evidente que la respuesta inmune es incapaz de erradicar el virus de la inmunodeficiencia humana y la infección termina por superar al sistema inmunitario. En parte, esto se debe a que las células necesarias para montar la respuesta inmune se destruyen o se inactivan por el virus, además el virus muestra una gran variabilidad genética, lo que produce variaciones antigénicas que lleva a la evasión del sistema inmune del huésped.

Los inmunógenos del virus de la inmunodeficiencia humana son principalmente las proteínas virales de envoltura gp120, la región V3 o la gp 160, las cuales se utilizarón comúnmente como inmunógenos en las primeras vacunas experimentales contra el VIH-1. Se consideran importantes por el hecho de contener varios epítopes funcionales de células T y B, incluyendo al menos cinco dominios neutralizantes y otros dominios para actividad CTL o de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Otros inmunógenos son los productos del gen *gag*, los cuales contienen secuencias de aminoácidos altamente conservadas o de poquísima variabilidad, y también contienen epítopes reconocidos por Th y CTLs. Los epítopes para CTL se localizan dentro de dominios relativamente conservados en otros productos de genes del VIH-1, tales como aquellos que se codifican por los genes *nef* y el de la polimerasa *pol*. Cerca de 70 al 85% de las personas infectadas con el VIH-1 presentan anticuerpos anti-proteína *nef*, pero no se conoce el papel de ellos en el control de la infección.

4.9.1 Respuesta Inmune Humoral contra el VIH.

Se determinó la generación de anticuerpos frente a la cápside, así como frente a proteínas de la matriz, de la nucleocápside, de proteínas reguladoras del virus, transcriptasa inversa, con títulos elevados de anticuerpos anti-gp120, gp41, p24, en la mayoría de los individuos infectados (Abbas and Lichtman, 1999).

Durante la infección natural, la producción de anticuerpos neutralizantes es muy escasa. Esto es probablemente debido a que, desde el punto de vista estructural, el dominio de neutralización se encuentra oculto en la conformación nativa de la gp160 y sólo tras el desplegamiento de la misma se expone el dominio V3 y regiones adyacentes que interaccionan con los receptores de quimiocinas. Por lo tanto, las partes expuestas y más inmunógenas de la proteína en su forma compacta inducen la síntesis de anticuerpos no neutralizantes, ya que no son epítomos de interacción con el receptor, mientras que sólo cuando la proteína se despliega por la unión a CD4 se exponen epítomos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes de amplio espectro.

Por otro lado, los virus en general y el VIH en concreto, son sensibles a la inhibición por el complemento. También se detectó la existencia de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, en pacientes seropositivos a VIH.

4.9.1.1. Anticuerpos Monoclonales contra la Región V3.

Los anticuerpos humanos dirigidos a la región V3 de la gp120 constituyen el grupo principal de Ac monoclonales humanos en la base de datos. A la fecha hay 33 Acm IgG, dos fragmentos Fab generados a partir de personas infectadas por VIH, cuatro xeno-mAb producidos por los ratones transgénicos, y tres Acm IgM producidos por la estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con péptidos V3.

Estas cifras reflejan tanto la fuerte inmunogenicidad de la región V3 como el interés por la generación de Acm anti-V3, después de que se demostró que éstos podían neutralizar cepas del virus (Rusche *et al.*, 1988); estudios posteriores documentaron la capacidad de los anticuerpos anti-V3 para neutralizar también aislados primarios (Gorny *et al.*, 2004) en experimentos de protección, mediante la inmunización pasiva en modelos animales (Andrus *et al.*, 1998). Muchos de los Acm anti-V3 humanos se produjeron a partir de células infectadas de individuos que presentaban el virus por varios años, estos anticuerpos mostraron capacidad para neutralizar virus de TCLA (adaptados a líneas de células T) y / o aislados primarios (Gorny *et al.*, 1997). Estos estudios sugieren que la inducción de anticuerpos anti-V3 ampliamente reactivos y potentes podrá exigir una prolongada estimulación antigénica (He *et al.*, 2002). Dentro del repertorio de anticuerpos anti-V3 suscitado en los sujetos infectados por el VIH, hay muchos anticuerpos neutralizantes reactivos, que pueden ser aislados si los métodos adecuados se emplean.

Los anticuerpos monoclonales anti-V3 sensitivos a la conformación natural puede neutralizar los aislados primarios, y la mayoría pueden neutralizar por entrecruzamiento una gran variedad de cepas de subtipo B y, en menor medida, los procedentes de otros clados. El anticuerpo monoclonal 447-52Da, reconoce un determinante conformacional, y presenta la actividad neutralizante más amplia de todos los Acm anti-V3 existentes actualmente (Stanfield *et al.*, 2004). Este anticuerpo monoclonal interactúa con los 14 residuos en la corona de la región V3, y su "epítipo básico" se define por la secuencia GPxR, un motivo que es altamente conservado entre los virus de subtipo B y que existe en una minoría de otros subtipos del VIH (Gorny *et al.*, 1992). La presencia y el reconocimiento de los residuos de la arginina (R) en el epítipo central es necesario para que el Acm 447-52Da ejerza su actividad (Zolla-Pazner *et al.*, 2004). Otros Acm anti-V3, tales como Acm 2182, 2191, 2219, 2412, 2442 y 2456 (Tabla 1), no reconocen el mismo epítipo que 447-52Da, pero también muestran la capacidad de neutralizar por entrecruzamiento a los virus de aislados primarios (Gorny *et al.*, 2002). Esta reactividad cruzada revela la presencia de características dentro de la región V3 que se conservan a pesar de la variación de la secuencia en esta región. Esta conservación estructural también se refleja en el papel del asa V3 en la unión a los receptores de quimiocinas, que actúan como correceptores para el virus (Suphaphiphat *et al.*, 2003).

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales anti-V3, aislados de pacientes infectados.

Acm	Tipo Ab	Neutralización	Referencia
N70-1.9b	mAb	TCLA	Robinsón 1990
19b	mAb	TCLA	Moore 1994
257-D,268-D,311-11-D	mAb	TCLA	Karwowska 1992
3886-D,391/95-D,412-D			
418-D,419-D,453D,504-D			
694/98-D,782-D,838-D			
908-D,1006-15-D,1027-15D			
1108,1324-E,1334-D			
447-52D,2182,2119,2219	mAb	PI	Gorny 1993, 2002
2412,2442,2456			
4117C,41148D	mAb	TCLA	Tilley 1992, Pinter 1993
M77	mAb	TCLA	diMarzo 1992
MN215	mAb	TCLA	Schutten 1995
TH1	mAb	TCLA	D´Souza 1995
Loop 2, D0142-10	Fab	TCLA	Seligman 1996
8E1 1/A8, 8.27.3	Xeno- mAb	TCLA	He 2002
6.1,6.7	Xeno- mAb	No-neutralizante	He 2002
M096/V3, M097/V3 MO99/V3	IgMmAb	No-neutralizante	Ohlin 1992

4.9.2 Respuesta Inmune Celular contra el VIH.

La respuesta celular cooperadora y citotóxica es esencial para contener la replicación viral en estadios precoces de la enfermedad en que existe una integridad relativa del sistema inmune. Existe *in vitro* una expansión clonal de linfocitos CD8 con actividad citotóxica. Esta respuesta es particularmente intensa en pacientes en estadio de primoinfección, así como en el contexto de la reconstitución inmune obtenida tras el tratamiento antirretroviral; su intensidad se correlaciona con el control de la replicación viral. Aunque la respuesta celular CD8 es especialmente intensa frente a las proteínas del core; clonas frente a distintos epítomos de la proteína de la envoltura, de la transcriptasa inversa, así como de proteínas reguladoras fueron descritas.

Los interferones también tienen actividad antiviral frente al VIH, en experimentos de terapia génica se demostró que la expresión del gen de interferón beta induce resistencia a la infección en las células transducidas. Probablemente todos estos mecanismos representan una barrera frente a la infección por el VIH, pero son insuficientes para permitir un control de la replicación viral. La actividad antiviral es más intensa en los períodos asintomáticos de la infección, por lo que se postula que el mantenimiento en niveles elevados de la respuesta citotóxica sería un factor de buen pronóstico en la evolución a SIDA (Salas, 2002).

Se sabe que los linfocitos CD8 de pacientes seropositivos inhiben la replicación del VIH y que esta actividad supresora corresponde a factores solubles presentes en el sobrenadante generado a partir de linfocitos CD8 activados. Estos productos son quimiocinas, en concreto la SDF-1. Recientemente se encontró que las células del epitelio vaginal, endocervical y rectal producen grandes cantidades de esta quimiocina, que actuaría en el bloqueo de la propagación de variantes X4. Este fenómeno de inmunidad protectora a nivel de mucosas explicaría por qué sólo las variantes R5 se propagan en la primoinfección (Salas, 2002). Otro tipo de factores solubles son las defensinas, las cuales también se demostró que participan en la inhibición del virus.

4.10 Vacunas contra el VIH

En la actualidad y debido a la severidad de esta pandemia, hay una necesidad de búsqueda de antirretrovirales que actúen en diferentes sitios del ciclo biológico, e impidan la replicación del virus. Existen problemas de diversa índole, como problemas técnicos y éticos, que impide el sintetizar una vacuna con eficacia, uno de estos problemas es la alta tasa de mutabilidad del virus, la resistencias a antirretrovirales, tanto a los inhibidores de la proteasa como de la transcriptasa inversa que se presenta en pacientes que recibieron tratamientos durante más de 10 años. El principal problema para el desarrollo de una vacuna, es la capacidad del VIH para evadir la respuesta inmune, por medio de algunas proteínas virales como Nef, Tat y Vpu que participan en la evasión del sistema inmune por medio de la regulación de la expresión de linfocitos CD4 y/o expresión de moléculas de MHC I, así como la sobre regulación del ligando Fas. Específicamente las proteínas Nef y Tat sobre regulan factores celulares, incluyendo correceptores, inhiben la transcripción de MHC clase I y promueve la apoptosis; por su parte Vpu sobre regula la expresión de CD4 y de MHC I por medio de la pérdida de nuevas cadenas alfa MHC clase I sintetizadas endógenamente.

Recientemente se evalúan más de cien candidatos de vacunas en fase clínica, pero sólo unas pocas, logran pasar a fase clínica III. Sin embargo a la fecha no se tiene a la mano una vacuna efectiva. Para que una vacuna sea efectiva debe de ser segura, inmunogénica y estable, capaz de causar una fuerte y medible respuesta inmune.

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

4.10.1 Proteínas y Subunidades Peptídicas.

Son productos génicos que codifican para las proteínas de envoltura viral, las cuales son el blanco más importante ya que interaccionan con la unión a la célula y permiten la entrada viral, generalmente se utiliza la proteína gp120 o gp160, otros que también se utilizan son los productos de los genes *gag*, *pol*, o ambos.

Este tipo de vacunas constan de pequeñas proteínas o porciones de péptidos del virus patogénico. Pueden ser hechas por ingeniería genética con bacterias, levaduras, o células de mamíferos para producir dichas subunidades antigénicas. Actualmente se evalúan: las subunidades gp160, gp120, p24 y péptidos sintéticos de V3 (sólo o acoplado con PPD o a la toxina A de *Pseudomonas*) (Achour *et al.*, 1996). Al menos 13 diferentes vacunas basadas en las proteínas de envoltura se evaluaron en humanos. Todas estas vacunas inducen virtualmente anticuerpos neutralizantes contra los virus aislados de laboratorio, pero no inducen respuesta citotóxica por los CTL (Klein, 2001).

4.10.2 Virus Vivos Atenuados.

Estas vacunas se producen por mutaciones o deleciones hechas en los genes del virus atenuándolo, utilizan virus vivos que se modifican o atenúan para producir un virus menos virulento, lo que induce ambos tipos de inmunidad, celular y humoral, generalmente requieren solo una o dos inmunizaciones, así la respuesta inducida por vacunas de atenuados vivos es duradera. Debido a causas de seguridad las vacunas de VIH de virus atenuados vivos no se administran a humanos, ya que existe la posibilidad de que algunas vacunas puedan ser infectivas, por el revertimiento del virus de tipo silvestre atenuado (Trauger *et al.*, 1994).

4.10.3 Partículas o Vacunas Completas Inactivadas.

Las vacunas completas inactivadas se preparan de virus no patogénicos disponibles o incapaces de replicarse, usualmente se elaboran por un tratamiento químico. Ejemplos de este tipo de vacunas son: V3: Ty-VLP (V3 más un producto transposon de levadura), p55 Gag, pseudoviriones VIH-env, gag y pol.

Estas “vacunas muertas” son potencialmente más seguras que las vacunas de virus atenuados; sin embargo las vacunas muertas completas a menudo pierden la potencia en comparación con la inmunogenicidad del virus vivo que es larga, esto es debido al tratamiento usado para inactivar o destruir, ya que altera importantes antígenos protectores. Para sobrellevar algunos de estos obstáculos, se producen vacunas experimentales para SIDA de partículas parecidas a virus (VLP) o “pseudoviriones” por tecnología recombinante, y se expresa uno o más genes estructurales de VIH o VIS para mimetizar la expresión natural de la proteína viral (Klein *et al.*, 1997). Un ejemplo reciente es el diseño de un pseudovirus de papiloma virus que expresa la proteína Gag del VIH-1, para la inducción de inmunidad en mucosas (Zhang *et al.*, 2004).

4.10.4 Vectores Vivos Recombinantes.

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

Los poxvirus (NYVAC, ALVAC, fowlpox, canarypox (Belshe *et al.*, 1998) recombinantes fueron los primeros en utilizarse en primates no humanos, principalmente se utiliza al virus recombinante vaccinia-VIH gp160, canarypox-VIH gp 160 y canarypox-VIH gp 120 (Fleury *et al.*, 1996; Caley *et al.*, 1997; Belyakov *et al.*, 1998), influenza virus (Muster *et al.*, 1995), mengovirus, rinovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la polio (Morrow *et al.*, 1994). También se utilizan bacterias vivas atenuadas como *Salmonella*, BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) (Aldovini and Young, 1990,1991) y *Listeria* (Guzmán *et al.*, 1998; Friedman *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2007).

Recientemente se emplean bacterias comensales como *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* para la expresión de genes deseados, estas bacterias inducen una buena respuesta inmune humoral y celular, con la característica principal de ser seguras.

4.10.5 Vacunas de ADN

En la inmunización con ADN, el hospedero se inmuniza por la administración directa de genes virales; estos genes codifican para los antígenos que normalmente pueden ser producidos por la célula infectada con el virus. Las vacunas de ADN muestran la inducción de una respuesta inmune humoral y celular. El desarrollo de nuevos sistemas de expresión con: promotores más eficientes, genes de citocinas inmunomodulatorias, moléculas coestimuladoras y adyuvantes, se evalúan continuamente. Ejemplos de estas vacunas son: gp160+ rev ADN, gag + pol ADN, gp 120 ADN y gp 160 ADN (Coney *et al.*, 1994. Fuller *et al.*, 1996; Bagarazzi *et al.*, 1997; Boyer *et al.*, 1997).

4.11 Adyuvantes Utilizados en la Formulación de Vacunas contra el VIH.

Los adyuvantes inmunológicos son agentes que aumentan la respuesta inmune y se definen como sustancias que cuando se incorporan a vacunas actúan generalmente acelerando, prolongando o aumentando la calidad de respuesta inmune específica a un antígeno al administrarse conjuntamente y en el mismo lugar. Para simplificar la terminología consideraremos adyuvantes (del latín adjuvare = ayudar) a toda sustancia, proceso o combinación de sustancias que aumentan la respuesta a un inmunógeno.

En la lucha para el control del VIH, hay nuevas vacunas en desarrollo, sin embargo la ausencia de la asociación de estas vacunas con adyuvantes seguros, a menudo resulta en una débil inmunogenicidad de dichas vacunas.

Las ventajas potenciales del uso de adyuvantes inmunológicos en formulación de vacunas incluye promover la respuesta inmune mediada por células, aumentar la inmunogenicidad de los inmunógenos débiles tales como antígenos recombinantes o altamente purificados, reducir la cantidad de antígeno o la frecuencia de inmunización requerida para proveer una respuesta inmune protectora, para aumentar la eficiencia de la vacuna en individuos con una débil o reducida respuesta inmune como los recién nacidos, ancianos e inmunocomprometidos.

Los adyuvantes tienen diferentes mecanismos de acción, por lo cual pueden ser seleccionados de acuerdo a la ruta de administración y respuesta inmunológica deseada (respuesta humoral, celular, sistémica o en mucosas) (Vogel and Powell, 1995). Algunos adyuvantes utilizados ampliamente en la formulación de vacunas contra el VIH son:

-Aluminio en varias presentaciones: fosfato de aluminio (MicroGeneSys), hidróxido de aluminio o Alhydrogel (Superflon), hidróxido de aluminio más thimerosal (UBI, Genentech), hidróxido de aluminio más deoxicolato o DOC y thimerosal (IMMUNO-AG), y aluminio en liposomas con monofosforil lípido A o MPL (Walter Reed).

-Monofosforil Lípido A (MPL): Endotoxina lipopolisacárido bacteriano (LPS) y lípido A, purificado de *Salmonella minnesota* R595 (RIBI).

-MTP-PE [+/- MF59]: Esta emulsión adyuvante contiene muramil tripéptido (MTP) ligado con una dipalmitoil fosfatidiletanolamina (PE), con o sin MF59, un sistema emulsificador de polisorbato 80 y sorbitol trioleato (CIBA-Geigy).

-QS-21: un derivado de saponina de *Quillaja saponaria*; los ácidos grasos y estructuras naturales presentes en este producto contribuyen a su propiedad adyuvante (Genentech).

-Formulación Adyuvante Syntex (SAF-m): emulsión consistente de polímeros y Tween 80 en buffer salino de fosfatos PBS (Biocine) (Vincent *et al.*, 1997).

4.12 La Toxina del Cólera y su Aplicación como Adyuvante de Mucosas.

La proteína de la tóxima del cólera (CT) pesa aproximadamente 86 kDa y consiste de un complejo AB-5 que se compone de una subunidad A1 (23 kDa) enzimáticamente activa, la cual se une a un pentámero de subunidades CTB (11 kDa) idénticos, los cuales se ensamblan en un anillo pentamérico alrededor de un poro central por medio de un fragmento CTA₂ (5 kDa), el cual presenta una cola α -helicoidal. Esta estructura AB5 se encuentra estrechamente relacionada con la enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigénica, la cual causa diarrea, a menudo en los niños. Las subunidades A y B de la toxina del cólera se producen en el citosol por dos genes que se traslapan por una base, y luego se ensamblan en una toxina en el periplasma situada entre la membrana interna y la pared celular externa de la bacteria. La enterotoxina de *V. cholerae* es un producto de los genes CTX, donde ctxA codifica la subunidad A de la toxina, y ctxB codifica la subunidad B. La transcripción del operón ctxAB es regulada por una serie de señales ambientales, incluyendo la temperatura, el pH, la osmolaridad, y ciertos aminoácidos. Otra particularidad de la toxina, es que la subunidad A en el complejo de la toxina A/B del cólera es inactivo, y requiere la ruptura del dominio A1 del dominio A2 dentro de la célula infectada para que el A1 pueda convertirse en una enzima activa (Fig. 7).

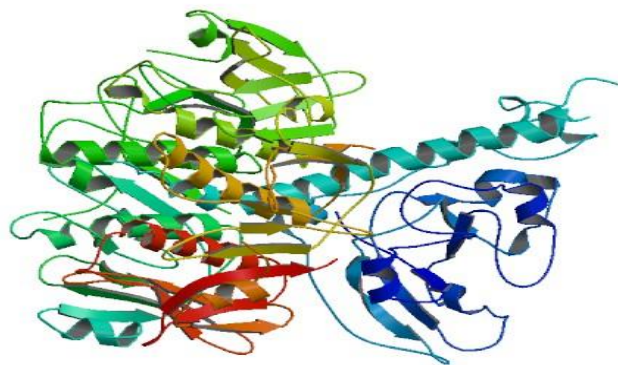


Fig. 7. Estructura de la toxina del cólera. Subunidad A (CTA en azul), subunidad A₂B y subunidad B (CTB en verde).

Cuando la toxina del cólera se libera de la bacteria en el intestino infectado, se une a las células intestinales conocidas como los enterocitos mediante la interacción de la subunidad B de la toxina pentamérica con el receptor de gangliósidos GM1 de las células intestinales, lo que provoca la endocitosis de la toxina. A continuación, la toxina del cólera A/B debe someterse a la ruptura del dominio A1 del dominio A2, con el fin de convertir A1 en una enzima activa. Una vez dentro del enterocito, el fragmento A1 enzimático de la subunidad A de toxina entra en el citosol, donde activa la proteína G (Gsa) a través de una reacción de ADP-ribosilación que actúa para bloquear la proteína G en su forma unida a GTP. Dado que la hidrólisis del GTP es el evento que inactiva la adenilatociclase, continuamente se estimula a esta enzima para producir AMPc. Así, el efecto neto de la toxina es a causa de AMPc por ser producido a un ritmo anormalmente alto, que activa al regulador de la conductancia de fibrosis transmembranal (CFTR), y provoca un dramático eflujo de los iones Na⁺, K⁺, Cl⁻, HCO₃⁻ y de el agua de los enterocitos infectados en el lumen del intestino delgado, lo que lleva a la diarrea acuosa y deshidratación, característicos del cólera (Sánchez *et al.*, 2004).

Uno de los mejores inmunógenos orales capaces de estimular una respuesta a nivel de mucosa es la toxina elaborada por *V. cholerae*. La toxina del cólera (CT) se compone por dos tipos de subunidades, una llamada subunidad B (CTB) y otra llamada subunidad A (CTA). Aunque la toxina del cólera es extremadamente efectiva como adyuvante, su toxicidad limita su uso en humanos. En algunos estudios, la toxina se modifica de diversas formas para aminorar sus efectos letales, (Lomada *et al.*, 2004). Otra variante es el de Yoshino *et al.*, 2009 quien obtuvo un extracto fenólico para reducir los cambios morfológicos y la acumulación de AMPc, y así poder utilizar la CT como vacuna nasal. Incluso se estudió su actividad adyuvante, para disminuir sus efectos tóxicos, mediante su fusión con la enterotoxina de *Escherichia coli* (Bowman and Clements, 2001).

La molécula completa de la toxina del cólera, no se utiliza en humanos por su efecto tóxico, sin embargo la subunidad B, si se administra a humanos. Anteriormente se demostró que es principalmente la subunidad B la que es muy eficaz para estimular inmunidad en las mucosas, tanto del intestino como en otros órganos. Esta propiedad parece ser igualmente conservada cuando esta subunidad se añade o se fusiona con haptenos heterólogos por ingeniería genética.

Recientemente se documentó el uso de esta toxina como un potente adyuvante en mucosas debido a que la gran mayoría de las enfermedades infecciosas tienen lugar o empiezan en las superficies mucosas: la mucosa gastrointestinal, la mucosa respiratoria o la urogenital. El mecanismo de defensa inmune contra estas infecciones depende principalmente, si no exclusivamente, de los sistemas de inmunidad local situados por debajo de dichas superficies. Este tejido linfoide asociado a mucosas es, sin embargo, difícil de estimular por medio de vacunas de administración parenteral. La inmunización oral, por el contrario, es muy superior en lo que se refiere a la inducción en la producción de la inmunoglobulina IgA, cuya función es proteger contra infecciones que se inician en las mucosas, lo que hace prometedora a esta toxina como adyuvante en mucosas. Después de este hallazgo, los avances no cesan y actualmente ya se conoce la estructura tridimensional de la toxina, su acción sobre el intestino humano y se emplea como adyuvante en el diseño de múltiples vacunas.

La capacidad adyuvante de la toxina del cólera, se demostró en la generación de inducción de inmunidad contra diversos microorganismos como *Proteus mirabilis* (Scavone *et al.*, 2009), contra la proteína sonicasa de *Salmonella enteritidis* (SSP), y para combatir la gastroenteritis aguda causada por el principal patógeno entérico: *Salmonella* (Huang *et al.*, 2008), también se empleó en el desarrollo de vacunas contra *Bordetella pertussis* (Isaka *et al.*, 2003) combinadas con toxoides de: difteria y tétanos (DPT) (Isaka *et al.*, 2004), contra antígenos de *Helicobacter*, sp (Watanabe *et al.*, 1999; Blanchard *et al.*, 1998; Danon *et al.*, 2001), y contra antígenos de superficie de *Streptococcus mutans* (Saito *et al.*, 2001).

Igualmente se utiliza CTB como adyuvante de mucosas contra virus, para la generación de anticuerpos neutralizantes contra hepatitis B (Isaka *et al.*, 2001), e influenza A y B, (Isaka *et al.*, 2008, Matsuo *et al.*, 2000), y contra una cepa lisogénica del virus de Newcastle (NDV) (Shebannavar *et al.*, 2007). En cuanto a su utilización contra parásitos, la subunidad B de la toxina del cólera, se usa para inducir inmunidad contra la Trichomoniasis, enfermedad de transmisión sexual causada por *Trichomonas vaginalis* (Hernández *et al.*, 2005).

A nivel molecular, adicional a la inducción de la respuesta humoral específica, se detectó la influencia de la toxina del cólera sobre los linfocitos T (Th1 y Th2) (Kim *et al.*, 2007). Específicamente en el bazo y en las placas de Peyer, la toxina del cólera induce a los linfocitos T, la expresión de IFN-gamma (Th1) e IL-4 (Th2) (Maeyama *et al.*, 2001), también se determinó la inducción específica de las interleucinas IL-5 e IL-6 (Marinaro *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2007).

Otro efecto inmunológico importante de la toxina del cólera, y de menor entendimiento es el estudiado por Bregenholt *et al.*, 2003, en el que observó un incremento de la tolerancia oral a la insulina en ratones transgénicos con diabetes inducida por un virus RIP-LCMV-NP, así como en ratones diabéticos no obesos (NOD). Concluyendo que cuando se conjugan varias proteínas a la subunidad B no tóxica de la toxina del cólera, ésta significativamente incrementa la habilidad de estas proteínas para inducir tolerancia inmunológica después de la administración oral.

Diferentes estrategias para el desarrollo de una vacuna segura y eficiente en la inducción de inmunidad contra este virus se utilizan. La toxina del cólera también se emplea en combinación con antígenos del VIH para la inducción de inmunidad específica humoral y celular en mucosas.

Uno de los principales antígenos del VIH utilizados en combinación con la toxina del cólera es el uso de proteínas de la envoltura viral, como es la gp120 (Porgador *et al.*, 1997; Bagley *et al.*, 2003), aunada a liposomas (Merrill *et al.*, 1993), o regiones de la gp120 como el C4/V3 (Esquivel-Pérez and Moreno-Fierros, 2005) y el asa V3, sitio principal para la generación de anticuerpos neutralizantes (Backstrom *et al.*, 1994).

Otra estrategia es el uso de la proteína gp140 del VIH fusionada a la subunidad B de la toxina del cólera (Kim *et al.*, 2004) o en combinación con interleucina-12 (Albu *et al.*, 2003). También se utilizan las proteínas de la cápside como p55 y gag p27 (Imaoka *et al.*, 1998, Kubota *et al.*, 1997), así como proteínas regulatorias como Tat (Kim *et al.*, 2004). Todas estas estrategias representan buenos resultados en la inducción de inmunidad específica humoral y celular contra el VIH, pero algunas de ellas son dependientes de dosis o de la vía de administración.

4.13 Inmunidad en las Mucosas.

La superficie de la mucosa en el tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital representa un área de amplia exposición a microorganismos. El tejido de la mucosa se defiende por un sistema inmune local con propiedades y funciones que en muchos aspectos se encuentran separados del sistema inmune sistémico (Holmgren *et al.*, 1992). Este tejido, llamado tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) constituye alrededor del 75 por ciento del sistema inmune total del organismo.

Un mayor entendimiento de los factores celulares y moleculares involucrados en la regulación de la inmunidad en mucosas, podría ayudar en el diseño de una vacuna en mucosas, que sea segura y que obtenga un efecto protector apropiado de la respuesta inmune a un patógeno dado. Las ventajas de la administración por mucosas son: más aceptables, no requiere un riguroso criterio aplicable para vacunas inyectables, los problemas de almacenaje pueden ser simplificados y grandes poblaciones de individuos pueden ser inmunizados simultáneamente sin la asistencia de personal especializado de salubridad (Mestecky *et al.*, 1992). Por lo que una vacuna disponible que induzca inmunidad o protección en mucosas e inmunidad sistémica a patógenos es de gran interés para combatir enfermedades infecciosas (Boyaka *et al.*, 1999). Sin embargo, la eficiencia de inducción de una buena respuesta humoral en mucosas a través de una vacuna oral es dependiente de las propiedades fisicoquímicas del antígeno, el ambiente gastrointestinal, la presencia de adyuvantes, y el modo de liberación.

El entendimiento de como estos factores interactúan es crítico para el desarrollo de nuevas vacunas orales (Shalaby, 1995). También hay una gran necesidad por desarrollar estrategias para identificar adyuvantes que despierten una mayor respuesta inmune en mucosas (Osek and Trusczyński, 1995).

4.13.1 La Inmunidad Humoral en las Mucosas.

La IgA secretoria (SIgA) es la inmunoglobulina predominante en la mucosa, y los anticuerpos IgA generados en la mucosa gastrointestinal, respiratorio o genitourinario pueden conferir protección contra infecciones originadas en ese sitio. La producción de inmunoglobulinas típicamente requiere células T cooperadoras, estas células se dividen en dos subgrupos funcionales sobre la base del patrón de secreción de citocinas. En general las células Th1 producen $\text{INF-}\gamma$, el cual es importante para la respuesta inmune mediada por células e inflamación. Las células Th2 secretan interleucina 4, IL-5, y IL-13, e inducen la activación y diferenciación de células B. Otro factor importante es el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y su receptor tipo II sobre las células B, el cual es vital para el cambio de clase a IgA. En conclusión las citocinas Th2 controlan la diferenciación de células B en células plasmáticas para la producción de anticuerpos (Van Ginkel, 1999).

El papel de la IgA secretoria es excluir antígenos del epitelio, recientemente se sugiere el papel de que la IgA utiliza el receptor pIgR para transportar activamente antígenos fuera de la lámina propia a la superficie apical del enterocito (Robinson *et al.*, 2001).

Recientes investigaciones muestran la importancia de los anticuerpos ante la infección de VIH, en donde mediante la administración pasiva de anticuerpos neutralizantes, se previene la transmisión del VIH en simios y en simios neonatos, lo que lleva a una estrategia clínica contra la transmisión del virus por medio de la madre al infante (Marjorie, 2000). En un estudio similar se muestra la protección de simios contra la transmisión vaginal de un virus quimérico VIH-1/VIS por medio de la administración pasiva de anticuerpos neutralizantes (Mascola *et al.*, 2000).

4.13.2 La Inmunidad Celular en las Mucosas.

El sistema inmune celular de la mucosa intestinal se compone de 3 áreas linfoides principalmente, 1) los linfocitos de lámina propia (LP), los cuales se encuentran por debajo de la membrana basal, estos linfocitos son células plasmáticas secretoras de IgA y células T efectoras de memoria, 2) los linfocitos intraepiteliales (IEL), contenidos en el compartimiento intraepitelial, localizados en la membrana basal y entre la columna de células epiteliales y 3) los linfocitos de las placas de Peyer (PP), nódulos linfoides embebidos en la pared intestinal, los cuales presentan células B y centros germinales rodeados por linfocitos T, separados de los IEL y los LP (Fig. 8). Los LP y PP contienen grandes cantidades de células B, el resto de los linfocitos T invariablemente son predominantemente CD4+. En contraste los IEL son predominantemente CD8+. Estas poblaciones linfoides (IEL, LP, PP) forman un complejo interconectado que responde inmunológicamente en el intestino. Los linfocitos de LP y PP continuamente recirculan en la sangre y en el sistema linfático, de este modo hay un cambio considerable entre los linfocitos intestinales y el sistema linfoide periférico. Por el contrario los IEL sufren una mínima recirculación, lo que sugiere que su función es limitada al área (Poussier *et al.*, 1992).

Un aspecto interesante es que los linfocitos de lámina propia expresan marcadores de superficie asociados con un estado activado, también se observó que producen cantidades significantes de interleucina 2, IL-4, IL-5, IL-10 e INF- γ . Por otro lado se descubrió un grupo de progenitores de células T, a lo largo del intestino delgado y grueso en las criptas de la lámina propia, lo que sugiere que el epitelio intestinal puede ser único en su habilidad para funcionar como un importante sitio para la maduración extratímica de una población de células T (Suzuki, 2000). Estas criptas son indispensables para el desarrollo independiente de timo de los linfocitos intraepiteliales (IEL), la maduración pudiera ser dada por medio de la secreción de IL-7 que producen los enterocitos. Otra característica importante es la expresión preferencial del homodímero CD8 $\alpha\alpha$ en las células T, en lugar del heterodímero CD8 $\alpha\beta$ que se expresa en las células CD8+ en otros sitios, lo cual los identifica como IEL derivados extratímicamente, sin embargo no se obtuvo evidencia del papel funcional de estos IELs.

Recientes estudios muestran 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 lámina propia, en espera del próximo reto antigénico (Masopust *et al.*, 2001). Estas células se distinguen de las células de memoria central encontradas en órganos linfoides por la expresión tardía del receptor de quimiosinas CCR-7. Otros trabajos identifican a otros receptores de quimiosinas como TECK y CCL25 y su ligando CCR9 como reguladores de la migración específica de tejido. CCR9 se presenta virtualmente sobre todos los linfocitos CD4+ y CD8+ en el intestino delgado, lo que sugiere que estos receptores dirigen la migración de los linfocitos de memoria a la lámina propia del intestino delgado. Por lo que la habilidad del tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal (GALT) para responder rápida y efectivamente a patógenos entéricos se incrementa por la acumulación de células T efectoras de memoria en este sitio (Papadakis, 2000).

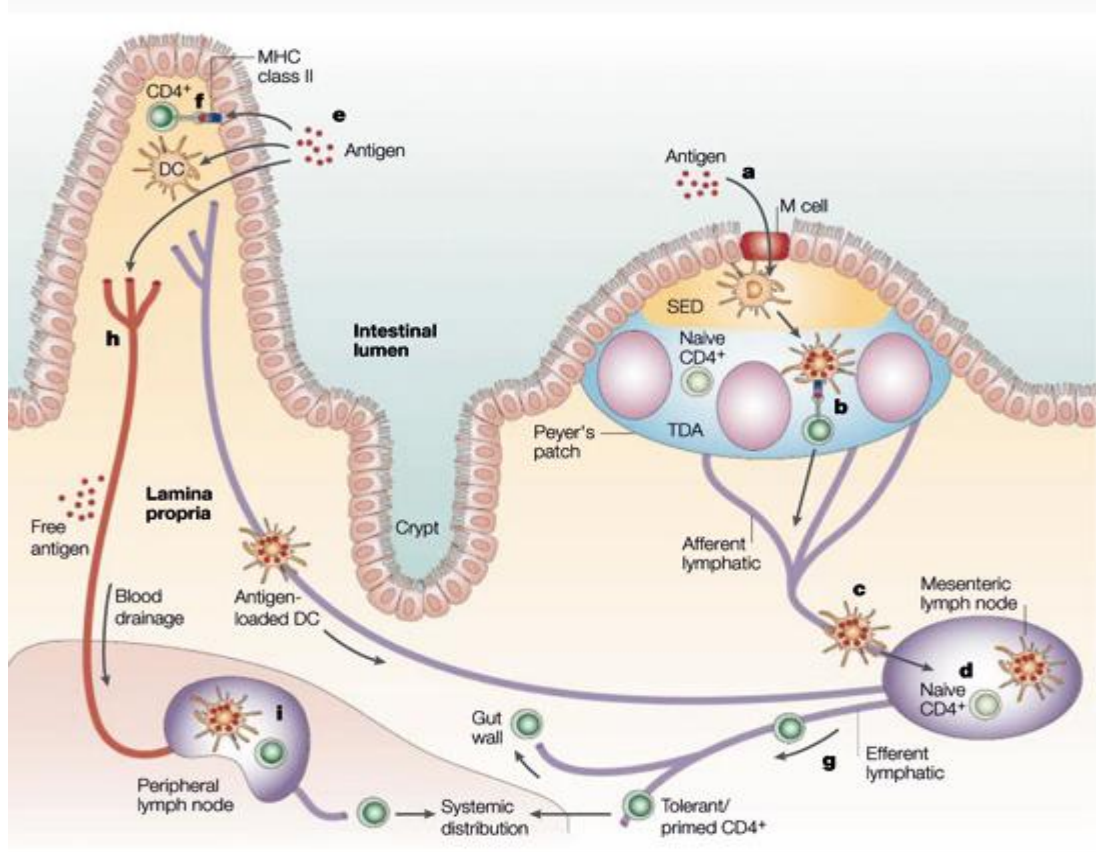


Fig. 8. Representación esquemática de la mucosa y las células inmunitarias presentes en el MALT.

4.14 La Microbiota en el Tracto Gastrointestinal.

Nuestro tracto intestinal es poblado por aproximadamente 100 trillones de bacterias con 15 diferentes familias o géneros que incluyen de 80 a 100 o más especies o subespecies en algunos individuos, una región específica del intestino grueso puede contar con más de 400 especies bacterianas diferentes. Las especies bacterianas incluyen tanto especies aeróbicas como anaeróbicas. Si tomamos en cuenta el tamaño y el peso de las bacterias, se puede calcular que aproximadamente la mitad de las heces fecales que se eliminan del cuerpo humano consiste de bacterias vivas o muertas de 1 a 1.5 Kg de biomasa. Estas bacterias se adquieren una vez que el feto proveniente de un ambiente estéril nace. El intestino se empieza a colonizar progresivamente por varias bacterias principalmente enterobacterias (*E. coli*, *Streptococos* y *Clostridium*), posteriormente se presentan bacteroides y bifidobacterium, predominando éstas últimas. Las especies bacterianas cambian durante el desarrollo del individuo de niño a adulto, y factores tales como la dieta, aspectos psicológicos, estrés, eficacia en el metabolismo de las drogas, carcinogénesis, envejecimiento, respuesta inmunológica y resistencia a las infecciones por endotoxinas entre otros influyen de manera significativa en el equilibrio de la flora intestinal (Mitsuoka, 1982).

La interacción entre la flora intestinal y el huésped se lleva a cabo mediante procesos simbióticos y antagonistas (Mitsuoka, 1975). La flora intestinal se compone de diferentes especies bacterianas y por lo tanto contiene una variedad de enzimas que corresponden a los diferentes tipos y variedades de metabolismo del intestino que influyen en la salud del huésped y la resistencia a enfermedades (Mitsuoka, 1996). En logaritmos de 10^9 - 10^{11} , predominan en la flora intestinal grupos bacterianos como las bífidobacterias cuya función es la de aportar efectos benéficos al huésped y promover la salud. Una reducción de bífidobacterias en el intestino grueso indica un estado no saludable del individuo. En logaritmos de 10^6 - 10^8 por gramo de materia fecal se encuentran géneros de bacterias como *E. coli*, con efectos dañinos al huésped y padecimientos que incluyen diarreas y constipación. En logaritmos más bajos entre 10^1 - 10^4 se incluyen los microorganismos patógenos (*Clostridium perfringens*, *Proteus* y *Pseudomonas* entre otros) que causan enfermedades.

Dentro del intestino las bacterias se encuentran implicadas en la producción de sustancias tanto benéficas como dañinas al huésped, adicionalmente las toxinas bacterianas y los componentes celulares producidos por algunas especies de bacterias modifican sus respuestas inmunológicas, para promover o inhibir dichas funciones. La flora intestinal benéfica protege el tracto intestinal de la proliferación o infección por bacterias patógenas, mientras que alguna flora deteriorada manifiesta patogenicidad cuando la resistencia del huésped se ve disminuída (Katelaris, 1996). Esto evidencia de que la flora intestinal se encuentra ligada a la salud del huésped y a las enfermedades, indicándose así, la importancia del balance de la flora intestinal.

Un complejo y dinámico ecosistema microbiano habita el intestino humano, donde la mucosa es sólo la primer línea de defensa que se encuentra en estrecha comunicación con el sistema inmune sistémico. El epitelio intestinal debe ser capaz de discriminar entre flora normal y patógenos entéricos. Así, los microorganismos que sobreviven a la interacción inicial con las defensas locales del hospedero usualmente activan otras defensas inmunes protectoras.

Las bacterias patógenas poseen un proceso adaptativo altamente especializado que les permite el acceso al epitelio intestinal y causar daño, para esto un paso necesario es la colonización y la adherencia a la superficie hospedera, 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. Algunas bacterias se adhieren a células intestinales por medio de una amplia variedad de glicoproteínas y glicolípidos presentes en la célula hospedera y por medio de receptores transmiten señales que pueden romper el citoesqueleto y entrar a la célula blanco (Fasano, 1998), otro ejemplo de estos son los factores de virulencia.

Un aspecto de gran interés es que sólo por sus altos números la flora nativa interfiere con la colonización de patógenos, mediante la competición por: nutrientes, sitios de colonización, sitios que tienen un papel importante en la protección en mucosas, además de que producen componentes antimicrobianos naturales como lactocinas, lactacinas, nicinas, helveticinas, curvacinas y bifidocinas, también debido a la metabolización de nutrientes en ácidos grasos volátiles, y ácidos biliares modificados químicamente, crean un ambiente local que es infavorable para el crecimiento de patógenos entéricos (Lei Lu and Walter, 2001).

Otro 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 bacterias patógenas de comensales y presentar una débil respuesta del hospedero contra comensales o montar una fuerte respuesta inmune ante una invasión microbiana. 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 este tipo, es el de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por el receptor Toll en *Drosophila*, su contraparte en mamíferos son los receptores parecidos a Toll (TLRs). La señalización por TLRs puede inducir la sobre regulación de moléculas coestimuladoras que proveen una segunda señal para la activación de células T. Sin embargo, algunos elementos estructurales microbianos esenciales que se reconocen por los TLRs son comunes en las bacterias comensales y en los patógenos. El porqué las bacterias comensales no activan el sistema inmune innato, posiblemente se debe a que la mayor parte de estas bacterias no tienen acceso a las placas de Peyer, ellas permanecen atrapadas en la capa mucosa, bloqueadas por la barrera física dada por las glicoproteínas y glicolípidos (Nagler, 2001).

4.15 Uso de Bacterias como Vehículos para Vacunas contra el VIH.

El término 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 montan 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 se utiliza para la prevención de tuberculosis.

Un aspecto muy importante 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 y sobretodo en pacientes inmunocomprometidos, donde el sistema inmune determina la magnitud del riesgo asociado con una vacuna en particular.

Actualmente se utilizan organismos vivos recombinantes como vacunas para la prevención de diversas enfermedades bacterianas y vírales. Entre los virus más utilizados, son: *canarypox*, *vaccinia*, *adenovirus*, etc., también se emplean bacterias entre las cuales destaca *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli*, y actualmente se proponen más como *Francisiella*, y *Cholera*. El agente vivo más utilizado es *Salmonella typhi*.

Los vectores bacterianos presentan 6 ventajas: 1) pueden ser administrados oralmente, lo que es práctico y confiable para los programas de vacunación, 2) se administran fácilmente, 3) las cepas atenuadas se desarrollan para no revertir, 4) generalmente se desarrollan para su uso en humanos y para ser sensibles a antibióticos, así que si hay una reacción adversa es posible su eliminación con el uso de antibióticos, 5) su producción no es cara, 6) el tropismo de los vectores bacterianos por células dendríticas y macrófagos en el tejido linfoide de mucosas, los dirige a esos sitios (Hone, 1991; Izhar, 1990).

Estos organismos no dejan de representar un riesgo, por lo cual la investigación se dirigió más hacia organismos que sean inocuos o de poco riesgo para el huésped como es el caso de las bacterias comensales, específicamente las bacterias lácticas (Pirofski and Casadevall, 1998).

Por lo anterior, estos vectores se pueden dividir en dos principales categorías: los que se basan en patógenos atenuados como *Salmonella*, *Shigella*, *Bordetella*, BCG, etc. y los que se basan en bacterias comensales como *Lactococcus*, *Lactobacillus* o ciertas cepas de *Stafilococcus* y *Streptococcus*. Sin embargo según el vector utilizado, el lugar de liberación, la vía de administración y el nivel de expresión del antígeno extraño, la magnitud de la respuesta inmune puede ser ampliamente influenciada.

4.15.1. Bacterias Atenuadas como Vehículos para Vacunas contra el VIH.

Bacilo Calmette-Guerin

Mycobacterium bovis BCG (BCG) tiene un gran número de características que le dan un potencial para ser considerado como un vehículo en el desarrollo de vacunas recombinantes contra el VIH (Joseph *et al.*, 2006), por lo que se utiliza ampliamente como vector. Sin embargo, es dependiente de los niveles de expresión del antígeno y presenta inestabilidad genética.

El BCG se utiliza para expresar proteínas de VIH-1 y VIH-2 (Stover *et al.*, 1991), así como del SIV (Koenig *et al.*, 1993). Stutz *et al.*, 2009 utilizó este sistema para generar un BCG recombinante (rBCG) que expresa la proteína gag completa o la transcriptasa reversa (RT) del VIH-1 subtipo C, y esta vacuna fue probada en ratones BALB/c, donde células CD8+ T específicas de antígeno se detectaron. Otros antígenos del VIH expresados en *M. bovis* es el asa V3 (Kawahara *et al.*, 2002a; Someya *et al.*, 2005) y productos del gen *env* (Ranganathan *et al.*, 2009, Cayabyab *et al.*, 2006) como la proteína gp120 (Hovav *et al.*, 2007). Recientemente Chege *et al.*, 2009 construyó un BCG recombinante que expresa el gen gag del VIH-1 subtipo C, combinándolo con Pr55(gag) y partículas parecidas a virus (gag VLPs), para la obtención de una respuesta predominante de CD8+ T y la inducción de respuesta humoral específica a la proteína gag.

Todos estos estudios y algunos más que expresan antígenos en *M. bovis* (Wiriyarat *et al.*, 2005; Promkhatkaew *et al.*, 2009a,b; Cayabyab *et al.*, 2009; Chapman *et al.*, 2010), muestran que el BCG puede ser usado como un vector recombinante vivo para inducir inmunidad celular contra VIH-1, mientras que la inducción de inmunidad humoral se logra por la combinación de diferentes dosis o diferentes rutas de inmunización (Kawahara *et al.*, 2002b), convirtiéndolo en una desventaja como vector en el desarrollo de una vacuna.

Listeria monocytogenes

Está bien establecido que la infección natural por *Listeria*, induce una fuerte respuesta celular, por lo que se aumenta la posibilidad que una bacteria recombinante atenuada pueda servir como vehículo para una vacuna (Jiang *et al.*, 2007). *Listeria monocytogenes* es un patógeno facultativo intracelular, el cual escapa del fagosoma y se replica en el citoplasma de los macrófagos. Esta propiedad es explotada mediante el uso de la bacteria como un acarreador de la expresión intracitoplasmática de antígenos, cuando la respuesta requerida de linfocitos T citotóxica se restringe a MHC clase I. En un sistema *in vitro* Guzmán *et al.*, 1998, demostró que *Listeria* es eficiente para expresar antígenos por la vía MHC II de la proteína gp 120 del VIH-1, este potencial también fue investigado por Peters *et al.*, 2003, Rayevskaya and Frankel, 2000. También se utiliza a *Listeria* para inducir una respuesta de células T citotóxicas específicas contra la proteína gag del VIH (Mata *et al.*, 1996, 1999, 2001; Li *et al.*, 2008).

Salmonella

Uno de los avances más reciente es el desarrollo de vectores de vacunas basados en *Salmonella*. 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. Los vectores de *Salmonella*, se utilizan potencialmente para la inducción de una respuesta celular contra antígenos virales.

La expresión de la proteína de envoltura gp120 del VIH, se utiliza ampliamente con este tipo de vectores (Berggren *et al.*, 1995; Fouts *et al.*, 1995; Hone *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997), y en uno de estos estudios, se comprobó su eficacia en la inducción de células T CD 8 específicas a VIH-1, en comparación con las inducidas por vacunas de ADN con gp 120 administrada intramuscularmente (Shata *et al.*, 2001). Otras proteínas del VIH expresadas en este tipo de vectores son los genes de regulación Rev, Tat y Nef del VIH-1 (Chen *et al.*, 2006; Kgatle *et al.*, 2008), al igual que el asa V3 de la gp120 (Cattozzo EM, 1996, 1997) y el gen gag, en el cual utilizaron a *Salmonella* entérica serovar *typhimurium* como vector (Kotton *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2003), para generar una buena respuesta citotóxica. Posteriormente Chin'ombe *et al.*, 2009 expresó el gen gag del subtipo C del VIH-1 e indujo una respuesta humoral específica contra la proteína gag, así como la inducción de citocinas Th1 (INF- γ y TNF-alpha) y Th2 (Interleucina-4 e Interleucina-5). Finalmente, en la utilización de estos vectores, también se expresó la proteína p24, la cual induce la expresión de IFN- γ por linfocitos de bazo (Bachtiar *et al.*, 2009). A pesar de la inducción de una buena inmunidad, las desventajas de este vector es que en algunos casos, se logro la inducción de inmunidad mediante la administración de varias dosis del vector recombinante, y que por naturaleza es un patógeno con posibilidad de revertir. Sin embargo, *Salmonella* es uno de los mejores vectores en la plataforma para el desarrollo de vacunas actualmente.

Shigella

Shigella como vector de expresión, tiene poca atención por su patogenicidad, sin embargo la atenuación de ésta, la hace más favorable, (Kotloff, 1996; Noriega *et al.*, 1994; Phalipon and Sansonetti, 1995). *Shigella flexneri* tiene la propiedad de que eficientemente escapa del endosoma y accesa directamente al citoplasma de la célula hospedera, por lo que induce una respuesta inmune celular y humoral. *Shigella* atenuada es de los primeros vectores bacterianos empleados para liberar vacunas de ADN (Powell, 1996).

El desarrollo de *Shigella* como vehículo para liberar ADN plasmídico en células hospederas fue inicialmente hecho en mutantes de *S. flexneri* que son deficientes en síntesis de pared celular (Sizemore, 1995), y se utiliza específicamente para la liberación de plásmidos de ADN en mucosas contra el VIH, e incluso Vecino *et al.*, 2002 documenta que es el mejor inductor de inmunidad específica, comparado con *Salmonella* como vector. A la fecha se reporta poco el uso de *Shigella* como vector de expresión en el desarrollo de vacunas contra el VIH, sin embargo, uno de los trabajos donde emplean a este vector es el de Xu *et al.*, 2003, quien utilizó a *S. flexneri* serotipo 2a rfbF para expresar el gen gag del VIH, con muy buenos resultados en la inducción de inmunidad.

4.15.2 Bacterias Comensales como Vehículos para Vacunas contra el VIH.

La ventaja de las bacterias comensales como vectores para vacunas radica en que constituyen la flora normal en mucosas. Principalmente se considera a las bacterias ácido lácticas, específicamente a las del género de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, conocidas por sus propiedades prebióticas, inmunoadyuvantes e inmunomoduladoras (Mercenier, A. 1999), baja inmunidad intrínseca (Pouwels *et al.*, 1998) y que algunas especies no colonizan las superficies de la mucosa, estas características 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 (Pouwels *et al.*, 1996). Otro aspecto importante, es la característica que presentan las bacterias ácido lácticas, al tener la capacidad de inducir memoria inmunológica (Gerritse *et al.*, 1990).

Lactobacillus

Es una de las primeras bacterias comensales descrita para inducir una respuesta inmune sistémica y en mucosas contra antígenos liberados. La habilidad de *Lactobacillus* para colonizar la superficie de las mucosas, indica que presenta un gran potencial en la estrategia del desarrollo de vacunas con vectores vivos recombinantes para la liberación de antígenos. El uso de *Lactobacillus* como sistema de expresión de proteínas virales contra el VIH, también se encuentra ampliamente desarrollado.

Un ejemplo del uso de estos vectores es la fusión de la expresión de antígenos de *Chlamydia psittaci* y VIH en la superficie de *Lactobacillus fermentum* (Turner and Giffard, 1999). La cepa vaginal de *Lactobacillus*, *L. jensenii*, fue utilizada para la expresión de Cyanovirin-N, aislado de cyanobacterium *Nostoc ellipsosporum*, el cual es un inhibidor del VIH, y éste fue capaz de inhibir la infectividad del VIH CCR5 *in vitro* en un 50%, así como también bloquear la transmisión vaginal en un modelo de primates no humano (Liu *et al.*, 2006). Esta misma cepa, también se utilizó para secretar dos dominios funcionales CD4, los cuales se unen a la gp120 del VIH e inhiben la entrada del virus a la célula, con resultados prometedores, sin embargo el efecto es dependiente de dosis (Chang *et al.*, 2003).

Lactococcus

El género *Lactococcus* se identifica como seguro, efectivo, no invasivo y no-patogénico en el desarrollo de vacunas por su habilidad de presentar proteínas heterólogas en superficie, además presenta la enorme ventaja de ser ampliamente utilizado en la industria alimenticia de productos fermentados, otra característica a favor es que se logró secuenciar su genoma completo. En particular se obtienen resultados muy satisfactorios con *Lactococcus lactis* (Robinson, 1997), debido a que la bacteria no coloniza la superficie de la mucosa. *L. lactis* se utiliza ampliamente como un sistema de liberación de antígenos para vacunas en mucosas, ya que la inoculación en mucosas de la cepa recombinante resulta en una respuesta de anticuerpos en suero y producción de IgA en la mucosa (Norton *et al.*, 1995).

Por lo que, *Lactococcus* es uno de los principales géneros utilizados como vectores en la expresión de proteínas bacterianas, virales, parásitos, hormonas, enzimas, etc. Incluso se utiliza a *Lactococcus* en el desarrollo de vacunas de ADN contra el VIH, mediante la expresión de la proteína gp120 (Gram *et al.*, 2007). También se utiliza para la expresión de la región V2-V4 de la proteína de envoltura del VIH, donde los ratones inmunizados oralmente presentaron una buena inducción de respuesta inmune específica (Xin *et al.*, 2003). En otro estudio, *L. lactis* fue modificado genéticamente para expresar en su superficie la proteína completa de envoltura del VIH (gp120), esta estrategia resultó ser efectiva en la inducción de inmunidad humoral y celular, local y sistémica contra el VIH, además de determinar que no induce ningún daño a nivel histológico (Luna *et al.*, 2003).

Las vacunas en mucosas por vectores lácticos recombinantes son aparentemente seguras y efectivas, debido a que inducen una buena respuesta humoral (Mercenier, 1999) y celular, así como la expresión de citocinas pro inflamatorias (Th1), TNF- α , IL-1 e IL-2 (Maassen *et al.*, 2000). 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.

4.16 Expresión de Proteínas Heterólogas en Bacterias Lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se utilizan ampliamente en la industria alimenticia, por su capacidad de fermentar azúcares principalmente en ácido láctico y en la producción de alimentos fermentados como queso y yogurt. Sin embargo, algunas BAL se explotan como productores de: enzimas (Straus and Gotz, 1996), antígenos heterólogos (Samuelson *et al.*, 1995), inmunoglobulinas (Gunneriusson *et al.*, 1996), péptidos con actividad antimicrobiana, interleucinas, proteínas terapéuticas, prebióticos y metabolitos que contribuyen a saborizantes.

Estos vectores se utilizan para sobre expresar proteínas heterólogas, secretadas, intracelulares o ancladas a la pared celular (Piard *et al.*, 1997). Entre las cuales se encuentran las de interés terapéutico como antígenos de bacterias (Buccato *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2008; Groot *et al.*, 2008), antígenos virales (Enouf *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006; Yigang and Yijing, 2008), hongos (Freitas *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2008), protozoarios (Turner, 1999), toxinas (Sun *et al.*, 2009; Grangette *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2000; Vajdy y Lycke, 1992), citocinas (Steidler *et al.*, 1995, 1998; Zhuang *et al.*, 2008), alergenicos (Chatel *et al.*, 2003; Hazebrouck *et al.*, 2006), VLP (Aires *et al.*, 2006), anticuerpos (Gunneriusson *et al.*, 1996; Monedero *et al.*, 2004), enzimas (Bruno *et al.*, 2004; Gaeng *et al.*, 2000; Van De Guchte *et al.*, 1990; Hanniffy *et al.*, 2009, Wegmann *et al.*, 1999; liu *et al.*, 2005; de LeBlanc *et al.*, 2008), genes de sabor de plantas (Hernández *et al.*, 2007), bacteriocinas (Martínez *et al.*, 2000; Kawai *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2008), azúcares (Werning *et al.*, 2008; Gaspar *et al.*, 2004), vitaminas (Burgess *et al.*, 2004), hormonas (Sousa *et al.*, 2008) y virucidas (Pusch *et al.*, 2005). Incluso se realizó estudios de fase I en pacientes con enfermedad de Chron, tratados con *Lactococcus* genéticamente modificado para la expresión de la IL-10 con muy buenos resultados (Braat *et al.*, 2006).

4.16.1 *Lactococcus* en el Desarrollo de Vacunas.

Una aplicación recientemente descubierta de *Lactococcus lactis* es su utilización como vectores en el desarrollo de vacunas. La bacteria se modifica genéticamente para producir proteínas de especies patógenas en su superficie celular. La inoculación oral o intra nasal de un animal con la cepa modificada provocará una respuesta inmune a la proteína clonada y proporcionará inmunidad al patógeno. Por ejemplo, si se desea proporcionar inmunidad al *Streptococcus pyogenes*, el agente causante de la faringitis estreptocócica, *Lactococcus* podría ser manipulada para presentar la parte conservada de la proteína M estreptocócica necesaria para la adherencia y la colonización por estreptococos en la mucosa nasofaríngea. El resultado de la respuesta inmune local podría proteger al individuo de la faringitis estreptocócica causada por el estreptococo.

Este enfoque, teóricamente, puede ser adaptado a cualquier agente patógeno que coloniza y/o entra a través de una superficie de la mucosa en los seres humanos o animales. Esto incluye a los patógenos humanos, tales como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis* y *Neisseria meningitidis*, VPH, VIH, entre otros.

La utilización de *Lactococcus lactis* como vehículo de entrega en la mucosa nasal de formulaciones de diferentes antígenos, muestra resultados prometedores en la inducción de respuesta inmune para combatir a los patógenos en el sitio de la infección. *Lactococcus lactis* es eficiente en la presentación de antígenos que estimulan la inmunidad de la mucosa a los agentes patógenos no respiratorios, como el VIH mediante la administración de *L. lactis* recombinante que expresa una porción de la proteína env del VIH en su superficie celular (Xin KQ *et al.*, 2003), el virus del papiloma humano y el parásito de la malaria.

El género *Lactococcus*, al igual que *Lactobacillus* se utiliza como vector para la expresión en su superficie de proteínas heterólogas de diversos antígenos como los derivados de *Chlamydia psittaci* (Turner and Giffard, 1999), de patógenos como ántrax, con una administración segura (Zegers *et al.*, 1999), en la producción de citocinas como IL-2 o IL-6 (Steidler *et al.*, 1998), IL-10 (Steidler *et al.*, 2000), en la expresión de la toxina del tétanos (Grangette *et al.*, 2001), y la toxina diftérica (Fromen *et al.*, 1999).

También se demostró su función en el tracto gastrointestinal como inactivador de la carcinogénesis y prevención de daño al ADN en colon de ratas (Wolowski *et al.*, 1999), así como el efecto antitumoral en cáncer superficial de vejiga (Aso *et al.*, 1992), y en la reducción del riesgo de infección por VIH en mucosa vaginal (Van de Wijgert *et al.*, 1996). Específicamente las proteínas expresadas para combatir el VIH, y la utilización de este vector, fueron descritas en la sección de bacterias comensales como vectores en el desarrollo de vacunas contra el VIH. En la Tabla 2 se muestran las diferentes proteínas heterólogas expresadas eficientemente en el género *Lactococcus*.

Tabla 2. Proteínas heterólogas expresadas en *Lactococcus lactis*

Proteínas bacterianas	Subunidad B de <i>Helicobacter pylori</i>	Lee <i>et al.</i> , 2001
	L7/L12 de <i>Brucella abortus</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2002
	Pili de <i>Streptococcus</i> Grupo B	Buccato <i>et al.</i> , 2006
	Proteína de shock térmico GroEL de <i>B. abortus</i>	Miyoshi <i>et al.</i> , 2006
	Polisacárido Pneumococcal	Nierop <i>et al.</i> , 2008
	Proteína A Pneumococcal	Medina <i>et al.</i> , 2008
Proteínas virales	Proteína VP8 de Rotavirus	Gil <i>et al.</i> , 2006
	Proteína no estructural NSP4 de Rotavirus	Enouf <i>et al.</i> , 2001
	E7 de papiloma virus	Bermúdez <i>et al.</i> , 2004
	L1 de papiloma virus	Cortes <i>et al.</i> , 2009
Proteínas fúngicas	proteína 1 antifúngica de <i>Streptomyces tendae</i>	Freitas1 <i>et al.</i> , 2005
Toxinas	Fragmento C de la Toxina tetánica	Norton <i>et al.</i> , 1997
	Fragmento C de la Toxina tetánica	Robinson, 1997
	Ribotoxina fúngica	Álvarez <i>et al.</i> , 2008
Citocinas	IL-2	Steidler <i>et al.</i> , 1995
	IL-2 e IL-6	Steidler <i>et al.</i> , 1998
	IL-12	Bermúdez <i>et al.</i> , 2003
	Interferón omega	Bermúdez <i>et al.</i> , 2003
	Interferón- <i>b</i> 1b	Zhuang <i>et al.</i> , 2008
	IP-10	Villatoro <i>et al.</i> , 2008
Alergenos	Beta-Lacto globulina	Chatel <i>et al.</i> , 2001
Enzimas	Peptidasa de <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Wegmann <i>et al.</i> , 1999
	Proteasa de <i>Bacillus subtilis</i>	Van De Guchte <i>et al.</i> , 1990
	Enzimas líticas de <i>Listeria monocytogenes</i>	Gaeng <i>et al.</i> , 2000
	Catalasa	de LeBlanc <i>et al.</i> , 2008
	Liasa-gamma Metionina de <i>Brevibacterium linens</i>	Hanniffy <i>et al.</i> , 2009
Bacteriocinas	Enterocina A y Pediocina PA-1	Martínez <i>et al.</i> , 2000
	Divercin RV41	Bermúdez <i>et al.</i> , 2007
Vitaminas	Riboflavina	Burgess <i>et al.</i> , 2004
Genes de plantas	Genes de sabor de plantas	Hernández <i>et al.</i> , 2007

4.17 Regulación por Nisina de la Expresión de Proteínas Heterólogas en Bacterias Lácticas.

El futuro desarrollo científico e industrial de las BAL en la producción de componentes deseados, es la modulación de la expresión de nuevos genes y la apropiada liberación del producto génico en productos alimenticios o en el tracto gastrointestinal. Para este propósito una variedad de sistemas de expresión génica inducibles o controlados por azúcares, nisinas, dependientes de temperaturas, de pH, así como sistemas de proteínas blancos, y sistemas de expresión constitutiva se encuentran en desarrollo (Willem, 1992).

Un nuevo, versátil y controlado sistema de expresión de genes, basado en el mecanismo de autorregulación de la bacteriocina nisina, fue desarrollado hace diez años, el sistema de expresión de genes por nisina llamado NICE, se convirtió en uno de los más exitosos y ampliamente utilizados en bacterias Gram positivas.

La nisina es un péptido antimicrobiano de 34 aminoácidos o lantibiótico con algunos aminoácidos inusuales y 5 estructuras de anillos (Fig. 9). En el mecanismo general de acción de la nisina, ésta primero se une a los lípidos de la pared celular y forma pequeños poros en la membrana citoplasmática que lleva a la pérdida de pequeñas moléculas, incluyendo ATP y subsecuentemente lleva a la muerte celular (Hasper *et al.*, 2004).

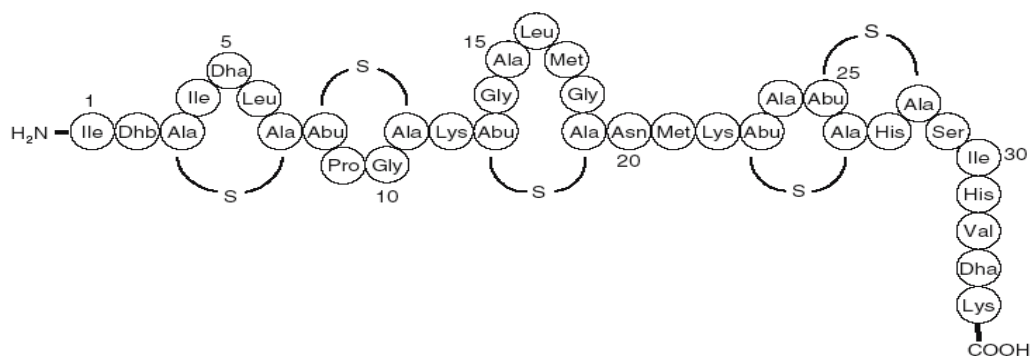


Fig. 9. Representación esquemática de la Nisina. Dhb indica dehidrobutireno, Dha,dehidroalanina, Ala-S-Ala, lantionina, y Abu-S-Ala, B-metilntonina.

La nisina se sintetiza ribosomalmente como un precursor, subsecuentemente se introducen las modificaciones inusuales químicas y estructurales de la molécula. Después, la molécula se transloca a través de la membrana citoplasmática y procesada en una proteína madura (Kleerebezem *et al.*, 1997). La biosíntesis de la nisina se codifica por un cluster de 11 genes de los cuales el primer gen *nisA*, es el que codifica el precursor de la nisina. Los otros genes dirigen la síntesis de la proteínas que se implican en la modificación, translocación y procesamiento de la nisina (*nis B*, *nis C*, *nis P* y *nis T*); en la inmunidad contra nisina (*nis I*, *nis F*, *nis E* y *nis G*); y en la regulación de la expresión de la nisina (*nis R* y *nis K*) (Kuipers *et al.*, 1995; kleerebezem *et al.*, 1999). *Nis R* y *Nis K* pertenecen a la familia de dos componentes de sistemas de transducción de señales. *Nis K* es una cinasa protein-histidina que reside en la membrana citoplasmática y se propuso que actúa como un receptor de la molécula de nisina madura. Bajo la unión de la nisina a *Nis k*, se autofosforila y transfiere un grupo fosfato a *Nis R*, el cual es un regulador de la respuesta que se activa con la fosforilación por *Nis K*. Activado *NisR*, induce la transcripción de dos de los tres promotores en el gen de la nisina.

Para la explotación del mecanismo de autoinducción de la expresión de nisina, los genes de la señal del sistema de transducción *nis K* y *nis R* fueron aislados del gen de nisina y fueron insertados en el cromosoma de *L. lactis* cremoris MG1363, creando la cepa NZ9000 (Kuipers *et al.*, 1998). Cuando un gen de interés se coloca subsecuentemente en seguida del promotor *PnisA* en un plásmido o en el cromosoma, la expresión del gen puede ser inducida por la adición de cantidades sub-inhedorias de nisina (0.1-5ng/mL) al medio de cultivo. La presencia o ausencia de las señales correspondientes, determina la expresión de la proteína en el citoplasma, en la membrana o secretada al medio (Fig. 10).

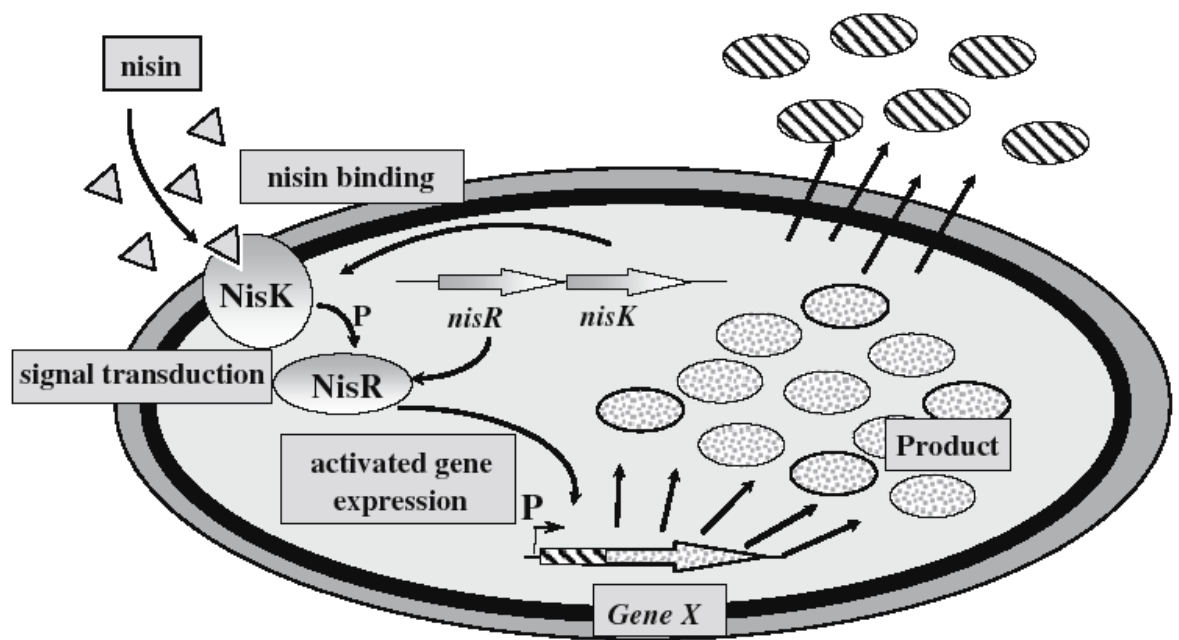


Fig. 10. Sistema de expresión de genes controlados por Nisina.

El sistema NICE se utiliza para expresar genes de bacterias Gram positivas, Gram negativas, genes eucarióticos, etc. Específicamente se utiliza para expresar enzimas empleadas en la industria alimenticia, en procesos de ingeniería metabólica, como la conversión de piruvato en varios productos finales alternativos (Hols *et al.*, 1999), en la producción de exopolisacáridos (Boels *et al.*, 2001) y en la expresión y estudio de proteínas integrales de la membrana de procariotas y eucariotas (Kunji *et al.*, 2003).

L. lactis en combinación con el sistema de expresión NICE, tiene un número de propiedades que lo hace un interesante hospedero para nuevas aplicaciones, el uso de este sistema determina la expresión correcta, funcional y localizada de proteínas de la membrana, lo que permite la expresión de receptores relevantes en la industria farmacéutica y la búsqueda de nuevas drogas terapéuticas. Otra cualidad es que también permite la expresión de genes con productos génicos potencialmente tóxicos. Finalmente, se demostró que la inducción de nisina, también opera a grandes escalas, como se demostró recientemente con la producción de lisostapina por Mierau and Kleerebezem (2005).

5. METODOS

5.1 Construcción de los Plásmidos Recombinantes.

5.1.1 Diseño de Oligonucleótidos.

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, uno para amplificar el gen que codifica para el asa V3 de la gp 120 del VIH-1, y otro para el gen que codifica para la subunidad A₂B de la toxina del cólera, en base a la secuencia de dichos genes depositados en el Gene Bank (K03455 y X76390) respectivamente. A cada nucleótido se le añadió un sitio de reconocimiento para las enzimas Nsi I en el extremo 5' y Eco RV en el extremo 3' para facilitar su clonación.

V3 1. GCG ATG CA TCC TGT ACA AGA CCC AAC

V3 2. GCC GAT ATC CCA CA ATG TGC TTG TCT

A₂B 1. CCG ATG CAT CC AGT AAT ACT TGC GAT

A₂B 2. CGG GAT ATC CC ATT TGC CAT ACT

5.1.2 Amplificación de los Genes por PCR.

Para la amplificación de los genes del asa V3 y la subunidad A₂B, se tomó como templado ADN del plásmido pSFV-1, el cual contiene las secuencias de HXB2R del VIH subtipo B. Donado amablemente por el Dr. Bernard Verrier del instituto Unite Mixte CNRS-Biomerieux (Francia), el cual se aisló y caracterizó por digestión enzimática con el sitio Bam HI a ambos lados del gen de la gp 120. El gen de la subunidad A₂B de la toxina del cólera se amplificó de una muestra de ADN de *Vibrio Cholera* cepa El Tor, proporcionada por el departamento de microbiología de la UANL. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Reacción de Amplificación de los genes V3 y A₂B por PCR

Reactivo (Promega)	Cantidad (Volumen)
Buffer de Amplificación 10X	5 µL
MgCl ₂ 50 mM	1.5µL
dNTPs mix 10 mM	1µL
Oligonucleotido1 10mM	1µL
Oligonucleótido 2 10mM	1µL
Templado	1µL
Taq Polimerasa 5u/µL	0.5µL
H ₂ O _{pcr}	39µL

Para la estandarización de la reacción de amplificación se realizó un gradiente de temperaturas de 60°C a 66°C para el asa V3 y de 60°C a 64°C para la subunidad A₂B en un Hybrid Cycler Gradient 40 (Stratagene) a la siguientes condiciones (Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones para la Amplificación de los genes V3 y A₂B por PCR

	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	94	2
Desnaturalización	94	1
Alineamiento	60-64 o 66	1
Extensión	72	2
Repetir el paso 2		35 ciclos
Extensión final	72	5

5.1.3 Clonación de los Genes en el Vector p GEM-T easy.

Los productos obtenidos por PCR se corrieron en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich) al 1% en buffer TAE 1X (40 mM Tris acetato y 1 mM EDTA pH 8.0). Se tomó en cuenta la temperatura a la cual amplificaron los oligonucleótidos, para realizar un segundo PCR para cada gen, y se corrieron en gel de agarosa a las mismas condiciones para comprobar su amplificación.

Posteriormente se cuantificó el ADN obtenido y se realizó una reacción de ligación con 100 ng del producto de PCR, 50 ng del vector pGEM-T (Promega) y 5 μ L del buffer rápido de ligación, en presencia de 4 unidades/ μ L de T4 ADN ligasa. La reacción se incubó por toda la noche a 4°C y ésta se utilizó para la transformación de células DH5 α de *Escherichia coli* calcio competentes, por medio de un choque térmico de 42°C por un minuto y pasándolas inmediatamente a 4°C y se incubó por 30 minutos en presencia de 500 μ L 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 μ L de dicha transformación se creció en placas de agar LB con 100 mg/mL de ampicilina, 0.5 mM de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido, Sigma-Aldrich) y 80 μ g /mL de X-Gal, se incubó por 24 horas y se seleccionaron las colonias blancas que contenían nuestro vector con el gen insertado del asa V3 o del gen A₂B (pGEM-T V3, pGEM-T A₂B), dichas colonias fueron caracterizadas por medio de una determinación rápida, a un pellet de un mililitro de bacteria, se adicionaron 50 μ l de una solución de 6% de sucrosa y 0,2% azul de bromofenol, más una cantidad igual de fenol, se mezcló homogéneamente y finalmente se centrifugó el preparado. Se corrió un gel de agarosa al 1% para ver si las clonas efectivamente presentan el plásmido con el inserto deseado. Posteriormente a estas clonas seleccionadas se les realizó una purificación del plásmido (mini-prep) según Sambroock and Russell, 2001, seguido de la caracterización por digestión enzimática con Nsi I y Spe I que liberan el gen correspondiente.

5.1.4 Subclonación de los Genes V3, A₂B y su Fusión en el Vector pSEC:NUC.

Por último para la construcción de nuestros vectores recombinantes, que expresen el asa V3 del VIH y la subunidad A₂B de la toxina del cólera, se purificaron los fragmentos liberados por digestión con Nsi I y Spe I con un sistema QIAEX II (Qiagen) y se sub-clonaron en el plásmido pSEC:Nuc (Obtenido del Dr. Langella, INRA, Francia) el cual posee el promotor de Nisina y la señal para la secreción de proteínas en *Lactococcus* para generar los plásmidos pSEC:V3 y pSEC:A₂B.

Para la generación del vector pSEC:V3A₂B, se liberó el fragmento del asa V3 del pGEM-T easy por digestión enzimática con Nsi I y este fragmento fue ligado en el extremo 5' del vector existente pSEC:A₂B, el vector con la fusión de las proteínas, a su vez fue digerido con Not I para insertar otra asa V3, previamente digerida y purificada del vector pGEM-T easy, para generar el cuarto vector pSEC:V3V3A₂B.

5.2 Transformación de *Lactococcus lactis* con los Plásmidos Recombinantes.

5.2.1 Preparación de las Células Electrocompetentes de *L. lactis*.

Se crecieron 200 mL de la cepa de *L. lactis* (NZ9000), la cual es una bacteria sin plásmidos nativos y de bajo nivel de proteasas, en caldo M17 (Difco) en presencia de 0.5M de sacarosa y 2% de glicina y se incubó a 32°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. Se centrifugó a 7500 rpm por 10 minutos a 4°C para obtener el pellet y se resuspendió en 30 mL de buffer de lavado frío (0.5 M sacarosa y glicerol al 10%), posteriormente se centrifugó por 10 min. a 7500 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. Finalmente las células se resuspendieron en una solución fría de polietilenglicol 3000 (Fluka) al 30% con 10% de glicerol, se realizaron alícuotas y se congelaron inmediatamente a -70 °C hasta su uso.

5.2.2 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), se colocó 50 µL de células competentes y 10 µL del plásmido pSEC con los genes V3, A₂B, V3A₂B o V3V3A₂B, en una cuveta de electroporación (4 mm, BTX) a las siguientes condiciones: pulso de 2500 Volts, 200 oms, p.lenght 10 µs y 25 µf. Esta preparación se incubó en presencia de caldo M17 con 0.5 M de sacarosa por 1 hora a 37 °C y posteriormente se plaquearon 100 µL de ésta, en agar M17 (Difco), y 5 µg/mL de cloranfenicol (Ambresco). Las clonas transformadas fueron checadas por resistencia a cloranfenicol y por PCR en colonia, en el cual se pica una colonia y se resuspende en 50 µL de H₂O_{pcr}, se colocó en ebullición por 5 minutos y se tomó una alícuota para realizar el PCR. Finalmente las clonas positivas, fueron analizadas por secuenciación.

5.3 Detección de la Expresión de las Proteínas Recombinantes en *L. Lactis* por Western Blot.

Para determinar si el *Lactococcus* expresa las proteínas recombinantes V3, A₂B o sus fusiones, las colonias seleccionadas anteriormente se crecieron a 37 °C sin agitación, en 2 mL de caldo M17, a una densidad de 0,6 nm y se indujeron con 10 ng/mL de nisina, después de 2 horas se centrifugaron a 7500 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se pasó a través de un filtro corning 0,2 mm, se recuperó 1.4 mL, a los cuales se les adicionó 100 µl de TCA al 100% (ácido tricloroacético, Sigma-Aldrich), 10 µl de PMSF 10mM (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma-Aldrich) y 10 µl de DTT (Dithiothreitol, ICN), se incubó por 15 min en hielo y se centrifugó a 14,000 rpm, 10 min. a 4 °C. Finalmente la pastilla se resuspendió en 50 µl de NaOH 50mM frío y 50 µl del buffer de muestra (50 mM Tris-HCL pH 6.8, 100 mM de DTT, 100mM de PMSF, 2% de SDS (dodecil sulfato de sodio), 0.1% de azul de bromo fenol y 10% de glicerol, Sigma-Aldrich).

Por otro lado, el paquete bacteriano se resuspendió en 30 µl de buffer TES (25 % glucosa, 50 mM de tris, 1 mM de EDTA pH 8 y 10mg/mL lisozima), se incubó por 20 min. a 37°C y se le adicionó 20 µl de SDS al 10%, se mezcló homogéneamente y finalmente se adicionó 50 µl del buffer de muestra. Las muestras con las proteínas de los sobrenadantes y los pellets, se calentaron por 10 minutos a ebullición, y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 15%, posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por una y media horas en una cámara (Bio-Rad) a 120 miliampers. La transferencia se verificó con rojo ponceau al 1% y se lavó con TBS (Tris-HCL 0.2M, NaCl 1.37M, pH 7.6) al 1% hasta eliminar el exceso de colorante. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% y tween al 0.5% en TBS a temperatura ambiente por 45 minutos, y posteriormente se realizaron 3 lavados con TBS-Tween al 0.5% de 15 minutos cada uno, posterior a ésto, el anticuerpo primario IgG anti-V3 monoclonal de ratón (ImmunoDx), 1:1000, o IgG anti-A₂B monoclonal de ratón (Serotek) 1:2000, se incubó por toda la noche a 4°C, seguido de tres lavados de TBS-Tween 0.5% para la adición de un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa 1:2500.

Este anticuerpo se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, se lavó la membrana 3 veces como se mencionó anteriormente y se reveló por quimioluminiscencia, mediante la adición de 3 mL del sustrato peroxidasa, luminol 1:1 (Pierce Súper Signal). Después de 5 minutos se colocó la membrana en una película plástica, exponiéndola con un film para quimioluminiscencia (Kodak) por 1-5 minutos en un cassette para auto radiografía.

Se reveló el film colocándolo 1 minuto en una solución reveladora (Kodak), se enjuagó en agua y se colocó por un minuto en solución fijadora (Kodak), al final del proceso, se enjuagó en agua y se dejó secar el film.

5.4 Grupos Experimentales.

Se realizaron los siguientes experimentos en 14 grupos (5 ratones por grupo) de ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad por unidad experimental:

a) Siete grupos de ratones se inmunizaron por vía oral por medio de una sonda pediátrica con una sola dosis de 10^9 *Lactococcus* recombinantes vivos que expresan la proteína V3, A₂B, la mezcla de éstas (V3 y A₂B), y sus fusiones V3A₂B, V3V3A₂B. Ratones con la misma dosis de *Lactococcus* NZ9000 se inmunizaron como control interno y otro grupo de ratones se inmunizó con PBS como segundo control.

b) Siete grupos de ratones se inmunizaron por vía genital con una sola dosis de 10^9 *Lactococcus* recombinantes vivos que expresan la proteína V3, A₂B, la mezcla de éstas (V3 y A₂B), y sus fusiones V3A₂B, V3V3A₂B. Ratones con la misma dosis de *Lactococcus* NZ9000 se inmunizaron como control interno y otro grupo de ratones se inmunizó con PBS como segundo control.

5.5 Obtención de Muestras.

Se analizó la respuesta inmune de los animales inmunizados con *Lactococcus* recombinantes y no recombinantes a los 10 días después de la inmunización. Muestras de suero, y lavados intestinales, se analizaron para la determinación de la respuesta humoral mediante la detección de anticuerpos específicos contra el VIH, también se obtuvieron linfocitos de sangre periférica (PBMC) y de bazo para el análisis de la respuesta celular, mediante la detección de citocinas inducidas por las bacterias recombinantes. Así como tejido intestinal y vaginal para la extracción de ARN y la detección de inducción de interleucinas, mediante PCR multiplex.

5.5.1 Suero.

Se obtuvieron 200 μ L de sangre del ratón por punción retro-orbital, se colocó en un tubo Eppendorf a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo, posteriormente se centrifugó la muestra a 2000 rpm por 5 minutos, y se separó el suero, almacenándolo a -70°C hasta su uso.

5.5.2 Aislamiento de Linfocitos de Sangre Periférica.

De los ratones inmunizados, se obtuvo sangre con anticoagulante, mediante punción cardíaca y se colocó en tubo cónico de 15 mL, se adicionó un volumen igual de Ficoll-Hypaque a una densidad de 1.077 (Sigma-Aldrich), se centrifugó cuidadosamente la muestra a 2000 rpm por 10 minutos para la formación del gradiente. Posteriormente se colectó la interfase correspondiente a los polimorfonucleares y se realizó un conteo de viabilidad celular con azul tripan (Sigma-Aldrich), las células se ajustaron a 1×10^6 para su cultivo.

5.5.3 Lavados de Mucosa Intestinal.

En una caja petri se colocó el intestino delgado, con ayuda de unas pinzas de disección, se tomó una punta de éste y se realizó tres lavados intra órganos con 2 mL de TBS y 0.2 mM de PMSF. Se colectó la solución y se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C . Se colectó el sobrenadante y se almacenó a -4°C hasta su uso.

5.5.4 Tejido Intestinal.

Después de la obtención del lavado intestinal, éste se corta en pequeños trozos, y se procesó para la obtención de ARN mediante la utilización del kit minipurelink (Invitrogen).

5.5.5 Células de Bazo.

El bazo de los ratones inmunizados se disectó y se le agregó aproximadamente 2 mL de medio de cultivo RPMI 1640 con 2% de suero fetal bovino, se realizó un corte apical y por perfusión se obtuvo las células. Se colectó el medio y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, posteriormente se resuspendieron las células en 1 mL de medio de cultivo. Se purificó a los linfocitos mediante la utilización del gradiente de Ficol-Hypaque a una densidad de 1.077 (Sigma-Aldrich). Finalmente, se colectó la interfase y se realizó un conteo de viabilidad celular con azul tripan (Sigma-Aldrich) y se ajustó las células a 1×10^6 para su cultivo.

5.6 Inducción de Inmunidad Humoral y Celular en Mucosas Contra VIH Mediante la Administración Oral o Genital de *L. lactis* Recombinante.

5.6.1 Medición de Anticuerpos Específicos anti-V3 IgG e IgA en Suero y Lavados Intestinales por ELISA.

Para la medición de anticuerpos IgG e IgA específicos contra el VIH, se utilizó una placa de 96 pozos (Nunc), la cual se recubrió con $1\mu\text{g}$ del péptido V3, RIQRGPGRAFVTIGK (Dalton chemical laboratories, Inc.) e incubó toda la noche. Posteriormente el exceso de péptido se eliminó mediante tres lavados con buffer de lavado (TBS-tween 0.5%). Se bloqueó la placa por una hora con BSA al 3% y después de un lavado extensivo, se recubrió la placa con 200 μL de lavado intestinal o suero de los ratones inmunizados por vía oral o por vía genital, a diferentes diluciones, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 y 1:12800 y se incubó toda la noche a 4°C .

Posteriormente se lavó la placa a las mismas condiciones anteriores y se adicionaron 100 μ L del segundo anticuerpo anti-ratón IgG o IgA (Sigma-Aldrich) conjugados con peroxidasa en buffer de carbonatos a pH 9.6, se incubó por 3 horas a 37°C y finalmente después de tres lavados, se adicionó el sustrato ABTS (Sigma-Aldrich) y se incubó por 30 min. a 37°C, para posteriormente leer en un micro lector de ELISA (Synergy HT, BioTek) a 405nm.

5.6.2 Inducción Específica y Cuantificación de IL-2 e INF- γ en Linfocitos de Bazo y PBMC.

Una vez purificadas las células de bazo y los PBMC de los ratones inmunizados con los diferentes tratamientos y de las dos vías de inmunización y las células ajustadas a 1×10^6 , éstas se incubaron en una caja de cultivo (Corning) de 12 pozos con medio RPMI (Invitrogen), posteriormente se sensibilizaron con 10 mg del péptido V3 (RIQRGPGRAFVTIGK). A su vez se sensibilizó células con fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich) a la misma concentración a manera de control positivo. Las cajas de cultivo se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 36 horas y posteriormente se recuperó el sobrenadante para realizar la medición de interleucinas inducidas.

Para la cuantificación de las interleucinas, se utilizó el kit de Preprotech. A una placa de 96 pozos (Nunc, MaxySorp) se le colocó 100 μ l del anticuerpo de captura para la interleucina determinada (IL-2 o INF- γ) a 1 μ g/mL, se selló la placa y se incubó toda la noche a 4°C. Después se retiró el líquido y se lavó 4 veces con 300 μ l de buffer de lavado (TBS-Tween 0.5%). Se bloqueó con BSA en TBS al 1% (Sigma-Aldrich) por 1 hora, y se lavó por aspirado 4 veces más, se le adicionó 100 μ l de la muestra o sobrenadante del cultivo celular inducido, y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 4 veces más por aspiración y se le adicionó 100 μ l del anticuerpo de detección a 0.25 μ g/mL, se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. La placa se lavó 4 veces más y se adicionó el anticuerpo conjugado con avidina-HRP, 1:2000 por 30 minutos. Finalmente se volvió a lavar la placa y se adicionó 100 μ l del sustrato ABTS, para posteriormente leer en un micro lector de ELISA (Synergy HT, BioTek) a 405nm.

5.7 Determinación de la Expresión de Citocinas Th1/Th2 en Mucosa Intestinal y Genital de Ratones Inmunizados con *L. lactis* Recombinantes.

5.7.1 Obtención de ARN y cADN de la Mucosa Intestinal y Genital.

El ARN se aisló de muestras de tejido intestinal o genital de los ratones inmunizados, se llevó a cabo según las especificaciones de manufacturación del kit minipurelink (Invitrogen). Posteriormente se procedió a la cuantificación del mismo y a la obtención de cADN. Se tomó 10 µg de ARN total, en un volumen total de 14.5 µl, complementándolo con agua PCR, a esta reacción se añadió 1 µl de Oligo dT (Promega) y se incubó por 5 min. a 70 °C, se colocó la muestra en hielo y se le adicionó 6 µl de buffer 5X (Promega), 1 µl de inhibidor de ARNasa (Promega), 1 µl de dNTPs 10mM (Promega), 1 µl de MMLV RT (Promega) y 5.5 µl de agua DEPC. Esta reacción se incubó a 37°C por 2 horas, seguida de 95°C por 10 min. para la inactivación de la enzima.

5.7.2 Determinación de la Expresión de Citocinas Th1/Th2 en Mucosas por PCR Multiplex

Para la determinación de interleucinas murinas Th1/Th2 en mucosas, se utilizó un kit comercial (Maxim Biotech) que amplifica el gen GAPDH como control positivo y las interleucinas murinas IL-10, IL-2, IL-4, IL-5, INF-γ, IL-12 e IL-13. Se tomó 2 µl del cADN, 25 µl del Buffer MPCR 2X, 5 µl de primers, 0.5 µl de Taq polimerasa, y se ajustó la reacción a 50 µl con agua PCR. La reacción de PCR se sometió a las condiciones de la Tabla 5. Finalmente la reacción de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.5% a 100 Volts, con un marcador molecular de 100 pb como referencia.

Tabla 5. Condiciones de la reacción de MPCR

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
96	1 min.	2X
64	4 min.	
94	1 min.	35 X
64	4 min.	
70	10 min.	1X

6. RESULTADOS

Debido a la característica de las bacterias lácticas de ser organismos ampliamente utilizados en la industria alimenticia y que pueden colonizar las mucosas, el cual es el sitio principal de entrada de diversos patógenos como el VIH, nuestro objetivo fue desarrollar una vacuna basada en bacterias lácticas comestibles, que expresen al asa V3 de la gp120 en *Lactococcus lactis*, para inducir inmunidad en mucosas contra el VIH. Para este objetivo se construyeron plásmidos recombinantes, que expresan, específicamente el asa V3 sito principal de neutralización, y la subunidad A₂B de la toxina del cólera como adyuvante, así como también se generaron las fusiones de la subunidad A₂B con una o dos asas V3. A continuación se muestran las 4 estrategias esquemáticamente a seguir (Fig. 11).

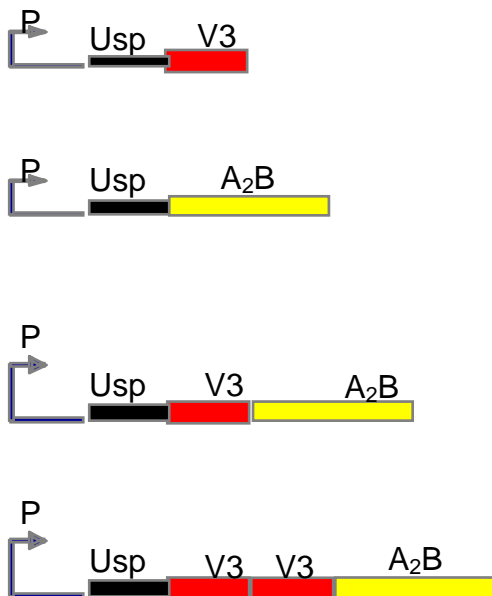


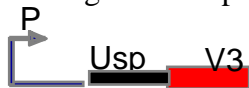
Fig. 11. Estrategias de expresión de las proteínas recombinantes.

6.1 Construcción de los Plásmidos Recombinantes.

6.1.1 Amplificación del Asa V3 de la Proteína gp 120 del VIH y de la Subunidad A₂B de la Toxina del Cólera.

Para la estrategia número 1, se amplificó el asa V3 de la gp 120 del VIH subtipo B, con los oligonucleótidos previamente diseñados. Las condiciones fueron optimizadas mediante un gradiente de temperaturas para amplificar un fragmento de 115 pb correspondientes al asa V3 del VIH. De igual manera para la estrategia número 2, se diseñaron los oligonucleótidos y se logró amplificar el gen de 510 pb que codifica para la subunidad A₂B de la toxina del cólera. Ambos pares de oligonucleótidos se diseñaron adicionando secuencias de restricción Nsi I en el extremo 5' y Eco RV en el extremo 3' (Fig. 12 y 13).

Estrategia 1.- Amplificación del asa V3.



V3 1. GCG ATG CA TCC TGT ACA AGA CCC AAC

Nsi I

V3 2. GCC GAT ATC CCA CA ATG TGC TTG TCT

Eco RV

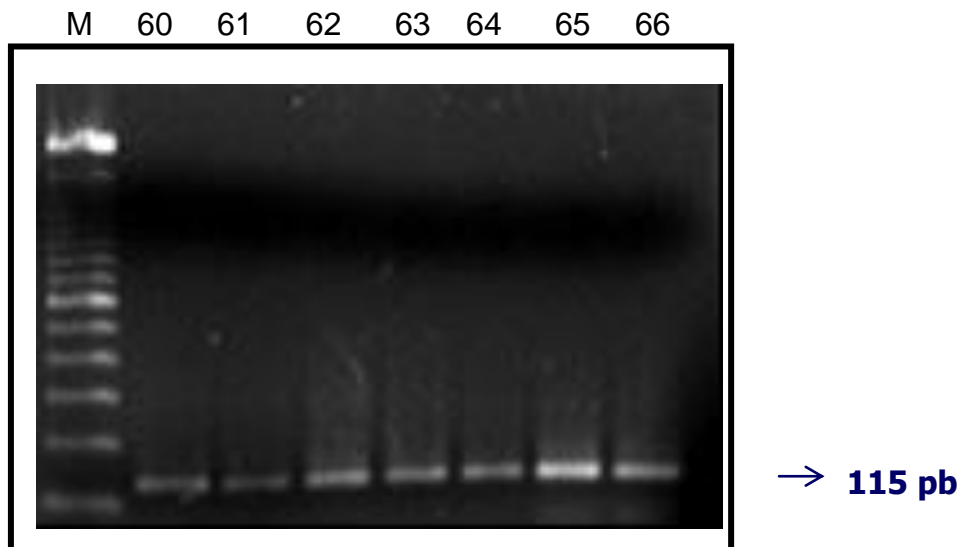


Fig. 12. Gradiente de temperaturas para la amplificación por PCR del asa V3 de la proteína gp 120. M) 100 pb 1-5) Temperaturas de amplificación de 60 a 66 °C respectivamente, en un gel de agarosa al 1%.

Estrategia 2.- Amplificación de la subunidad A₂B.



A₂B 1. CCG ATG CAT CC AGT AAT ACT TGC GAT
Nsi I

A₂B 2. CGG GAT ATC CC ATT TGC CAT ACT
Eco RV

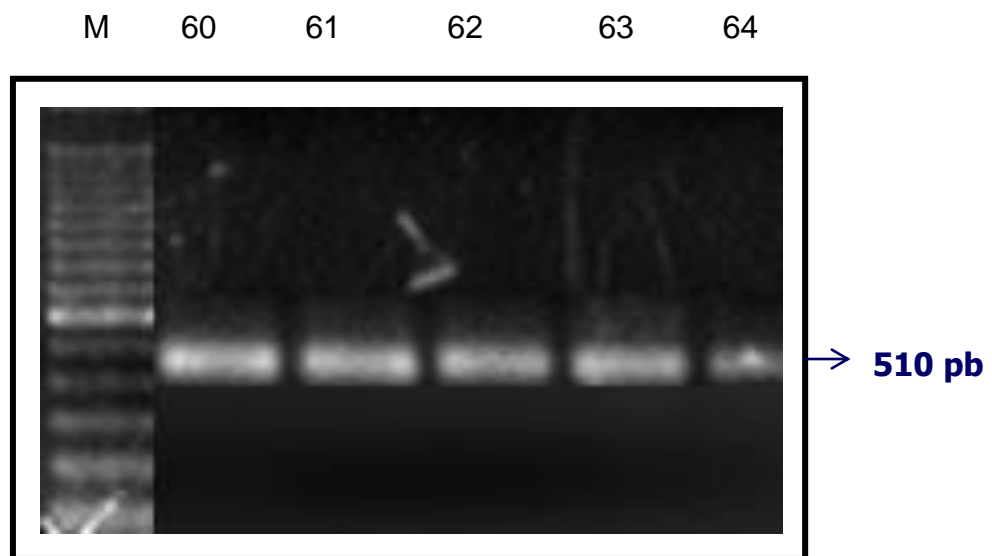


Fig. 13. Gradiente de temperaturas para la amplificación por PCR de la subunidad A₂B de la toxina del cólera. M) 100 pb 1-5) Temperaturas de amplificación de 60 a 64 °C respectivamente, en gel de agarosa al 1%.

6.1.2 Clonación de los Genes del Asa V3 y de la Subunidad A₂B en el Vector pGEM-T.

Posteriormente se utilizó el sistema pGEM-T easy para clonar el producto de PCR, de ambos péptidos. Después de llevar a cabo la reacción de ligación de los fragmentos de 115 pb o 510 pb y el vector, se transformó a *E. Coli* DH5 α , y se seleccionó por resistencia a ampicilina y al sistema X-Gal cinco colonias blancas resultantes de cada una de las transformaciones, para realizar un miniprep rápido, el cual se corrió en gel de agarosa al 1% para analizar los plásmidos que contenían el inserto por diferencia de peso, como se muestra en la Fig. 14. Posteriormente, se seleccionó 3 clonas que mostraron un plásmido de mayor peso respecto al control, y aproximado al peso esperado del vector con el fragmento clonado. Se realizó un midi prep de esas colonias y el plásmido purificado se corrió en un gel de agarosa al 1% (Fig. 15 y 16). Los plásmidos que contenían los genes de interés se cuantificaron y caracterizaron por restricción enzimática con Nsi I y Spe I. Sólo una clona de las analizadas con el plásmido pGEM-T V3 fue positiva o contenía el gen del asa V3, y las dos clonas analizadas y caracterizadas para el gen de la A₂B, liberaron dicho inserto. Estos plásmidos fueron llamados pGEM-T V3 y pGEM-T A₂B (Fig. 17 y 18).

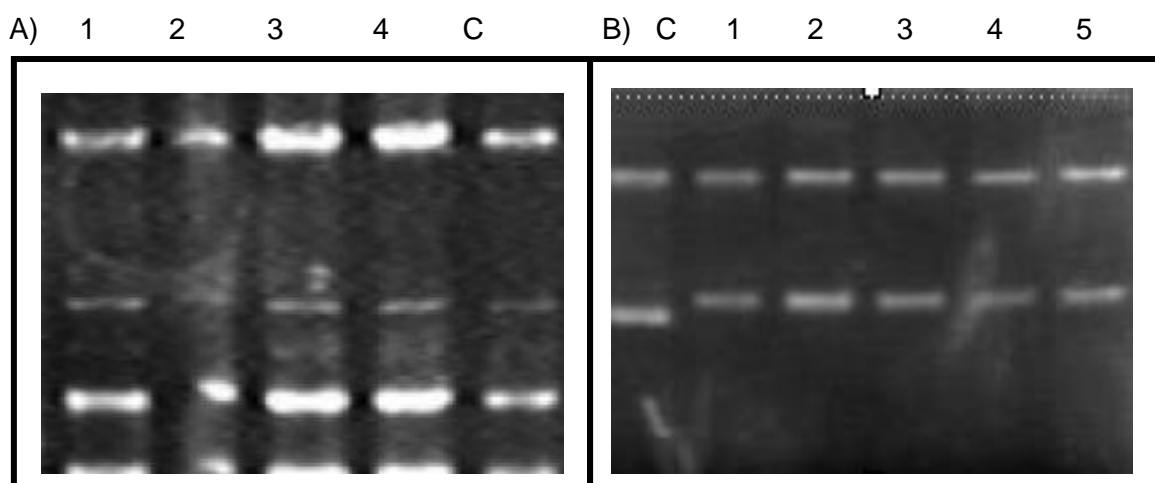


Fig. 14. Mini prep rápido de las colonias obtenidas en la ligación del vector pGEM-T con los genes clonados del asa V3 (A) o de la subunidad A₂B (B). Gel de agarosa al 1% con las clonas analizadas (1- 4), y vector sin inserto(C).

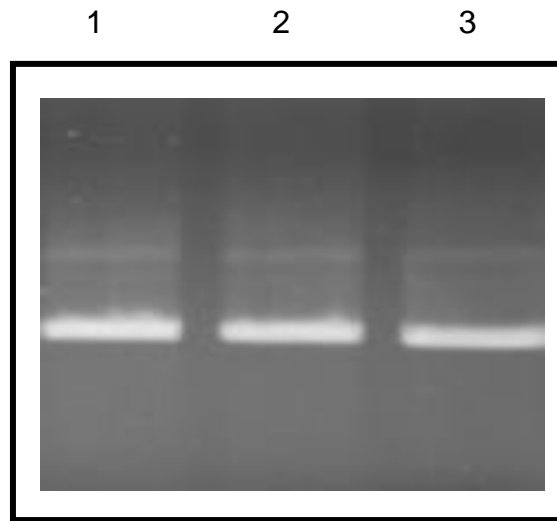


Fig. 15. Purificación del plásmido pGEM-T-V3. ADN plasmidico de tres colonias seleccionadas que contienen el plásmido pGEM-T V3, visualizado en un gel de agarosa al 1%.

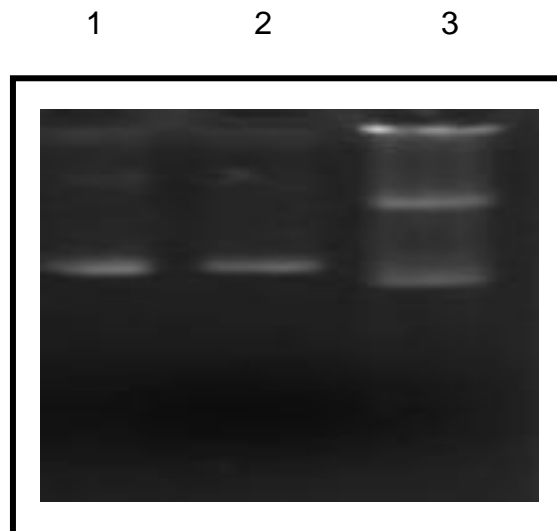


Fig. 16. Purificación del plásmido pGEM-T-A₂B. ADN plasmidico de tres colonias seleccionadas que contienen el plásmido pGEM-T A₂B, visualizado en un gel de agarosa al 1%.

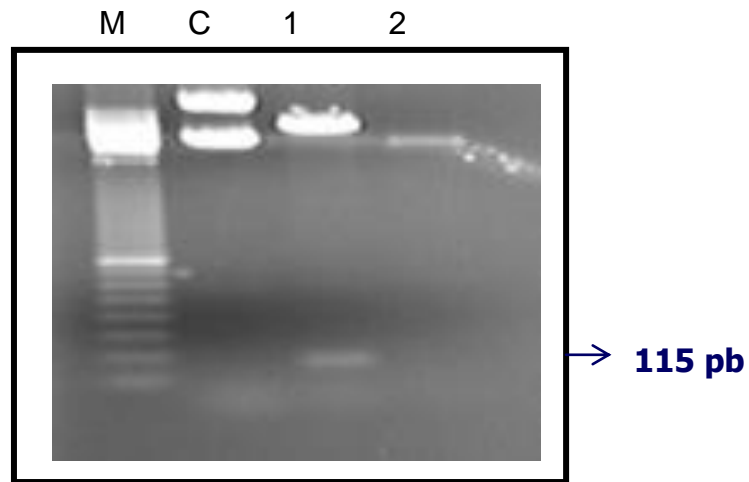


Fig. 17. Caracterización enzimática del plásmido pGEM-T V3. Liberación del inserto V3 con Nsi I y Spe I. M) 100 pb, C) plásmido sin cortar y 1-2) clonas 1 y 2 caracterizadas, visualizados en un gel de agarosa al 1%.

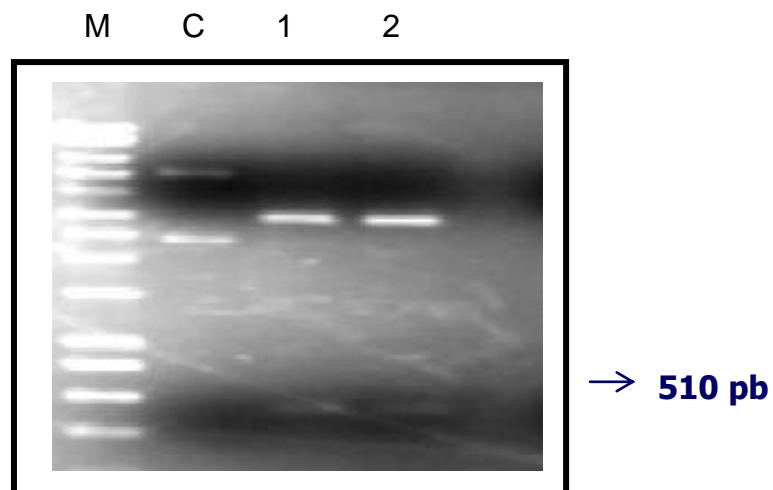


Fig. 18. Caracterización enzimática del plásmido pGEM-T A₂B. Liberación del inserto A₂B con Nsi I y Spe I. M) 1Kb, C) plásmido sin cortar, 1-2) clonas 1 y 2 caracterizadas, visualizados en un gel de agarosa al 1%.

6.2 Subclonación del Gen del Asa V3 del VIH y de la Subunidad A₂B de la Toxina del Cólera en el Vector de Expresión de *Lactococcus lactis*.

Una vez obtenidos los plásmidos pGEM-T V3 y pGEM-T A₂B, los genes del asa V3 y de la subunidad A₂B se liberaron con las enzimas de restricción Nsi I y Spe I y se purificaron con el sistema QIAEX II. Después de cuantificar el ADN obtenido se realizó una reacción de ligación 1:3 con el vector de expresión láctico pSEC, el cual se digirió previamente con las mismas enzimas de restricción. Después de transformar los plásmidos por electroporación en *L. lactis* y de seleccionar las recombinantes, los plásmidos de éstas fueron purificados por mini prep y denominados pSEC:V3 y pSEC:A₂B (Fig. 19). Las clonas resultantes se caracterizaron por digestión enzimática con las mismas enzimas utilizadas para su clonación. En el caso de pSEC:V3 solamente la clona 1, 3 y 4 liberaron el inserto correspondiente a 115 pb, mientras que las cinco colonias analizadas para el vector pSEC:A₂B liberaron el inserto correspondiente a 510 pb (Fig. 20 y 21).

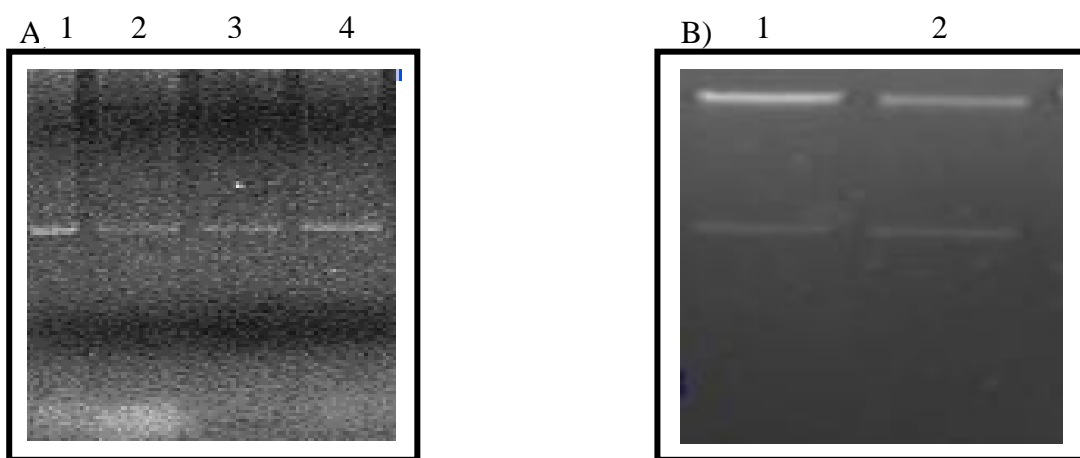


Fig. 19. Purificación de los plásmidos pSEC:V3 y B) pSEC:A₂B. Midiprep de colonias *L. lactis* recombinantes con el plasmido: A) pSEC:V3 y B) pSEC:A₂B.

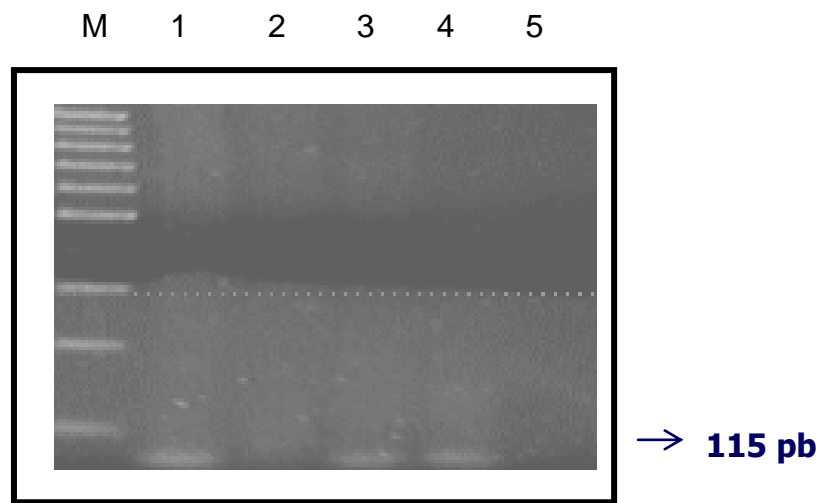


Fig. 20. Caracterización enzimática del plásmido pSEC:V3. Liberación del inserto V3 con Nsi I y Spe I. M) 100pb, y 1-5) clonas caracterizadas.

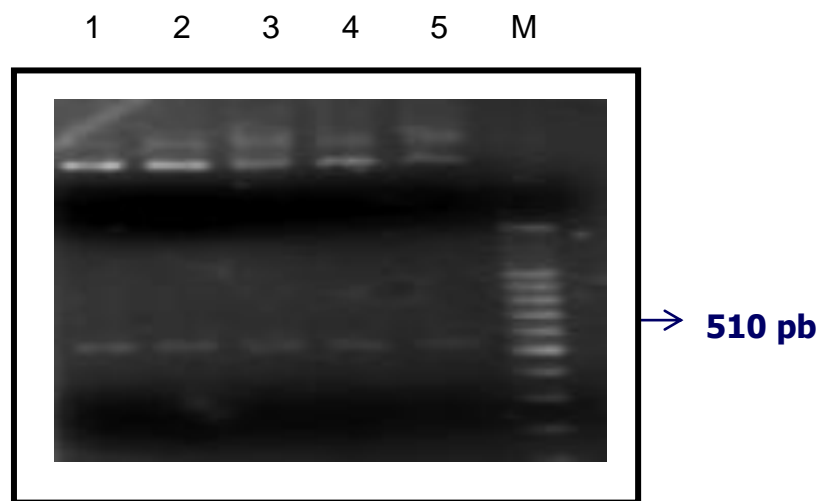
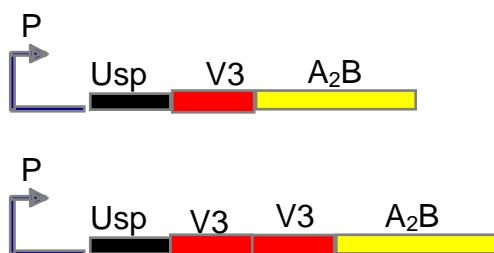


Fig. 21. Caracterización enzimática del plásmido pSEC:A₂B. Liberación del inserto A₂B con Nsi I y Spe I. M) 100 pb, 1-5) clonas caracterizadas.

Estrategia 3 y 4.- Generación de Fusiones V3A₂B y V3V3A₂B.



Para la construcción de las fusiones de las proteínas, se partió del plásmido pSEC:A₂B, el cual se digirió enzimáticamente con Nsi I para introducir o ligar una o dos secuencias V3 en el extremo 5'. Posterior a la ligación, el plásmido se electroporó nuevamente en *L. lactis*. En el caso de la fusión con una sola asa V3 (pSEC:V3A₂B), solamente se logró obtener 3 clonas recombinantes, de las cuales solamente una presentaba plásmido. Esta clona se caracterizó por digestión enzimática, mediante la liberación del fragmento clonado (Fig. 22). De igual manera sólo se obtuvo una clona para la fusión con la doble asa V3 (pSEC:V3V3A₂B), la cual al no poder ser caracterizada por digestión enzimática, ya que fue clonada con las mismas enzimas, se caracterizó por PCR en base a su tamaño (Fig. 23). La secuencia correcta de los plásmidos recombinantes se analizó por secuenciación.

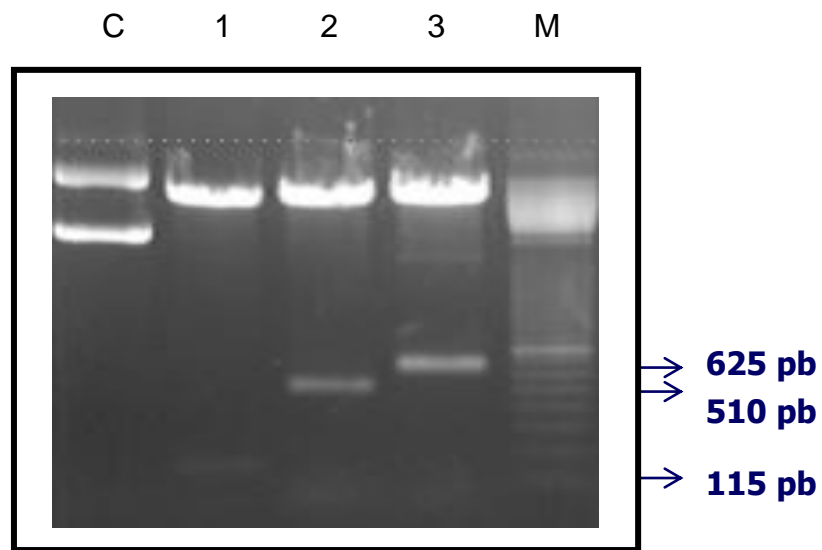


Fig. 22. Caracterización enzimática de los plásmidos pSEC:V3, pSEC:A₂B, y pSEC:V3A₂B. Liberación de los insertos V3 (1), A₂B (2) y V3A₂B (3) respectivamente. M) 100pb, y C) Plásmido sin cortar.

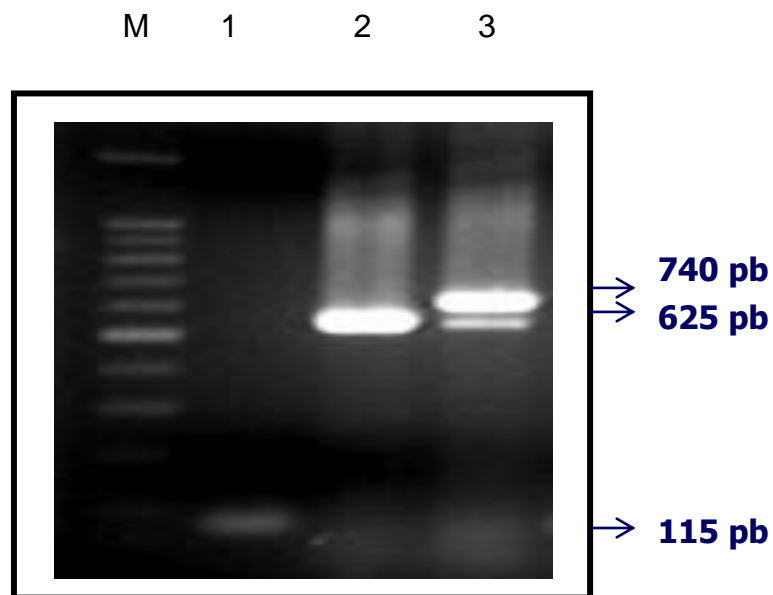


Fig. 23. Caracterización por PCR de las fusiones V3A₂B y V3V3A₂B. Detección de los fragmentos V3 (1), V3A₂B (2) y V3V3A₂B (3), en el vector pSEC en gel de agarosa al 1%. M) 100 pb.

6.3 Detección de la Expresión de las Proteínas Recombinantes en *L. lactis* por Western Blot.

El análisis de la expresión de las proteínas recombinantes, se realizó mediante la técnica de Western Blot. Diferentes clonas de *L. lactis* se crecieron hasta una densidad óptica de 0.6 y dado que dichos plásmidos dirigen la expresión de proteínas bajo el promotor de nisina, las clonas se indujeron con 10 ng de nisina por 2 horas. Las proteínas recombinantes se purificaron del pellet bacteriano y del sobrenadante. También se obtuvo proteína total de pellet y sobrenadante de la cepa *L. lactis* NZ9000, no transformadas con ningún plásmido para usarlas como control. La presencia del péptido V3 en *L. lactis* se determinó mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal IgG anti-V3. El Western Blot mostró la presencia de una sola proteína del tamaño esperado en cuatro clonas de *L. lactis*, correspondiente a los carriles 2, 3, 4 y 5, pero solamente en el pellet celular, mientras que en los carriles donde se colocó el purificado del sobrenadante celular, carriles 6, 7, 8 y 9 así como el extracto proteico y el sobrenadante celular de la cepa control de *L. lactis* (carril 1 y 10 respectivamente) no se detectó banda alguna (Fig. 24). Es necesario hacer notar que el plásmido pSEC contiene la señal Usp45 para la secreción de las proteínas recombinantes en *L. lactis*, la cual por algún motivo no se pudo detectar en el sobrenadante, lo que indica que la proteína no se secreta al medio. De igual manera la subunidad A₂B de la toxina del cólera se detectó en 3 clonas diferentes, carriles 2, 3, y 4 correspondientes a extractos proteicos totales (Fig. 25). En las recombinantes de las proteínas fusionadas, solamente se analizó una clona de cada una, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-V3, para su detección y a la clona pSEC:V3 como control indicador de la expresión y del peso molecular. Al igual que las clonas anteriores, en las fusiones sólo se detectó la proteína en los extractos proteicos totales. La doble fusión V3V3A₂B en el carril 2, muestra una banda del peso indicado, pero de menor intensidad, la cual se va barriando, por lo que suponemos que la proteína se degradó. En el caso de la fusión V3A₂B, carril 4, se detectó una banda bien definida a la altura esperada, lo que supone una proteína más estable y finalmente en el carril 6, se detectó la proteína V3, utilizada como control de expresión (Fig. 26).

Asa V3 de la gp120 del VIH.

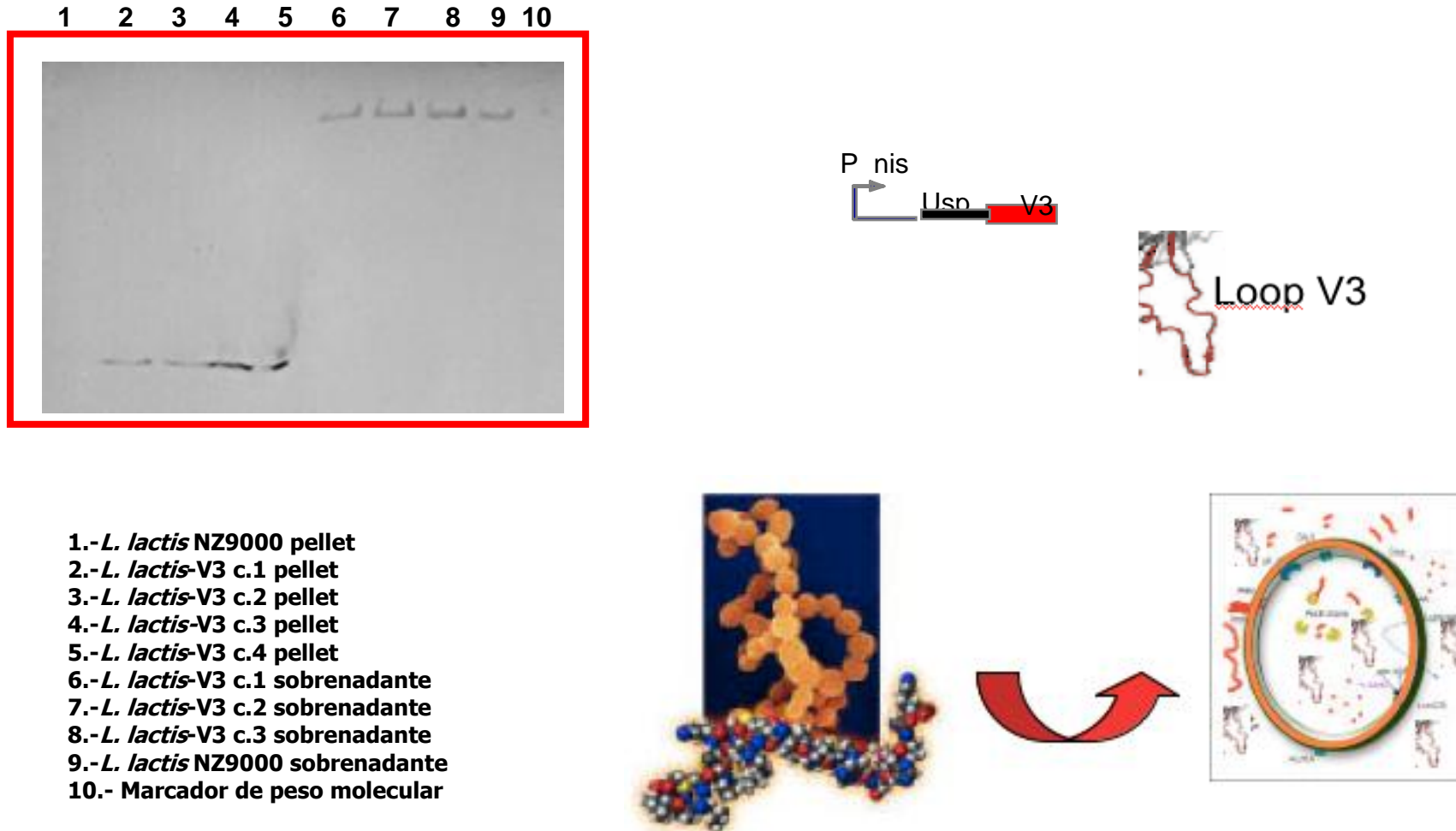


Fig. 24. Detección de la expresión del asa V3 de la gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por Western Blot.

Subunidad A₂B de la Toxina del Cólera.

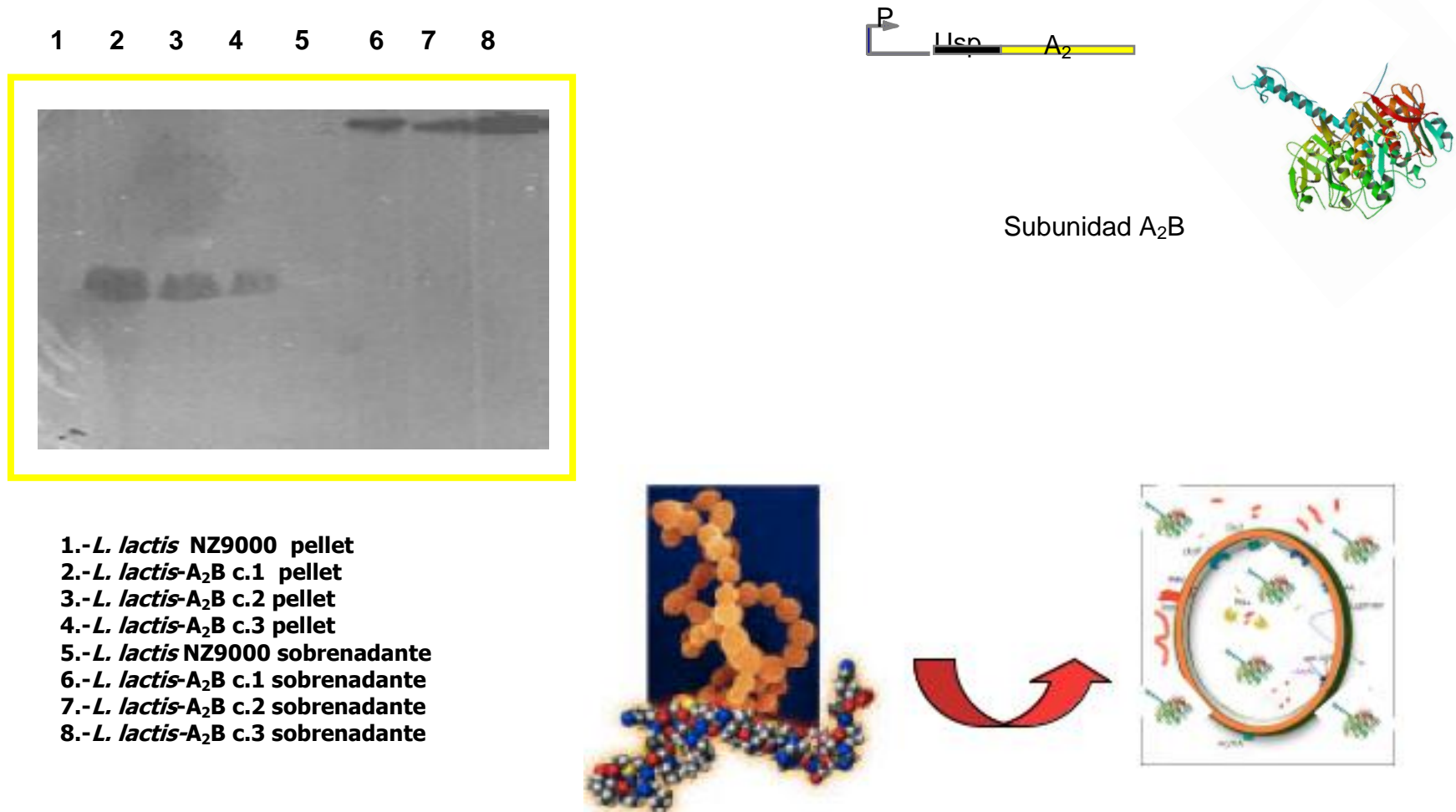
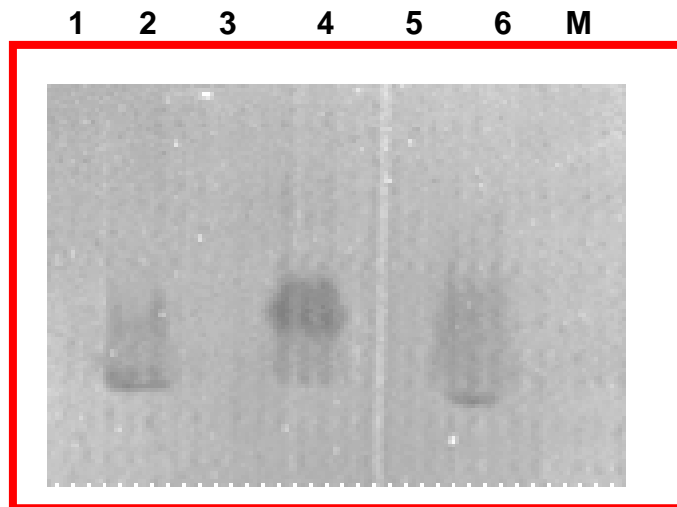


Fig. 25. Detección de la expresión de la subunidad A₂B de la toxina del cólera en *Lactococcus lactis* por Western Blot.

Fusiones del Asa V3 y de la Toxina del Cólera, V3A₂B y V3V3A₂B.



- 1.- *L. lactis*-V3V3A₂B sobrenadante
- 2.- *L. lactis*-V3V3A₂B pellet
- 3.- *L. lactis*-V3A₂B sobrenadante
- 4.- *L. lactis*-V3A₂B pellet
- 5.- *L. lactis*-V3 sobrenadante
- 6.- *L. lactis*-V3 pellet
- M.- Marcador de peso molecular

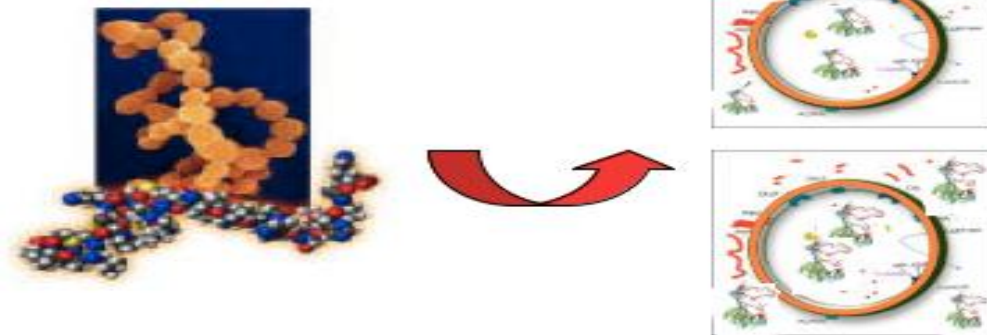
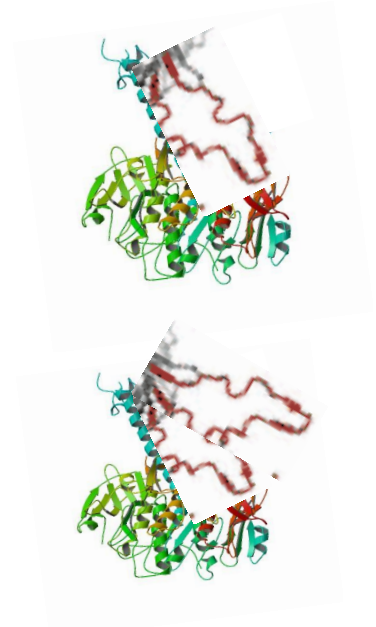


Fig. 26. Detección de la expresión de una o dos asas V3 fusionadas a la subunidad A₂B de la toxina del cólera en *Lactococcus lactis* por Western Blot.

6.4 Inducción de Inmunidad Humoral y Celular en Mucosas contra VIH Mediante la Administración de *L. lactis* Recombinante.

Para determinar si *L. lactis* recombinante que expresa el asa V3, A₂B o sus fusiones es capaz de inducir inmunidad humoral en mucosas, se inmunizaron ratones, mediante la administración de 10⁹ bacterias vivas de *L. lactis* recombinante por vía oral o por vía genital en una sola dosis. A los 10 días después de la inmunización se obtuvo muestras de suero, lavados de mucosas, PBMC y linfocitos de bazo para medir los niveles específicos de IgG e IgA contra el VIH, así como la estimulación directa de IL-2 e INF- γ .

6.4.1 Medición de Anticuerpos IgG e IgA anti-V3, en Suero y Lavados Intestinales por ELISA.

6.4.1.1 Anticuerpos en Suero.

Se detectaron anticuerpos específicos IgG e IgA monomérica por ELISA en suero de ratones inmunizados vía oral o genital con la administración de las bacterias recombinantes que expresaban el antígeno V3 solo, fusionado o en combinación con la proteína A₂B. La eficiencia de inducción de la inmunidad humoral específica, se comparó con la inducida por la bacteria no recombinante y con el control de PBS. La recombinante V3V3A₂B, fue la más eficiente para inducir IgG en títulos de 1:6400 y 1: 12800 e IgA en títulos de 1:12800, en ambas vías de administración oral o genital respectivamente, los niveles de anticuerpos se incrementaron hasta 32 veces con respecto al control. La inducción de anticuerpos IgG, se vio disminuida cuando las recombinantes de las fusiones V3A₂B y V3V3A₂B, se administraron vía oral con respecto a los títulos generados por la vía de administración genital. Un aspecto importante es que la propiedad adyuvante de la A₂B, administrada en combinación con la bacterias recombinantes para V3, o fusionada a ésta, no presentó efecto alguno en la administración oral, sin embargo se detecta un incremento en la inducción de IgA, mediante la administración de la combinación de éstas y una inducción de IgG e IgA, en la fusión, cuando fueron administradas por vía genital (Fig. 27).

6.4.1.2 Anticuerpos en lavado Intestinal.

De igual forma se detectó por ELISA anticuerpos anti-V3 IgG e IgA monomérica en los lavados intestinales de ratones inmunizados con las recombinantes que expresan el antígeno V3 solo, en combinación o fusionado a la A₂B de la toxina del cólera, en comparación con el control o con la bacteria NZ9000. El mayor incremento en la inducción de inmunidad de IgG e IgA, independientemente de la vía, presentando títulos más altos la vía oral, se mostró por la recombinante V3V3A₂B, la cual incrementa los niveles de IgG a un título de 1:6400 o 31 veces y los de IgA a un título de 1:12800 o 63 veces, con respecto al control. Una vez más el efecto adyuvante de la subunidad A₂B administrada en combinación con la recombinante V3, no mostró efecto potencializador, al contrario e interesantemente registró una disminución de un título de 1:800 a 1:400 en la inducción de IgG, cuando se administró por vía genital, y cuando se administró vía oral, muestra una disminución de un título 1:3200 a 1:800 en la inducción de IgA. En cuanto a la fusión de ambas proteínas, se mostró un incremento en la inducción de IgA hasta de 1:12800 o 1:3200, cuando las recombinantes se administraron vía oral o genital respectivamente, y la recombinante V3A₂B, mostró una disminución en las IgG, cuando se administró vía oral (Fig. 28).

Inducción de Inmunidad Humoral contra el VIH Mediante la Administración de *Lactococcus lactis* Recombinante

INTESTINO

A)

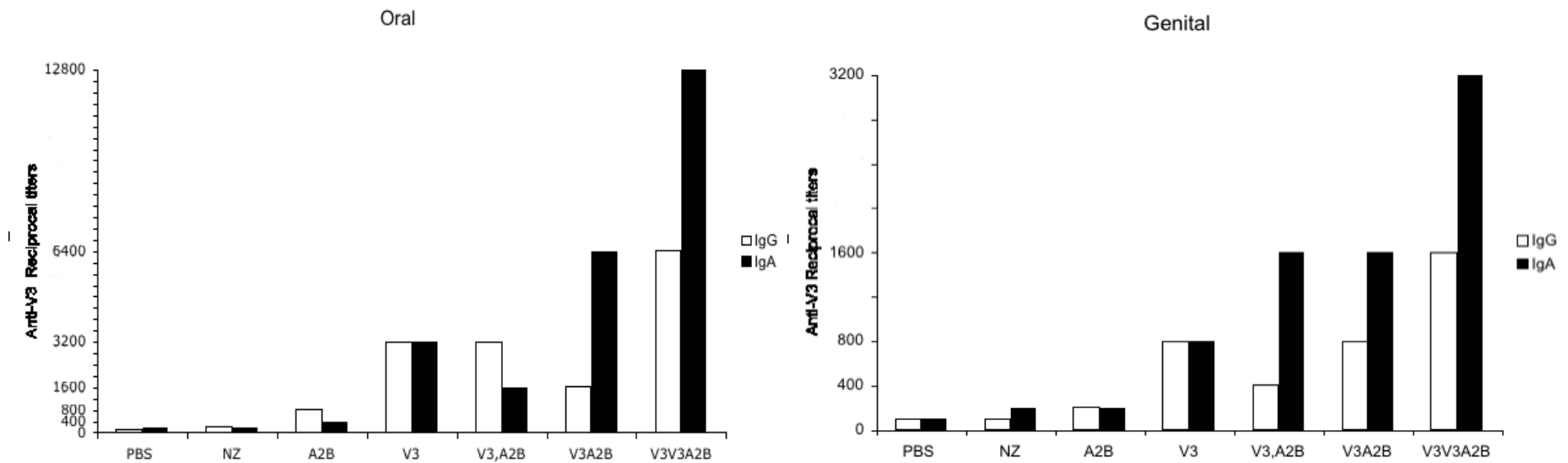


Fig. 28. Títulos de anticuerpos IgG e IgA anti-V3 en lavados intestinales de ratones inmunizados con *L. lactis* recombinantes vía oral (A) o genital (B) mediante ELISA.

6.4.2 Evaluación de la Respuesta Inmune Celular.

Para determinar si la administración oral o genital de las bacterias *L. lactis* recombinantes que expresan el asa V3 del VIH, la subunidad A₂B de la toxina del cólera o las fusiones de éstas inducen inmunidad celular, los PBMC o linfocitos de bazo de los ratones inmunizados se estimularon con 10 µg el péptido V3 y se determinó la secreción de IL-2 e INF-γ mediante la prueba de ELISA. Como control negativo se utilizó células de ratones inmunizados con *L. lactis* no recombinante (NZ9000). Como control positivo se utilizaron células de ratones inmunizados con *L. Lactis* no recombinante, estimuladas con 10 µg de fitohemaglutinina. También se realizó la extracción de ARN de intestino de los diferentes tratamientos para la determinación de la expresión del patrón de citocinas en mucosas inducidas, por el método de PCR multiplex.

6.4.2.1 Medición de IL-2 en Células PBMC y Linfocitos de Bazo.

Los ensayos en PBMC de ratones inmunizados indican niveles de 0.04 pg/mL, estadísticamente significativos ($p < 0.05$) de IL-2 solamente cuando se inmunizó con la bacteria que expresa la doble fusión V3V3A₂B, en comparación con el control de inmunización de bacteria NZ9000. Este resultado se observó para ambas vías de inmunización, oral y genital (Fig. 29). En el caso de medición de IL-2 en linfocitos de bazo, ninguno de los diferentes tratamientos de *L. lactis* recombinante, administrados vía oral, mostró niveles estadísticamente significativos, mientras que la recombinante V3V3A₂B y la combinación de V3, A₂B expresadas individualmente y administradas vía genital, presentaron niveles de 0.04 pg/mL, estadísticamente significativos (Fig. 30). De manera interesante los niveles de la interleucina aparentemente se ven disminuidos cuando se utiliza el tratamiento de una sola fusión V3A₂B, sin embargo esta disminución no es estadísticamente significativa.

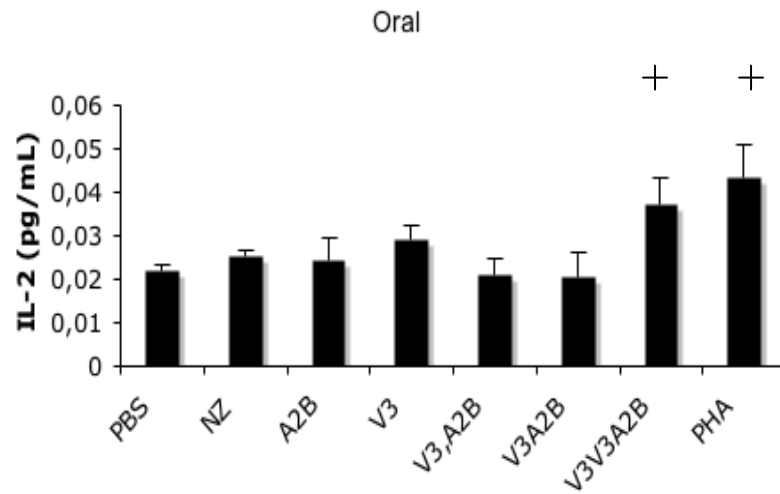
6.4.2.2 Medición de INF- γ en Células PBMC y Linfocitos de Bazo.

El nivel de interferón-gamma en PBMC de ratones inmunizados con los diferentes tratamientos no fue significativo en ninguno de los tratamientos para el caso de inmunización vía oral. Sin embargo cuando los tratamientos fueron administrados vía genital, la recombinante de la doble fusión V3V3A₂B, presentó niveles estadísticamente significativos de 0.03 pg/mL, con respecto al control negativo. Al igual que en la inducción de IL-2, en la inducción de INF- γ , el tratamiento de la combinación de las recombinantes para el asa V3 y la subunidad A₂B expresadas individualmente tiende a presentar valores más bajos (0.01 pg/mL), que los de la inducción de INF- γ , cuando se administraron por separado (Fig. 31). En la inducción de los linfocitos de bazo de ratones inmunizados, de igual forma, el tratamiento V3V3A₂B, demostró ser estadísticamente significativo con respecto al control, con valores de 0.25 pg/mL independientemente de la vía de administración. Interesantemente, la combinación que expresa la subunidad A₂B y el asa V3 por separado, también es estadísticamente significativa, con valores de 0.02 pg/mL pero solamente en su administración genital, al igual que la inducción de IL-2 en linfocitos de bazo (Fig. 32).

Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración de *Lactococcus lactis* Recombinante

PBMC

A)



B)

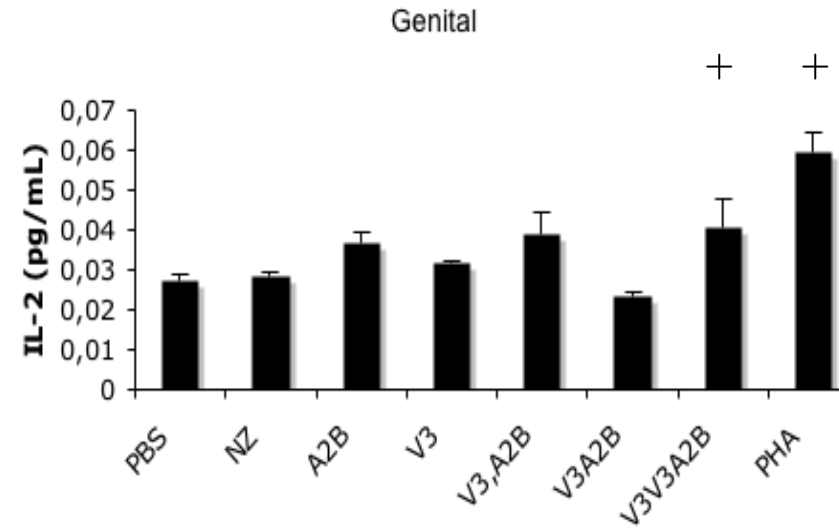


Fig. 29. Medición de la inducción de IL-2 en PBMC de ratones inmunizados con *L. lactis* recombinantes. Linfocitos sensibilizados con 10 µg del péptido GRAFYT del asa V3, utilizando *L. lactis* NZ9000 como control negativo y fitohemaglutinina como control positivo, mediante la técnica de ELISA. Administración vía oral (A) o genital (B). (+) Estadísticamente significativo.

Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración de *Lactococcus lactis* Recombinante

LINFOCITOS DE BAZO

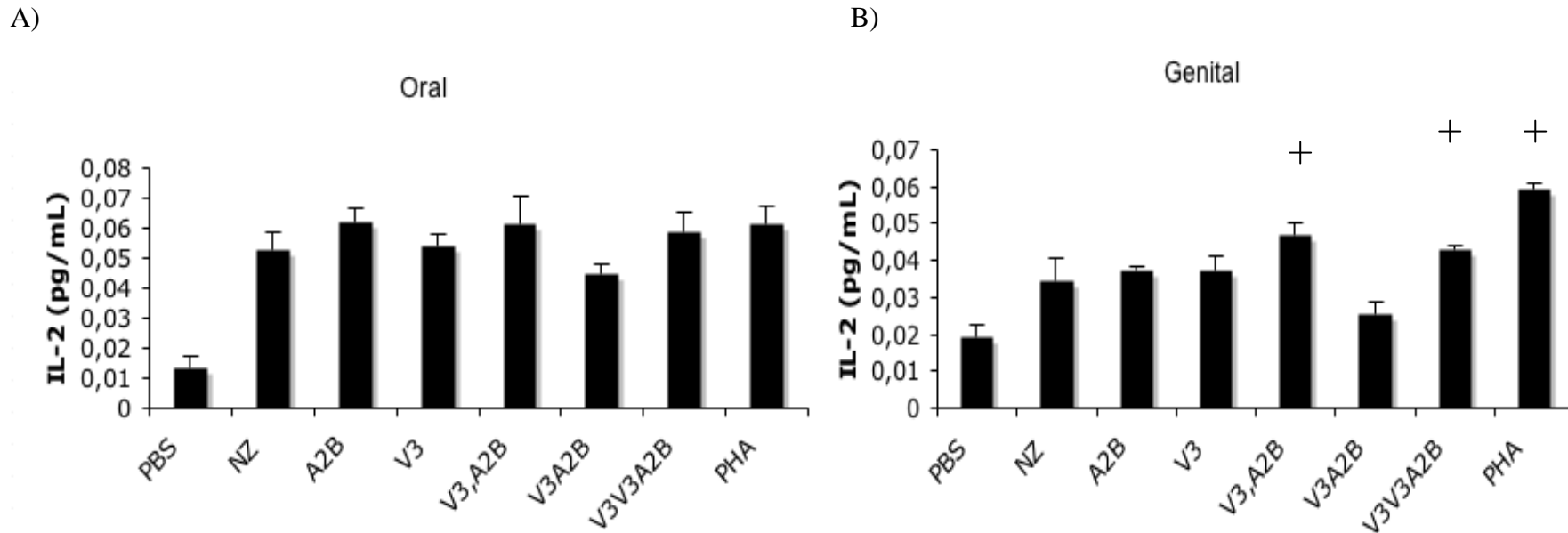


Fig. 30. Medición de la inducción de IL-2 en linfocitos de bazo de ratones inmunizados con *L. lactis* recombinantes. Linfocitos sensibilizados con 10 µg del péptido GRAFYT del asa V3, utilizando a *L. lactis* NZ9000 como control negativo y fitohemaglutinina como control positivo, mediante la técnica de ELISA. Administración vía oral (A) o genital (B). (+) Estadísticamente significativo.

Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración de *Lactococcus lactis* Recombinante

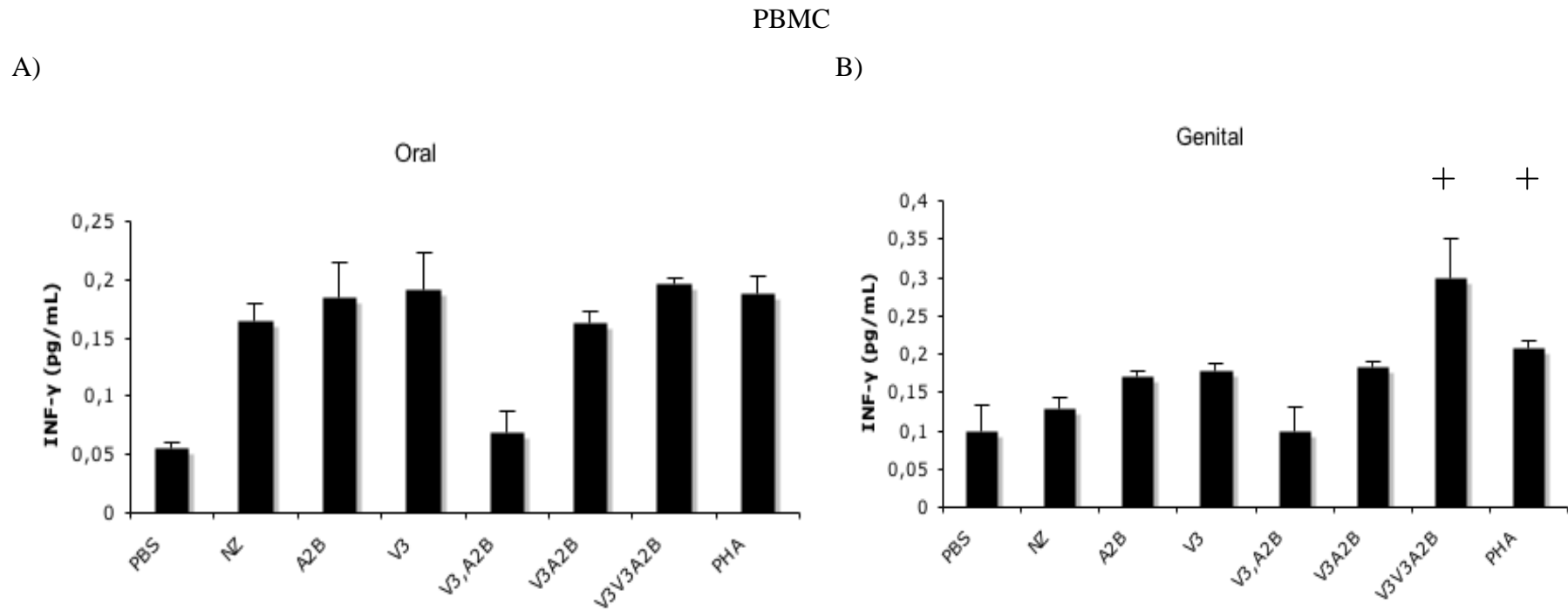


Fig. 31. Medición de la inducción de INF- γ en PBMC de ratones inmunizados con *L. lactis* recombinantes. Linfocitos sensibilizados con 10 μ g del péptido GRAFYT del asa V3, utilizando a *L. lactis* NZ9000 como control negativo y fitohemaglutinina como control positivo, mediante la técnica de ELISA. Administración vía oral (A) o genital (B). (+) Estadísticamente significativo.

Inducción de Inmunidad Celular Contra el VIH Mediante la Administración de *Lactococcus lactis* Recombinante

LINFOCITOS DE BAZO

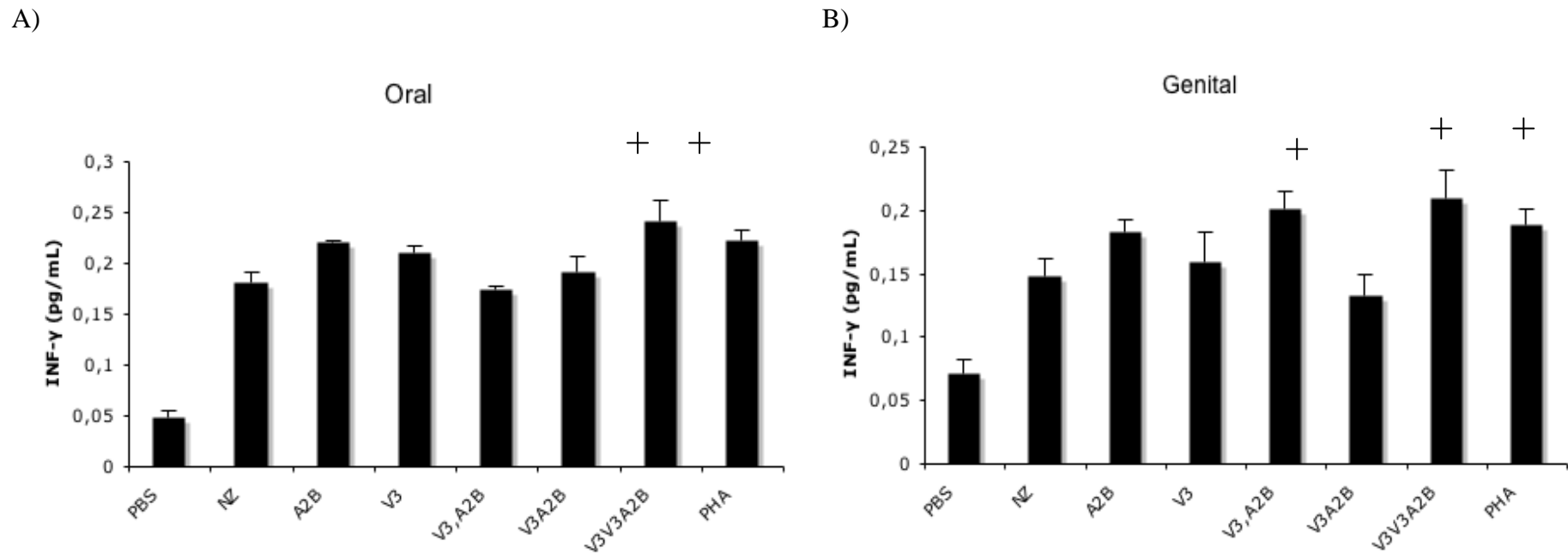


Fig. 32. Medición de la inducción de INF- γ en linfocitos de bazo de ratones inmunizados con *L. lactis* recombinantes. Linfocitos sensibilizados con 10 μ g del péptido GRAFYT del asa V3 y utilizando a *L. lactis* NZ9000 como control negativo y fitohemaglutinina como control positivo, mediante la técnica de ELISA. Administración vía oral (A) o genital (B).

(+) Estadísticamente significativo.

6.4.3 Determinación de la Expresión de Citocinas Th1/Th2 en Mucosas de Ratones Inmunizados con *L. lactis* Recombinantes.

Para determinar el tipo de inmunidad celular en la mucosa intestinal y genital de los ratones que se indujo por la inmunización de las bacterias *L. lactis* recombinantes, administradas vía oral o vía genital, se realizó la determinación del patrón de citocinas Th1/Th2 mediante PCR multiplex. Como control positivo se tomó la amplificación del gen constitutivo GAPDH, en todas las muestras. El patrón de citocinas expresadas en la mucosa intestinal no presentó diferencia alguna con el patrón de citocinas expresadas en la mucosa genital. En ambos sitios se determinó la expresión de las citocinas IL-2 e IL-12 del tipo Th1, pero la expresión de la IL-12 fue más intensa en ambas vías de inmunización. Es importante destacar que debido a la alta señal de fondo obtenido, no se puede concluir determinadamente el patrón de citocinas inducido para cada una de las recombinantes, ni la posible diferencia en las vías de administración (Fig. 33).

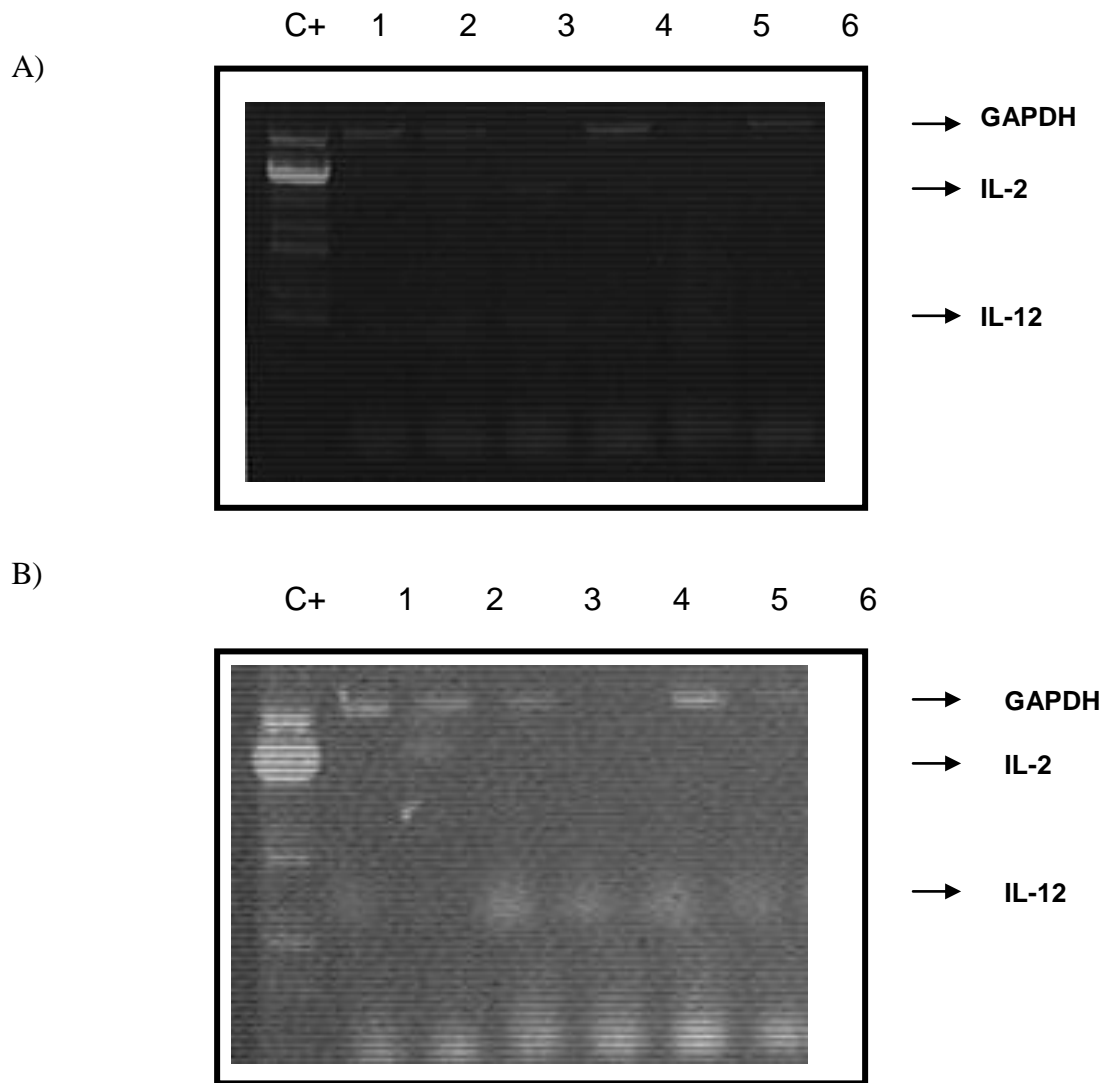


Fig. 33. Expresión de interleucinas Th1/Th2 en la mucosa por PCR multiplex. Gel de agarosa al 1%, mostrando los fragmentos amplificados en A) mucosa intestinal B) mucosa genital de: C+) control positivo, 1) NZ9000, 2) *L. lactis* V3, 3) *L. lactis* A₂B, 4) *L. lactis* V3A₂B, 5) *L. lactis* V3V3A₂B, 6) *L. lactis* V3 + *L. lactis* A₂B.

7. DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento en los 80's, a la fecha, el número de personas infectadas con SIDA continúa incrementándose a pesar del gran avance en la prevención de la infección. Actualmente es urgente el desarrollo de una vacuna eficiente y capaz de inducir inmunidad humoral y celular contra el VIH. En esta investigación desarrollamos una posible estrategia de vacuna basada en bacterias lácticas modificadas genéticamente para que expresen antígenos virales en la mucosa, sitio de entrada del patógeno y así generar una respuesta inmune humoral y celular específica contra el virus. La eficiente expresión de antígenos en la mucosa por *Lactococcus lactis* se reportó en varias ocasiones, donde se demuestra que puede expresar eficientemente proteínas virales de circovirus, rotavirus y VPH (Wang *et al.*, 2008; Enouf *et al.*, 2001; Bermúdez *et al.*, 2004). Nosotros expresamos el asa V3 del VIH-1 porque es el principal inmunógeno, involucrado en la neutralización del virus y ampliamente utilizado en el desarrollo de vacunas. Con el objetivo de potenciar la respuesta inmune generada, también se expresó la subunidad A₂B de la toxina del cólera, así como su fusión con una o dos asas V3 del VIH (V3A₂B, V3V3A₂B). El uso de la toxina del cólera como adyuvante fusionado al asa V3 del VIH, también se utilizó por Kim *et al.*, 2004, sin embargo él expresó estos antígenos en una papa transgénica.

Uno de los mejores promotores para expresión de proteínas recombinantes en bacterias lácticas es el regulado por nisina, nuestras construcciones fueron dirigidas bajo el uso de éste promotor y bajo una secuencia líder para la secreción de la proteína al medio. Sin embargo, después de inducir nuestras proteínas recombinantes con nisina y purificar dichas muestras, al hacer la detección mediante un Western Blot, ninguna de las proteínas recombinantes se logró detectar en el sobrenadante a pesar del uso del péptido señal Usp45 presente en el vector pSEC. La expresión de dichas proteínas, sólo se detectó en muestras de extractos completos, por lo que es de señalar que la proteína se retuvo en la célula. En respuesta a esto y sin descartar el posible error en la técnica empleada, se comprobó que el péptido señal es necesario, pero no suficiente, para la exportación de la proteína madura (Enouf *et al.*, 2001), otro factor por el cual no se detectaron las proteínas recombinantes en el sobrenadante puede ser la carga positiva neta del péptido. Le Loir *et al.*, en 1998 determinó que los residuos N terminal producen una dramática disminución en la secreción de la eficiencia de la proteína Nuc, en éste mismo sistema. No sabemos exactamente por qué la proteína no fue capaz de ser secretada, pero descartamos el tamaño de las fusiones, ya que ni la V3 de 35 aminoácidos se logró detectar en el sobrenadante y como hemos mencionado antes, diversas proteínas virales de mayor tamaño, se expresan eficientemente en este vector, por lo que atribuimos este resultado a otras causas que requieren ser investigadas a profundidad.

No se sabe el mecanismo exacto por el cual las bacterias lácticas inducen inmunidad, pero uno de los mecanismos propuestos es el de Maldonado *et al.*, 2006 quien demostró que la bacteria puede ser internalizada a través de las células M en las placas de Peyer de la mucosa o también pueden ser tomadas como bacterias completas o como fragmentos por las células dendríticas, y así activar la respuesta inmune. A pesar de que no se detectaron proteínas recombinantes en los sobrenadantes, se demostró que diversas proteínas intracelulares expresadas en bacterias lácticas inducen una respuesta inmune específica (Shaw *et al.*, 2000; Grangete *et al.*, 2001; Su-Jung *et al.*, 2006).

Por otro lado, la inducción de la inmunidad humoral y celular contra el VIH, por bacterias ácido lácticas recombinantes, también se probó por Xin *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003; Xu and Li, 2007, pero con estrategias diferentes. En este trabajo aparte de utilizar antígenos del VIH en bacterias lácticas, a fin de obtener la mayor inducción en la respuesta inmune, se fusionó el antígeno V3 a la subunidad A₂B de la toxina del cólera, se inmunizó a ratones por dos vías de administración oral y genital. Los ratones se inmunizaron con diferentes *L. lactis* recombinantes y después de 10 días se obtuvieron las muestras para medir la inmunidad específica contra el asa V3. Todas las recombinantes que expresan la región V3, incluida la combinación de V3 y A₂B expresado por separado, inducen anticuerpos anti-V3 IgG e IgA en suero y lavados intestinales de ratones inmunizados, excepto la recombinante que expresa A₂B, lo que indica que asa V3 es un antígeno eficaz para inducir anticuerpos específicos. Cuando éste se fusionó con la subunidad A₂B de la toxina del cólera los títulos de la inducción de IgA en suero o lavados intestinales, aumentó de 2 o 3 veces en comparación con la recombinante que expresa solo la V3. Estos resultados concuerdan con Bukawa *et al.*, 1995, quien demostró que CTB induce un elevado título de anticuerpos IgA secretora contra el VIH-1. En el caso de la inducción de anticuerpos IgG, cuando las recombinantes se administraron vía genital, mostró un aumento de 3 veces en suero y cuando se administraron por vía oral los títulos de anticuerpos fueron bajos en el intestino, sin la detección del efecto adyuvante de la toxina del cólera. Sin embargo este fenómeno también se detectó en un estudio similar donde los ratones inoculados con *L. lactis* que expresan V2-V4 del VIH, fue 30% más eficiente que cuando se utilizó a la toxina del cólera como adyuvante (Xin *et al.*, 2003). En contraste, Albu *et al.*, 2003 detectó un aumento de IgG en suero cuando utilizó la toxina del cólera, pero deduce que la CTB necesita IL-12 para inducir anticuerpos contra la gp120 o gp 140.

Nosotros concluimos que el efecto adyuvante de la toxina del cólera, sólo es eficaz para inducir IgA anti-V3 en la mucosa. Interesantemente cuando se administró la combinación de *L. lactis* recombinantes que expresan V3 o A₂B individualmente, vía genital, el efecto adyuvante de la subunidad A₂B, en la inducción de IgG se suprimió por completo. Resultados similares observó Maggi *et al.*, 2002, quien utilizó a *Streptococcus gordonii* para expresar simultáneamente la toxina de *E. coli* termo-lábil y el dominio V3 del VIH-1. La mayor inducción de anticuerpos sistémicos y locales, se logró con la fusión V3V3A₂B, que incrementa 31 veces los títulos de IgG e IgA en suero, cuando se administra vía oral o genital. Interesantemente, cuando se administra por vía oral los títulos de IgA incrementan 63 veces en lavados intestinales, en contraste con el control *L. lactis* (NZ 9000). Aunque el sistema inmunológico de mucosas es una amplia red interconectada, la inducción de anticuerpos en lavados intestinales se detectó en títulos bajos cuando las recombinantes se administraron por vía genital, sin embargo nosotros no pudimos analizar lavados vaginales, por lo que no descartamos que una buena respuesta local se pudiera haber generado con este tipo de inmunización. De igual forma Kang *et al.*, 2003, en un estudio similar, pero con inmunización nasal de VLP de SIV y CTB, se detectó títulos elevados de IgA en vagina, saliva y pulmón, y una proporción baja de títulos en intestino. Es importante remarcar que nosotros obtuvimos anticuerpos específicos con una dosis de bacterias recombinantes, a diferencia de otros estudios donde expresan antígenos virales en bacterias lácticas y se inducen anticuerpos con varias dosis (Xin *et al.*, 2003; Yigang and Yijing., 2008), Wassen and Jertborn 2005). Por otro lado, Lee *et al.*, 2006 encontró que una dosis de CTB, no era suficiente para generar títulos de anticuerpos IgG e IgA específicos, y no encontró diferencia significativa entre la inmunización oral o nasal. En otro trabajo, donde utilizan bacterias lácticas, no se encontró inducción de IgA humoral o sistémica mediante una inmunización nasal, incluso si se administran dosis altas de bacterias (Aires *et al.*, 2006).

Las citocinas como IL-2 e INF- γ proporcionan inmunidad protectora frente a patógenos intracelulares como virus y son importantes en la reducción de las viremias. Nosotros analizamos la inducción específica de IL-2 e INF- γ por PBMC y linfocitos de bazo de ratones inmunizados con *L. lactis* recombinante. No es de extrañar que *L. lactis* V3V3A₂B recombinante, que indujo altos títulos de anticuerpos es capaz de inducir niveles específicos y significativos de IL-2 e INF- γ . Nuestros resultados se encuentran de acuerdo con Albu *et al.*, 2003 quien determinó que gp120 más CTB, induce la producción de INF- γ en bazo, y específicamente con Bermúdez *et al.*, 2004 quien también determinó la inducción de estas citocinas por *L. lactis* recombinante con proteínas virales. Un resultado interesante es que la combinación de las recombinantes ineficiente para inducir la respuesta humoral es eficaz para inducir la respuesta celular sólo cuando las recombinantes fueron administradas por vía genital. En un estudio similar Chin'ombre *et al.*, 2009, encontró que la inmunización oral de ratones Balb/c con *Salmonella* que expresa gp120 o gag no presenta un aumento significativo en el título de anticuerpos anti-gp120 en comparación con los controles, sin embargo células T del bazo de ratones reestimuladas con gp120 producen citocinas específicas Th1, (INF- γ y TNF-a), y Th2 (IL-4 e IL-5). Boberg *et al.*, 2008 determinó que los péptidos VIH-1 genéticamente conjugados con la subunidad B de la toxina del cólera aumentan la respuesta inmunitaria celular específica. Nuestras otras recombinantes no tienen diferencia significativa para inducir IL-2 o INF γ específicas en PBMC o linfocitos de bazo respecto a *L. lactis* como control, pero si presentan diferencia significativa con respecto al control con PBS. Ésto se puede deber a que en varios estudios, se demostró que las bacterias del ácido láctico por sí mismas estimulan la producción de citocinas y *L. lactis* per se es una bacteria inmunomoduladora (Kimoto *et al.*, 2004). Para determinar el patrón de expresión de citocinas en mucosas por las diferentes recombinantes o vías de administración, se analizó por PCR multiplex, las citocinas Th1 y Th2, en tejidos de mucosa intestinal y genital, sin embargo los resultados son poco concluyentes debido a la interferencia en los niveles de fondo que se presentaron.

En resumen, a pesar de que la fusión V3V3A₂B por Wester Blot se observó degradada, sin descartar que haya sido por el proceso de obtención, y no por una estabilidad proteica, es la más eficiente para inducir una respuesta humoral de anticuerpos IgG e IgA anti-V3, de manera sistémica y local, de las recombinantes que expresan el antígeno V3, solo o fusionado a la subunidad A₂B toxina del cólera, o la combinación de ambos. Aunque la subunidad A₂B es un adyuvante de mucosas, su efecto potencializador sólo se observó cuando ésta se fusionó a una doble asa V3 y no a la fusión simple. Así mismo, esta fusión fue la más eficiente para inducir IL-2 e INF- γ en linfocitos de bazo y PBMC. Nosotros hipotetizamos que la eficacia de la doble fusión, radica en que la segunda asa V3, funciona como un puente de extensión entre la primer asa V3 y la subunidad A₂B, lo que le da la ventaja de una mayor exposición a la primer asa V3, para inducir una respuesta inmune más eficiente al antígeno de captura y presentación. El hecho de que las recombinantes induzcan diferentes niveles de anticuerpos y de IL-2 e INF- γ , depende de la naturaleza misma del antígeno, así como de la vía de administración y del procesamiento del antígeno por el sistema inmune para la inducción de inmunidad.

8. CONCLUSIÓN

Mediante la modificación genética de una de las más antiguas bacterias utilizadas en la industria alimentaria, comensal, no colonizador y fácil de administración, *Lactococcus lactis* que expresa el péptido V3 de la glicoproteína de envoltura gp120 del VIH y su fusión a la subunidad de la toxina del cólera como adyuvante, logramos el objetivo de inducción de inmunidad humoral específica, y la generación de anticuerpos IgG e IgA anti-VIH, así como la inducción de inmunidad celular mediante la inducción de interleucinas IL-2 e INF- γ en linfocitos de bazo y de sangre periférica. Ambos tipos de inmunidad específica contra el VIH se generaron a nivel sistémico en suero y a nivel local en mucosas. Se demostró también que al fusionar al asa V3 de la gp120 a un componente con actividad adyuvante como lo es la subunidad A₂B, es una estrategia que mejora o potencializa la respuesta en mucosas contra el VIH. Este desarrollo puede ser optimizado y evaluado en su momento como una vacuna segura y efectiva para generar inmunidad específica que pueda neutralizar al virus del VIH al momento de su entrada en las mucosas del epitelio gastrointestinal y genital.

LITERATURA CITADA

Abbas AK, Lichtman A, Pober J. 1999. *Inmunología Celular y Molecular*. 3Ed. McGraw- Hill, S.A.U.

Achour A, Bex F, Hermans P, Burny A, Zagury D. 1996. Induction of anti-gp160 cytotoxic T cells crossreacting with various V3 loop P18 peptides in human immunodeficiency virus type 1 envelope immunized individuals. *Journal of Virology* 70:6741-6750.

Aires KA, Cianciarullo AM, Carneiro SM, Villa LL, Boccardo E, Perez-Martinez G. 2006. Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 72:745-752.

Alaeus A, Leitner T, Lidman K, Albert J. 1997. Most HIV-1 genetic subtypes have entered Sweden. *AIDS* 11:199-202.

Albu DI, Jones-Trower A, Woron AM, Stellrecht K, Broder CC, and Metzger DW. 2003. Intranasal vaccination using interleukin-12 and cholera toxin subunit B as adjuvants to enhance mucosal and systemic immunity to human immunodeficiency virus type 1 glycoproteins. *Journal of Virology* 77:5589-5597.

Aldovini A, Young RA. 1990. Development of a BCG recombinant vehicle for candidate AIDS vaccines. *International Reviews of Immunology* 7:79-83.

Aldovini A, Young RA. 1991. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* 351:479-482.

Alvarez-Garcia E, Alegre-Cebollada J, Batanero E, Monedero V, Perez-Martinez G, Garcia- Fernandez R, Gavilanes JG, and del Pozo AM. 2008. *Lactococcus lactis* as a vehicle for the heterologous expression of fungal ribotoxin variants with reduced IgE-binding affinity. *Journal of Biotechnology* 134:1-8.

Amerogen HM, Weltzin R, Farnet CM, Michetti P, Haseltine WA, Neutra MR. 1991. Transepithelial transport of VIH-1 by intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 4:760-765.

Andrus L, Prince AM, Bernal I, McCormack P, Lee DH, Gorny MK, and Zolla-Pazner S. 1998. Passive immunization with a human immunodeficiency virus type 1 neutralizing monoclonal antibody in Hu-PBL-SCID mice: isolation of a neutralization escape variant. *Journal of Infectious Diseases* 177:889-897.

Aso Y, Akaza H, and the BLP study group. 1992. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* pre-recurrence of superficial bladder cancer. *Urologia Internationalis* 49:125-129.

Bachtiar EW, Coloe PJ and Smooker PM. 2009. Construction and immunogenicity of *Salmonella* vaccine vector expressing HIV-1 antigen and Mcp3. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 56:403-415.

Backstrom M, Lebens M, Schodel F and Holmgren J. 1994. Insertion of a HIV-1 neutralizing epitope in a surface-exposed internal region of the cholera toxin B subunit. *Gene* 149:211-217.

Bagarazzi ML, Boyer JD, Javadian MA. 1997. Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees. *Journal of Medical Primatology* 26:27-33.

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

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

Berggren RE, Wunderlich A, Ziegler E, Schleicher M, Duke RC, Looney D and Fang FC. 1995. HIV gp120 specific cell mediated immune responses in mice after oral immunization with recombinant *Salmonella*. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 10:489-495.

Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Le Loir Y, Alcocer-Gonzalez JM, Tamez-Guerra RS, de Oca-Luna RM, and Langella P. 2004. An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. *Journal of Medical Microbiology* 53:427-433.

Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR., Colognesi C, Karlsson A, Albert J, Scarlatti G, Littman DR, and Fenyo EM. 1997. Co-receptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *Journal of Virology* 71:7478-7487.

Blanchard TG, Lycke N, Czinn SJ and Nedrud JG. 1998. Recombinant cholera toxin B subunit is not an effective mucosal adjuvant for oral immunization of mice against *Helicobacter felis*. *Immunology* 94:22-27.

Boberg A, Gaunitz S, Brave A, Wahren B, and Carlin N. 2008. Enhancement of epitope specific cellular immune responses by immunization with HIV-1 peptides genetically conjugated to the B-subunit of recombinant cholera toxin. *Vaccine* 26:5079-5082.

Boels IC, Ramos A, Kleerebezem M, Devos WM. 2001. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3033-3040.

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

Bowman CC, and Clements JD. 2001. Differential biological and adjuvant activities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin hybrids. *Infection and Immunity* 69:1528-1535.

Boyaka PN, Marinaro M, Vancott JL, Takahashi I, Fujihashi K, Yamamoto M, van Ginkel FW, Jackson RJ, Kiyono H, McGhee JR. 1999. Strategies for mucosal vaccine development. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 60 (4 Suppl):35-45.

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

Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP. 2006. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 4:754-759.

Bregenholt S, Wang M, Wolfe T, Hughes A, Baerentzen L, Dyrberg T, Von Herrath MG and Petersen JS. 2003. The cholera toxin B subunit is a mucosal adjuvant for oral tolerance induction in type-1 diabetes. *Scandinavian Journal of Immunology* 57:432-438.

Briggs DR, Tuttle DL, Sleasman JW, and Goodenow MM. 2000. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS* 14:2937-2939.

Brodine SK, Mascola JR, Weiss PJ, Ito SI, Porter KR, Artenstein AW, Garland FC, McCutchan FE, Burke DS. 1995. Detection of diverse HIV-1 genetic subtypes in the United States. *The Lancet* 346:1198-1199.

Bruno-Bárcena JM, Andrus JM, Libby SL, Klaenhammer TR and Hassan HM. 2004. Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal *Lactobacilli* provides protection against hydrogen peroxide toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4702-4710.

Buccato S, Maione D, Rinaudo CD, Volpini G, Taddei AR, Rosini R. 2006. Use of *Lactococcus lactis* expressing pili from group B *Streptococcus* as a broad-coverage vaccine against streptococcal disease. *Journal of Infectious Diseases* 194:331-340.

Bukawa H, Sekigawa KI, Hamajima K, Fukushima J, Yamada Y, Kiyono H, and Okuda K. 1995. Neutralization of HIV-1 by secretory IgA induced by oral immunization with a new macromolecular multicomponent peptide vaccine candidate. *Nature Medicine* 1:681-685

Burgess C, O'Connell-Motherway M, Sybesma W, Hugenholtz J, and Van Sinderen D. 2004. Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for *in situ* production of vitamin enriched foods. *Applied and Environmental Microbiology* 70:5769-5777.

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

Cattozzo EM, Lazzarin L, Augello G, and Tognon M. 1996. Expression of four Hiv-1 epitopes from gp160, gag and nef proteins either exposed at the surface of flagellar filaments or intracellularly in *Salmonella* live vaccine strain. *Minerva Biotechnologica* 8:172-178.

Cattozzo EM, Stocker BAD, Radaelli A, Morghen CD and Tognon M. 1997. Expression and immunogenicity of V3 loop epitopes of HIV-1, isolates sc and wmj2, inserted in *Salmonella flagellin*. *Journal of Biotechnology* 56:191-203.

Cao J, Bergeron L, Helseth E, Thali M, Repke H, and Sodroski J. 1993. Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *Journal of Virology* 67:2747-2755.

Cayabyab MJ, Hovav AH, Hsu T, Krivulka GR, Lifton MA, Gorgone DA, Fennelly GJ, Haynes BF, Jacobs WR, and Letvin NL. 2006. Generation of CD8 T-cell responses by a recombinant nonpathogenic *Mycobacterium smegmatis* vaccine vector expressing human immunodeficiency virus type 1 env. *Journal of Virology* 80:1645-1652.

Cayabyab MJ, Koriath-Schmitz B, Sun Y, Carville A, Balachandran H, Miura A, Carlson KR, Buzby AP, Haynes BF, Jacobs WR and Letvin NL. 2009. Recombinant *Mycobacterium bovis* Bcg prime-recombinant Adenovirus boost vaccination Rhesus monkeys elicits robust polyfunctional simian immunodeficiency virus specific T-cell responses. *Journal of Virology* 83:5505-5513.

CENSIDA, 2008. MEGAS 2006-2007. Secretaría de Salud. México.

CENSIDA, 2010. *Panorama Epidemiológico del VIH/SIDA e ITS en México*. [internet]. Centro Nacional para el Control y la Prevención del VIH. Disponible en el sitio de red: <http://www.censida.salud.gob.mx/interior/panorama.html> [Revisado el 4 de septiembre de 2010].

Chang TL, Chang Y, Simpson CH, Xu DA, Martin Q, Lagenaar PK, Schoolnik LA, Ho GK, Hillier DD, Holodniy SL, Lewicki M and Lee, PP. 2003. Inhibition of Hiv infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain Cd4. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 100, 11672-11677.

Chapman R, Chegel G, Shephard E, Stutz H and Williamson AL. 2010. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG as an HIV vaccine vector. *Current HIV Research* 8, 282-298.

Chatel JM, Langella P, Adel-Patient K, Commissaire J, Wal JM and Corthier GE. 2001. Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine Beta-lactoglobulin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8: 545-551.

Chatel JM, Nouaille S, Adel-Patient K, Le Loir Y, Boe H, Gruss A, *et al.*, 2003. Characterization of a *Lactococcus lactis* strain that secretes a major epitope of bovine beta-lactoglobulin and evaluation of its immunogenicity in mice. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6620-6627.

Chege GK, Thomas R, Shephard EG, Meyers A, Bourn W, Williamson C, Maclean J, Gray CM, Rybicki EP and Williamson AL. 2009. A prime-boost immunisation regimen using recombinant Bcg and Pr55(Gag) virus-like particle vaccines based on Hiv type 1 subtype C successfully elicits Gag-specific responses in Baboons. *Vaccine* 27, 4857-4866.

Chen LM, Briones G, Donis RO and Galan JE. 2006. Optimization of the delivery of heterologous proteins by the *Salmonella* enterica serovar typhimurium Type III secretion system for vaccine development. *Infection and Immunity* 74:5826-5833

Chin'ombe N, Bourn WR, Williamson AL and Shephard EG. 2009. Oral vaccination with a recombinant *Salmonella* vaccine vector provokes systemic HIV-1 subtype C Gag-specific CD4+Th1 and Th2 cell immune responses in mice. *Virology Journal* 6: 87.

Coney L, Wang B, Ugen KE. 1994. Facilitated DNA inoculation induces anti-HIV-1 immunity *in vivo*. *Vaccine* 12:1545-1550.

Cormier EG and Dragic T. 2002. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *Journal of Virology* 76:8953-8957.

Danon S J, Fox J G, Wilson JE, Sheppard BJ, Whary M T, Schauer DB, Kimpton K and Lee A. 2001. An oral therapeutic vaccine comprised of *Helicobacter* spp antigens and cholera toxin adjuvant ameliorates typhlocolitis in IL-10(-/-) mice. *Gastroenterology* 120, 442.

de LeBlanc AD, LeBlanc JG, Perdigon G, Miyoshi A, Langella P, Azevedo V and Sesma F. 2008. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *Journal of Medical Microbiology* 57: 100-105.

Dietrich U, Ruppach H, Gehring S, Knechten H, Knickmann M, Jager H, Wolf E, Husak R, Orfanos CE, Brede HD, Rubsamen-Waigmann H, von Briesen H. 1997. Large proportion of non-B HIV-1 subtypes and presence of zidovudine resistance mutations among German seroconvertors. *AIDS* 11:1532-1533.

Doranz BJ, Rucker J, Yi YJ, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG and Doms RW. 1996. A dual-tropic primary hiv-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors ckr-5, ckr-3, and ckr-2b as fusion cofactors. *Cell* 85:1149-1158.

Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J and Corthier G. 2001. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1423-1428.

Esquivel-Perez R and Moreno-Fierros L. 2005. Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and crylac protoxin on the specific antibody response to hiv-1c4/v3 peptides are different and depend on the antigen co-administered. *Viral Immunology* 18, 695-708.

Evans DT, Chen LM, Gillis J, Lin KC, Harty B, Mazzara GP, Donis RO, Mansfield KG, Lifson JD, Desrosiers RC, Galan JE and Johnson RP. 2003. Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic t-lymphocyte responses in rhesus macaques by the *Salmonella* type III secretion antigen delivery system. *Journal of Virology* 77:2400–2409.

Fasano A. 1998. Cellular microbiology: how enteric pathogens socialize with their intestinal host. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition* 28:520-32.

Fleury B, Janvier G, Pialoux G. 1996. 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. *Journal of Infectious Diseases* 174:734-738.

Fouchier RAM, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F and Schuitemaker H. 1992. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *Journal of Virology* 66:3183–3187.

Fouts TR, Tuskan R.G, Chada S, Hone DM and Lewis GK. 1995. Construction and immunogenicity of salmonella typhimurium vaccine vectors that express Hiv-1 gp120. *Vaccine* 13, 1697-1705.

Frahma N and Brandera C. 2005. Optimal CTL epitope identification in Hiv clade B and non-clade B infection. In: *Hiv molecular immunology*. Editorial: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico. IA

Freitas DA, Leclerc S, Miyoshi A, Oliveira SC, Sommer PSM, Rodrigues L. 2005. Secretion of *Streptomyces tendae* antifungal protein 1 by *Lactococcus lactis*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 1585-1592.

Friedman RS, Frankel FR, Xu Z and Lieberman J. 2000. Induction of human immunodeficiency virus (Hiv)-specific cd8 T-cell responses by *Listeria monocytogenes* and a hyperattenuated listeria strain engineered to express HIV antigens. *Journal of Virology* 74, 9987-9993.

Fromen RC, Drevet P, Robert A, Menez A, Leonetti M. 1999. Recombinant *Staphylococcus* strains as live vectors for the induction of neutralizing anti-diphtheria toxin antisera. *Infection and Immunity* Oct. 5007-5011.

Fuller DH, Murphey-Corb M, Clements J, Barnett S, Haynes JR. 1996. Induction of immunodeficiency virus-specific immune responses in rhesus monkeys following gene gun-mediated DNA vaccination. *Journal of Medical Primatology* 25:236-241.

Gaeng S, Siegfried S, Horst N and Loessner MJ. 2000. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2951-2958.

Gaspar P, Neves AR, Ramos A, Gasson MJ, Shearman CA and Santos H. 2004. Engineering *Lactococcus lactis* for production of mannitol: High yields from food-grade strains deficient in lactate dehydrogenase and the mannitol transport system. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1466-1474.

Geijtenbeek TBH, Kwon DS, Torensma R. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell - specific HIV-1-binding protein that enhances transinfection of Tcell. *Cell* 100:587-597.

Gerritse K, Posno M, Schellekens MM, Boersma WJ, Claassen E. 1990. 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*. *Research in Microbiology* 141:955- 62.

Gil MT, Pérez-Arellano I, Buesa J, Pérez-Martinez G. 2006. Secretion of the rotavirus VP8 protein in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters* 203: 267-274.

Gorny MK, Gianakakos V, Sharpe S and Zolla-Pazner S. 1989. Generation of human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 86:1624-1628.

Gorny MK, Conley AJ, Karwowska S, Buchbinder A, Xu JY, Emini EA, Koenig S and Zolla-Pazner S. 1992. Neutralization of diverse human immunodeficiency virus type 1 variants by an anti-V3 human monoclonal antibody. *Journal of Virology* 66:7538-7542.

Gorny MK, VanCott TC, Hioe C, Israel ZR, Michael NL, Conley AJ, Williams C, Kessler II JA, Chigurupati P, Burda S and Zolla-Pazner S. 1997. Human monoclonal antibodies to the V3 loop of HIV-1 with intra-and interclade cross-reactivity. *Journal of Immunology* 159:5114-5122.

Gorny MK, Williams C, Volsky B, Revesz K, Cohen S, Polonis VR, Honnen WJ, Kayman SC, Krachmarov C, Pinter A and Zolla-Pazner S. 2002. Human monoclonal antibodies specific for conformation-sensitive epitopes of V3 neutralize human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from various clades. *Journal of Virology* 76:9035–9045.

Gorny M K, Revesz K, Williams C, Volsky B, Louder MK, Anyangwe CA, Krachmarov C, Kayman SC, Pinter A, Nadas A, Nyambi PN, Mascola J R and Zolla-Pazner S. 2004. The V3 loop is accessible on the surface of most human immunodeficiency virus type 1 primary isolates and serves as a neutralization epitope. *Journal of Virology* 78(5): 2394–2404.

Gram G J, Fomsgaard A, Thorn M, Madsen SM and Glenting J. 2007. Immunological analysis of a *Lactococcus lactis* based DNA vaccine expressing HIV gp120. *Genetic Vaccines and Therapy* 5:3.

Grangette C, Muller AH, Goudercourt MC, Turneer M, Mercenier A. 2001. mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infection and Immunity* Mar, 1547-1553.

Groot MNN, Godefrooij J and Kleerebezem M. 2008. Heterologous expression of the pneumococcal serotype 14 polysaccharide in *Lactococcus lactis* requires lactococcal epsABC regulatory genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 912-915.

Gunneriusson E, Samuelson P, Uhlen M, Nygres A, Stahl S. 1996. Surface display of a functional single-chain Fv antibody on *Staphylococcus*. *Journal of Bacteriology* 178:1340-1346.

Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L. 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *Journal of Virology* 68(3):1581-5.

Guzman CA, Saverino D, Medina E, Fenoglio D, Gerstel B, Merlo A, Pira GL, Buffa F, Chakraborty T and Manca F. 1998. Attenuated *Listeria monocytogenes* carrier strains can deliver an hiv-1 gp120 T helper epitope to MHC class I restricted human Cd4(+) T cells. *European Journal of Immunology* 28, 1807-1814.

Hanniffy SB, Philo M, Pelaez C, Gasson MJ, Requena T and Martinez-Cuesta MC. 2009. Heterologous production of methionine-gamma-lyase from *Brevibacterium linens* in *Lactococcus lactis* and formation of volatile sulfur compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2326-2332.

Hasper HE, de Kruijff B, Breukink E. 2004. Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry* 43:11567-11575

Hazebrouck S, Oozeer R, Adel-Patient K, Langella P, Rabot S, Wal JM and Corthier G. 2006. Constitutive delivery of bovine beta-lactoglobulin to the digestive tracts of gnotobiotic mice by engineered *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7460-7467.

He Y, Honnen WJ, Krachmarov C P, Burkhart M, Kayman SC, Corvalan J and Pinter A. 2002. Efficient isolation of novel human monoclonal antibodies with neutralizing activity against HIV-1 from transgenic mice expressing human Ig loci. *Journal of Immunology* 169(1):595-605.

Hernandez HM, Figueredo M, Garrido N, Sanchez L and Sarracent J. 2005. Intranasal immunisation with a 62 KDa proteinase combined with cholera toxin or cpg adjuvant protects against *Trichomonas vaginalis* genital tract infections in mice. *International Journal for Parasitology* 35, 1333-1337.

Hernandez I, Molenaar D, Beekwilder J, Bouwmeester H and Vlieg J. 2007. Expression of plant flavor genes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1544-1552.

Heyndrickx L, Janssens W, Coppens S, Vereecken K, Willems B, Franssen K, Colebunders R, Vandenbruaene M, van der Groen G. 1998. HIV type 1 C2V3 env diversity among Belgian individuals. *AIDS Research and Human Retroviruses* 14: 1291-1296.

Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Vander Auwera G, Coppens S, Vereecken K, De Witte K, Van Rampelbergh R, Kahindo M, Morison L, McCutchan FE, Carr JK, Albert J, Essex M, Goudsmit J, Asjo B, Salminen M, Buve A, van Der Groen G. 2000. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. *Journal of Virology* 74:363–370.

Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm AM. 1992. Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiology* 184: 157-79.

Hols P, Kleerebezem M, Schanck AN, Ferain T, Hugenholtz J, Delcour J, de Vos WM. 1999. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nature Biotechnology* 17:588–592.

Hone DM. 1991. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9,810-816.

Hone DM, Wu SG, Powell RJ, Pascual DW, Vancott J, Mcghee J, Fouts TR, Tuskan RG and Lewis GK. 1996. Optimization of live oral *Salmonella*-HIV-1 vaccine vectors for the induction of hiv-specific mucosal and systemic immune responses. *Journal of Biotechnology* 44, 203-207.

Hovav AH, Cayabyab MJ, Panas MW, Santra S, Greenland J, Geiben R, Haynes B, Jacobs WR and Letvin NL. 2007. Rapid memory CD8 T-lymphocyte induction through priming with recombinant *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Virology* 81:74–83.

Hu Q, Trent JO, Tomaras GD, Wang Z, Murray JL, Conolly SM, Navenot JM, Barry AP, Greenberg ML and Peiper SC. 2000. Identification of env determinants in V3 that influence the molecular anatomy of CCR5 utilization. *Journal of Molecular Biology* 302:359–375.

Huang CF, Wang CC, Wu TC, Chu CH and Peng HJ. 2007. Effect of sublingual administration with a native or denatured protein allergen and adjuvant cpg oligodeoxynucleotides or cholera toxin on systemic T(h)2 immune responses and mucosal immunity in mice. *Annals of Allergy Asthma and Immunology* 99, 443-452.

Huang C F, Wang CC, Wu TC, Wu KG, Lee CC and Peng HJ. 2008. Neonatal sublingual vaccination with *Salmonella* proteins and adjuvant cholera toxin or cpg oligodeoxynucleotides induces mucosal and systemic immunity in mice. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 46, 262-271.

Imaoka K, Miller CJ, Kubota M, Mcchesney MB, Lohman B, Yamamoto M, Fujihashi K, Someya K, Honda M, Mcghee JR and Kiyono H. 1998. Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55(gag) and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissue. *Journal of Immunology* 161, 5952-5958.

Isaka M, Yasuda Y, Mizokami M, Kozuka S, Taniguchi T, Matano K, Maeyama J, Mizuno K, Morokuma K, Ohkuma K, Goto N and Tochikubo K. 2001. Mucosal immunization against hepatitis b virus by intranasal co-administration of recombinant hepatitis b surface antigen and recombinant cholera toxin b subunit as an adjuvant. *Vaccine* 19, 1460-1466.

Isaka M, Yasuda Y, Taniguchi T, Kozuka S, Matano K, Maeyama J, Morokuma K, Ohkuma K, Goto N and Tochikubo K. 2003. Mucosal and systemic antibody responses against an acellular pertussis vaccine in mice after intranasal co-administration with recombinant cholera toxin b subunit as an adjuvant. *Vaccine* 21, 1165-1173.

Isaka M, Komiya T, Takahashi M, Yasuda Y, Taniguchi T, Zhao YQ, Matano K, Matsui H, Maeyama JI, Morokuma K, Ohkuma K, Goto N and Tochikubo K. 2004. Recombinant cholera toxin B subunit as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal administration with diphtheria pertussis tetanus combination vaccine. *Vaccine* 22:3061-3068.

Isaka M, Zhao YQ, Nobusawa E, Nakajima S, Nakajima K, Yasuda Y, Matsui H, Hasegawa T, Maeyama JI, Morokuma K, Ohkuma K and Tochikubo K. 2008. Protective effect of nasal immunization of influenza virus hemagglutinin with recombinant cholera toxin B subunit as a mucosal adjuvant in mice. *Microbiology and Immunology* 52:55-63.

Izhar M. 1990. Moderate immunodeficiency does not increase susceptibility to *Salmonella typhimurium* a live vaccines in mice. *Infection and Immunity* 58:2258-2261.

Janoff E, Smith P. 2001. Emerging concepts in gastrointestinal aspects of VIH-1 pathogenesis and management. *Gastroenterology* 120:607-621.

Jiang SS, Rasmussen RA, Nolan KM, Frankel FR, Lieberman J, McClure HM, Williams KM, Babu US, Raybourne RB, Strobert E and Ruprecht RM. 2007. Live attenuated *Listeria monocytogenes* expressing Hiv gag: immunogenicity in Rhesus monkeys. *Vaccine* 25:7470-7479.

Joseph J, Saubi N, Pezzat E and Gatell JM. 2006. Progress towards an HIV vaccine based on recombinant Bacillus Calmette-Guerin: failures and challenges. *Expert Review of Vaccines* 5:827-838.

Kang SM, Yao Q, Guo LZ and Compans RW. 2003. Mucosal immunization with virus like particles of simian immunodeficiency virus conjugated with cholera toxin subunit B. *Journal of Virology* 77:9823-9830.

Katellaris PH. 1996. Probiotic control of diarrhea disease. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 5:39-43.

Kato K, Sato H and Takebe Y. 1999. Role of naturally occurring basic amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 subtype E envelope V3 loop on viral coreceptor usage and cell tropism. *Journal of Virology* 73:5520-5526.

Kawahara M, Hashimoto A, Toida I and Honda M. 2002a. Oral recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin expressing HIV-1 antigens as a freeze-dried vaccine induces long term, HIV specific mucosal and systemic immunity. *Clinical Immunology* 105:326-331.

Kawahara M, Matsuo K, Nakasone T, Hiroi T, Kiyono H, Matsumoto S, Yamada T, Yamamoto N and Honda M. 2002b. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (Bcg) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1V3 antigen. *Vaccine* 21:158-166.

Kawai Y, Kusnadi J, Kemperman R, Kok J, Ito Y, Endo M. 2009. DNA sequencing and homologous expression of a small peptide conferring immunity to gassericina, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. *Applied and Environmental Microbiology* 75:1324-1330.

Kgatle M, Williamson A and Chin'ombe N. 2008. Expression of HIV-1 subtype C tat and nef in *Salmonella* vaccine vector. *AIDS Research and Human Retroviruses* 24:88-88.

Kim TG, Gruber A and Langridge WHR. 2004. HIV-1 gp120 V3 cholera toxin B subunit fusion gene expression in transgenic potato. *Protein Expression and Purification* 37:196-202.

Kim HJ, Kim JK, Seo SB and Lee HJ. 2007. Intranasal vaccination with peptides and cholera toxin subunit B as adjuvant to enhance mucosal and systemic immunity to respiratory syncytial virus. *Archives of Pharmacal Research* 30:366-371.

Kimoto H, Mizumachi K, Okamoto T and Kurisaki J. 2004. New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response. *Microbiology and Immunology* 48:75-82.

Kleerebezem M, Beerthuyzen MM, Vaughan EE, de Vos WM, Kuipers OP. 1997. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus spp.* *Applied and Environmental Microbiology* 63:4581-4584.

Kleerebezem M, de Vos WM, Kuipers OP. 1999. The lantibiotics nisin and subtilin act as extracellular regulators of their own biosynthesis. In: Dunny GM, Winans SC (eds) cell-cell signalling in bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Klein MR, Veenstra J, Holwerda AM. 1997. Gag-specific immune responses after immunization with p17/p24:Ty virus like particles in HIV type 1 seropositive individuals. *AIDS Research Human Retroviruses* 13:393-399.

Klein M. 2001. Current progress in the development of human immunodeficiency virus vaccines: research and clinical trials. *Vaccine* 19:2210-2215.

Koenig S, Yasutomi Y, Haun SS, Stover CK, Hanson MS, Galen JE, Vigil CL, Benson L, Cairns JS, Hallberg PL, Walsh WD, Jackson RK, Conard P, Conley AJ, Emini EA, Letvin NL and Fuerst TR. 1993. *Bacillus Calmette-Guerin* (Bcg) as a live vector system for the induction of immunity to HIV and SIV. *AIDS Research and Human Retroviruses* 9:S28-S28.

Korber B, Kuiken C, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors J and Sodroski J. 1998. Human Retroviruses and AIDS. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, group T-10, Los Alamos National Laboratory, New Mexico, U.S.A.

Kotloff KL. 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*. *Infection and Immunity* 64:3055-3061.

Kotton CN, Lankowski AJ, Scott N, Sisul D, Chen LM, Raschke K, Borders G, Boaz M, Spentzou A, Galan JE and Hohmann EL. 2006. Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella* enterica serovar typhimurium delivering an HIV-1 gag antigen via the *Salmonella* type III secretion system. *Vaccine* 24:6216-6224.

Kowalski M, Potz J, Basiripour L, Dorfman T, Goh WC, Terwilliger E, Dayton A, Rosen G, Haseltine WA and Sodroski J. 1987. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type I. *Science* 237:1351-1355.

Kubota M, Miller CJ, Imaoka K, Kawabata S, Fujihashi K, Mcghee JR and Kiyono H. 1997. Oral immunization with simian immunodeficiency virus p55 (Gag) and cholera toxin elicits both mucosal IgA and systemic IgG immune responses in nonhuman primates. *Journal of Immunology* 158:5321-5329.

Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PG, Luesink EJ, de Vos WM. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 270:27299-27304.

Kuipers OP, de Ruyter PGGA, Kleerebezem M, de Vos WM. 1998. Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 64:15-21.

Kunji ER, Slotboom DJ, Poolman B. 2003. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1610:97-108.

Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J and Hendrickson W A. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-659.

Kwong PD, Wyatt R, Sattentau QJ, Sodroski J and Hendrickson WA. 2000. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 74:1961-1972.

Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, and Langella P. 1998. A nine residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 180:1895-1903.

Lee MH, Tabaqchali S. 2001. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine* 19:3927-3931.

Lee JS, Poo H, Han DP, Hong SP, Kim K, Cho MW. 2006. Mucosal immunization with surface displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice. *Journal of Virology* 80:4079-4087.

Lei Lu and Walker W. 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(suppl):1124S-1130S.

Li Z, Zhou C and Frankel FR. 2008. *Listeria* is superior to DNA as a priming vector for Mva or Adenovirus as an HIV vaccine. *AIDS Research and Human Retroviruses* 24:142-142.

Liu JR, Yu B, Liu FH, Cheng KJ and Zhao X. 2005. Expression of rumen microbial fibrolytic enzyme genes in probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:6769-6775.

Liu X, Lagenaur LA, Simpson DA, Essenmacher KP, Frazier-Parker CL, Tsai YLD, Rao SS, Hamer DH, Parks TP, Lee PP and Xu Q. 2006. Engineered vaginal *Lactobacillus* strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:3250-3259.

Lomada D, Gambhira R, Nehete PN, Guhad FA, Chopra AK, Peterson JW and Sastry KJ. 2004. A two-codon mutant of cholera toxin lacking adp-ribosylating activity functions as an effective adjuvant for eliciting mucosal and systemic cellular immune responses to peptide antigens. *Vaccine* 23:555-565.

Luna Cruz I, Rodríguez Padilla C, Tamez Guerra R, Alcocer JM. 2003. Desarrollo de vacunas basadas en bacterias lácticas para inducir inmunidad en mucosas contra VIH. *Ciencia UANL* VI:1:31-38.

Maassen CBM, Holten NC, Balk F, Bak GJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJA, Claassen E. 2000. Strain dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strain. *Vaccine* 18:2613-2623.

Maeyama J, Isaka M, Yasuda Y, Matano K, Kozuka S, Taniguchi T, Ohkuma K, Tochikubo K and Goto N. 2001. Cytokine responses to recombinant cholera toxin B subunit produced by *Bacillus brevis* as a mucosal adjuvant. *Microbiology and Immunology* 45:111-117.

Maggi T, Spinosa M, Ricci S, Medaglini D, Pozzi G and Oggioni MR. 2002. Genetic engineering of *Streptococcus gordonii* for the simultaneous display of two heterologous proteins at the bacterial surface. *Fems Microbiology Letters* 210:135-141.

Maldonado GC and Perdigo G. 2006. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clinical and Vaccine Immunology* 13:219-226.

Marinaro M, Staats HF, Hiroi T, Jackson RJ, Coste M, Boyaka PN, Okahashi N, Yamamoto M, Kiyono H, Bluethmann H, Fujihashi K and Mcghee JR. 1995. Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T-helper 2 (Th2) cells and IL-4. *Journal of Immunology* 155:4621-4629.

Marjorie R. 2000. IgG surfaces as an important component in mucosal protection. *Nature Medicine* 6:129-130.

Martínez JM, Kok J, Sanders JW and Hernández PE. 2000. Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide directed antibodies. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3543-3549.

Mascola JR, Stiegler G, Van Cott T, Katinger H, Carpenter C, Handson C, Beary H, Hayes D, Frankel S, Birx D, Lewis M. 2000. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nature Medicine* 154-157.

Masopust D, Jiang J and Lefrancoist L. 2001. Direct analysis of the dynamics of the intestinal mucosa CD8 T cell response to systemic virus infection. *Journal of Immunology* 166:2348-56.

Mata M, Frankel FR and Paterson Y. 1996. Cd8(+) ctl response to HIV gag delivered by *Listeria monocytogenes* in the H-2(D) mouse. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology* 10:476-476.

Mata M, Frankel FR and Paterson Y. 1999. Murine T cell responses to HIV gag delivered by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology* 13:A635-A635.

Mata M, Yao ZJ, Zubair A, Syres K and Paterson Y. 2001. Evaluation of a recombinant *Listeria monocytogenes* expressing an HIV protein that protects mice against viral challenge. *Vaccine* 19:1435-1445.

Matsuo K, Yoshikawa T, Asanuma H, Iwasaki T, Hagiwara Y, Chen Z, Kadowaki S, Tsujimoto H, Kurata T and Tamura S. 2000. Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin). *Vaccine* 18:2713-2722.

McCutchan F. 2000. Understanding the genetic diversity of HIV. *AIDS* 14(suppl):S31-S44.

Medina M, Villena J, Salva S, Vintini E, Langella P and Alvarez S. 2008. Nasal administration of *Lactococcus lactis* improves local and systemic immune responses against *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology and Immunology* 52:399-409.

Mercenier A. 1999. Acid lactic bacteria as live vaccine. In *Probiotics: A critical review* (Tannock, G.W. ed.) pp113-127, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.

Merrill KW, Pietrobon PJF, Fujihashi K, Mcghee JR and Kiyono H. 1993. Mucosal vaccine for AIDS oral immunization with HIV gp120 in combination with liposome and cholera toxin induces antigen specific IgA producing cells. *AIDS Research and Human Retroviruses* 9:S36-S36.

Mestecky J, McGhee JR. 1992. Prospects for human mucosal vaccines. *Advances in Experimental Medicine Biology* 327:13-23.

Mierau I and Kleerebezem M. 2005. 10 Years of the nisin controlled gene expression system (nice) in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68:705-717.

Milich L, Margolin BH and Swanstrom R. 1997. Patterns of amino acid variability in NSI like and SI like V3 sequences and a linked change in the CD4 binding domain of the HIV-1 env protein. *Virology* 239:108-118.

Mitsuoka T. 1975. The significance of intestinal bacterial flora. *Clinical Bacteriology (Japan)* 2:55-97.

Mitsuoka T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria and Microflora* 1:3-24.

Mitsuoka T. 1996. Intestinal flora and human health. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 5:2-9.

Miyoshi A, Bermudez-Humaran LG, Ribeiro LA, Le Loir Y, Oliveira SC, Langella P and Azevedo V. 2006. Heterologous expression of *Brucella abortus* GroEl heat shock protein in *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories* 5:14

Monedero V, Rodriguez-Diaz J, Viana R, Buesa J and Perez-Martinez G. 2004. Selection of single chain antibodies against the VP8 subunit of rotavirus VP4 outer capsid protein and their expression in *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology* 70:6936-6939.

Montavon C, Toure-Kane C, Liegeois F, Mpoudi E, Bourgeois A, Vergne L, Perret JL, Boumah A, Saman E, Mboup S, Delaporte E, Peeters M. 2000. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in west and west central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 23:363-374.

Morrow CD, Porter DC, Ansardi DC, Moldoveanu Z, Fultz PN. 1994. New approaches for mucosal vaccines for AIDS: encapsidation and serial passages of poliovirus replicons that express HIV-1 proteins on infection. *AIDS Research Human Retroviruses* 10 Suppl 2:S61-6.

Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD. 1985. Nucleic acid structure and expresión of the human AIDS/lynphadenopathy retrovirus. *Nature* 313:450-458.

Muster T, Ferko B, Klima A, Purstscher M, Trkola A, Schlz P, Grassauer A, Engelhardt O, Garcia A, Palese P. 1995. Mucosal model of immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a chimeric influenza virus. *Journal of Virology* 69:6678-6686.

Nagler C. 2001. Man the barrier! strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature Reviews Immunology* 1:59-67.

Newell M. 1998. Mechanisms and timing of mother to child transmisi3n of HIV-1. *AIDS* 12:831-837.

Nierop MN, Godefrooij J and Kleerebezem M. 2008. Heterologous expression of the pneumococcal serotype 14 polysaccharide in *Lactococcus lactis* requires lactococcal *epsABC* regulatory genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74:912-915.

Noriega FR. 1994. Construction and characterization of attenuated Δ aro A Δ virG *Shigella flexneri* 2^a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. *Infection and Immunity* 62:5168-5172.

Norton PM, Le Page RWF, Wells JM. 1995. Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vacine delivery system. *Folia Microbiologica (Praha)* 40:225-30.

Norton PM, Wells HW, Brown G, Macpherson AM and Le Page RWF. 1997. Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* JM expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* 15:616-619.

Osek J and Truszczynski M. 1995. Mucosal immunity with implications for use in developing a new generation of vaccines. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* 49:469-86.

Papadakis K. 2000. The role of thymus expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *Journal Immunology* 165:5069-76.

Peeters M, Sharp P. 2000. The genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* 14 Suppl 3:S129-40.

Peters C, Peng XH, Douven D, Pan ZK and Paterson Y. 2003. The induction of HIV gag-specific cd8(+) T cells in the spleen and gut associated lymphoid tissue by parenteral or mucosal immunization with recombinant *Listeria monocytogenes* HIV gag. *Journal of Immunology* 170:5176-5187.

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. 1997. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology* May;3068-72.

Pirofski LA and Casadevall A. 1998. Use of licensed vaccines for active immunization of the immunocompromised host. *Clinical Microbiology Reviews* Jan:1-26.

Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MIM, Goudsmit J and Paxton WA. 2001. N linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *Journal of Biological Chemistry* 276:13433-13441.

Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Meyer B, Muller H, Krausslich HG and Schreiber M. 2001. Loss of N-linked glycans in the V3 loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology* 11:11-19.

Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H and Schreiber M. 2002. The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology* 304:70-80.

Porgador A, Staats HF, Faiola B, Gilboa E and Palker TJ. 1997. Intranasal immunization with ctl epitope peptides from HIV-1 or ovalbumin and the mucosal adjuvant cholera toxin induces peptide specific ctls and protection against tumor development in vivo. *Journal of Immunology* 158:834-841.

Poussier P, Edouard P, Lee C, Binnie M and Julios M. 1992. Thymus-independent development and negative selection of Tcell expressing evidence for distinct circulation patterns of gut and thymus derived T lymphocytes. *Journal Experimental Medicine* 176:187-199.

Pouwels PH, Leer RJ, Boersma WJ. 1996. The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *Journal of Biotechnology* 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. 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Journal of Food Microbiology* 26:41(2):155-67.

Powell RJ. 1996. Molecular approach to the control of infectious disease. In: Introduction of eukaryotic expression cassettes into animal cells using a bacterial vector delivery system, *Vaccine* 96:183-187, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Promkhatkaew D, Matsuo K, Pinyosukhee N, Thongdeejaroen W, Leang-Aramgul P, Sawanpanyalert P and Warachit P. 2009a. Prime-Boost vaccination using recombinant *Mycobacterium bovis* Bcg and recombinant vaccinia virus harboring HIV-1 CRF01-AE gag in mice: influence of immunization routes. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 40:273-281.

Promkhatkaew D, Pinyosukhee N, Thongdeejaroen W, Sutthent R, Sawanpanyalert P and Warachit P. 2009b. Enhancement of cell mediated immune response in mice by whole HIV-1 gag in *Mycobacterium bovis* Bcg as a live vaccine candidate. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 40:113-122.

Pusch O, Boden D, Hannify S, Lee F, Tucker LD, Boyd MR, Wells JM, and Ramratnam B. 2005. Bioengineering lactic acid bacteria to secrete the HIV-1 virucide cyanovirin. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 40:512-520.

Ranganathan UDK, Larsen MH, Kim J, Porcelli SA, Jacobs WR and Fennelly GJ. 2009. Recombinant pro-apoptotic *Mycobacterium tuberculosis* generates cd8(+) T cell responses against human immunodeficiency virus type 1 env and *M. tuberculosis* in neonatal mice. *Vaccine* 28:152-161.

Rayevskaya MV and Frankel FR. 2000. Induction of systemic and mucosal immunity against HIV-1 gag using a hyper-attenuated strain of *Listeria monocytogens*. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology* 14:A942-A942.

Ribeiro LA. 2002. Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/112 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Applied and Environmental Microbiology* 68:910-916.

Robinson K. 1997. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nature Biotechnology* 15:653-657.

Robinson J, Blanchard TG, Levine AD, Emancipator SN and Lamm ME. 2001. A mucosal IgA mediated excretory immune system in vivo. *Journal of Immunology* 166:3688-92.

Rusche JR, Javaherian K, McDanal C, Petro J, Lynn DL, Grimaila R, Langlois A, Gallo RC, Arthur LO, Fischinger PJ, Bolognesi DP, Putney SD and Matthews TJ. 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus infected cells bind a 24 amino acid sequence of the viral envelope gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 85:3198-3202.

Saito M, Otake S, Ohmura M, Hirasawa M, Takada K, Mega J, Takahashi I, Kiyono H, Mcghee JR, Takeda Y and Yamamoto M. 2001. Protective immunity to streptococcus mutans induced by nasal vaccination with surface protein antigen and mutant cholera toxin adjuvant. *Journal of Infectious Diseases* 183:823-826.

Salas EJ. 2002. Impacto de los tratamientos antirretrovirales en la patología oral de pacientes VIH positivos. Thesis (PhD). Universitat de Barcelona.

Sambrook J and Rusell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G and Parmentier M. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-725.

Samuelson P, Hasson M, Aalborg N, Andreoni C, Gotz F, Bachi T, Nguyen H, Binz H, Huyen M, Stahl S. 1995. Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology* 177:1470-1476.

Sanchez AE, Aquino G, Ostoa-Saloma P, Laclette JP and Rocha-Zavaleta L. 2004. Cholera toxin B subunit gene enhances mucosal immunoglobulin A, Th1-type, and CD8(+) cytotoxic responses when coadministered intradermally with a DNA vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11:711-719.

Sanchez J, Borrero J, Gomez-Sala B, Basanta A, Herranz C, Cintas LM and Hernandez PE. 2008. Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2471-2479.

Schonning K, Jansson B, Olofsson S and Hansen JE. 1996a. Rapid selection for an N-linked oligosaccharide by monoclonal antibodies directed against the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 77:753-758.

Schonning K, Jansson B, Olofsson S, Nielsen JO and Hansen JS. 1996b. Resistance to V3 directed neutralization caused by an N-linked oligosaccharide depends on the quaternary structure of the HIV-1 envelope oligomer. *Virology* 218:134-140.

Shalaby WS. 1995. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. *Clinical Immunology and Immunopathology* 74:127-34.

Shata MT, Reitz MS, Devico AL, Lewis GK and Hone DM. 2001. Mucosal and systemic HIV-1 env-specific Cd8(+) T-cells develop after intragastric vaccination with a *Salmonella* env DNA vaccine vector. *Vaccine* 20:623-629.

Shaw DM, Gaerthe B, Leer RJ, Van Der Stap JGMM, Smittenaar C, Heijne Den MJ. 2000. Engineering the microflora to vaccinate the mucosa: serum immunoglobulin G responses and activated draining cervical lymph nodes following mucosal application of tetanus toxin fragment C expressing *Lactobacilli*. *Immunology* 100:510-518.

Shebannavar S, Das SK, Kataria JM and Hosamani M. 2007. Cholera toxin adjuvant enhances the protective efficacy of newcastle disease vaccine when administered by intranasal route. *Indian Journal of Animal Sciences* 77:126-128.

Shimizu N, Haraguchi Y, Takeuchi Y, Soda Y, Kanbe K and Hoshino H. 1999. Changes in and discrepancies between cell tropisms and coreceptor uses of human immunodeficiency virus type 1 induced by single point mutations at the V3 tip of the env protein. *Virology* 259:324-333.

Sizemore DR. 1995. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA mediated immunization. *Science* 270:299-302.

Smith PD and Wahl SM. 1999. Immunobiology of mucosal HIV-1 infection. *Mucosal immunology*, 2 ed. San Diego: Academic.

Someya K, Dayaraj C, Yasushi A, Tadashi N, Matsuo K, Burda Yamamoto H, Yoshino N, Kaizu M, Ando S, Okuda K, Zolla-Pazner S, Yamazaki S, Yamamoto N and Honda M. 2005. Vaccination of Rhesus macaques with recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin env V3 elicits neutralizing antibody mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3 motif. *Journal of Virology* 79:1452-1462.

Sousa R, Halper J, Zhang J, Lewis SJ and Li WIO. 2008. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supernatants on body weight and leptin expression in rats. *Bmc Complementary and Alternative Medicine* 8:5

Stanfield RL, Gorny MK, Williams C, Zolla-Pazner S and Wilson IA. 2004. Structural rationale for the broad neutralization of HIV-1 by human monoclonal antibody 447-52D. *Structure* 12(2):193-204.

Steidler L, Wells JM, Raeymaekers A, Vandekerckhove JL, Fiers W and Remaut E. 1995. Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1627-1629.

Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut ER, Le Page WF and Wells JM. 1998. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infection and Immunity* 66:3183-3189.

Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting Interleukin-10. *Science* 289:1352-1355.

Stover CK, Delacruz VF, Hatfull GF, Burlein JE, Bennett LT, Benson LA, Lee MH, Franchini G, Young JF, Jacobs WR, Bloom BR and Fuerst TR. 1991. Development and use of live recombinant Bcg vaccine vectors for expression of HIV-1 and HIV-2 proteins. *AIDS Research and Human Retroviruses* 7:152-152.

Strauss A and Gotz F. 1996. In vivo immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*. *Molecular Microbiology* 21:491-500.

Stutz H, Powles R, Shephard EG and Williamson A. 2009. Priming with recombinant Bcg expressing HIV-1 gag or RT and boosting with recombinant MVA induces an effective immune response in mice. *Retrovirology* 6:167-170.

Su-Jung K, Do YJ, Chae HY and Young HK. 2006. Expression of *Helicobacter pylori* cag12 gen in *Lactococcus lactis* MG1363 and its oral administration to induce systemic anti-Cag12 immune response in mice. *Applied and Microbiology Biotechnology* 72:462-470.

Sun QZ, Li ZJ, Li J, Wang YT, Zheng JD, Zhang XA. 2009. Secretion expression of cholera toxin B subunit in food-grading *Lactococcus lactis* expression system. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 30:1288-91.

Suphaphiphat P, Thitithanyanont A, Paca-Uccaralertkun S, Essex M and Lee TH. 2003. Effect of amino acid substitution of the V3 and bridging sheet residues in human immunodeficiency virus type 1 subtype C gp120 on CCR5 utilization. *Journal of Virology* 77(6):3832-3837.

Suzuki K. 2000. Gut cryptopatches: direct evidence for extrathymic anatomical sites for intestinal T Lymphopoiesis. *Immunity* 13:691-702.

Tebit DM, Zekeng L, Kaptue L, Salminen M, Krausslich HG and Herchenroder O. 2002. Genotypic and phenotypic analysis of HIV type 1 primary isolates from western Cameroon. *AIDS Research and Human Retroviruses* 18:39-48.

The Jordan Report. 1998. Division of microbiology and infectious diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. pp 66-68.

Trauger R, Ferre F, Daigle AE. 1994. 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. *Journal of Infectious Diseases* 169:1256-1264.

Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ and Moore JP. 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384:184-187.

Trujillo JR, Wang WK, Lee TH and Essex M. 1996. Identification of the envelope V3 loop as a determinant of a CD4- negative neuronal cell tropism for HIV-1. *Virology* 217:613-617.

Turner MS and Giffard PM. 1999. Expression of *Chlamydia psittaci* and human immunodeficiency virus derived antigens on the cell surface of *Lactobacillus fermentum* BR11 as fusions to BspA. *Infection and Immunity* 67:5486-548.

Vajdy M and Lycke NY. 1992. Cholera toxin adjuvant promotes long term immunological memory in the gut mucosa to unrelated immunogens after oral immunization. *Immunology* 75:488-492.

Van De Guchte M, Kodde J, Van Der Vossen JMBM, Kok J and Venema G. 1990. Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. *Applied and Environmental Microbiology* 56:2606-2611.

Van de Wiggert J, Mason PR, Ray CS, Gwanzura L, Maphosfere C, Katzenstein D, Padian NS. 1996. Use of intravaginal preparations, presence of *Lactobacillus* in the vagina, and risk for HIV in Zimbabwe women. Zimbabwe AIDS Prevention Project University of Zimbabwe (ZAPP). International Conference AIDS. 11:34.

Van Ginkei FW. 1999. Partial IgA deficiency with increased Th2 type cytokines in TGF- β 1 Knockout mice. Journal of Immunology 163:1951-1957.

Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV. 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4 T cell depletion and viral replication in SIV infection. Science 280:427-431.

Vecino WH, Morin PM, Agha R, Jacobs WR and Fennelly G J. 2002. Mucosal DNA vaccination with highly attenuated shigella is superior to attenuated *Salmonella* and comparable to intramuscular DNA vaccination for T cells against HIV. Immunology Letters 82:197-204.

Vidal N, Martine P, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B and Delaporte E. 2000. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the democratic republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. Journal of Virology 74:10498-10507.

Villatoro-Hernandez J, Loera-Arias MJ, Gamez-Escobedo A, Franco-Molina M, Gomez-Gutierrez JG, Rodriguez-Rocha H, Gutierrez-Puente Y, Saucedo-Cardenas O, Valdes-Flores J and Montes-De-Oca-Luna R. 2008. Secretion of biologically active interferon-gamma inducible protein-10 (Ip-10) by *Lactococcus lactis*. Microbial Cell Factories 7.

Vincent T, DeVita Jr, Hellman S, Rosenberg S. 1997. AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. 4 Ed. Lippincott Raven. pp 29-39.

Vogel FR and Powell MF. 1995. A compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Vaccine Design. The subunit and adjuvant approach. Powell MF and Neuman MJ (Eds). Plenum Press, New York, pp. 141-228.

Wang WK, Dudek T, Zhao YJ, Brumblay HG, Essex M and Lee TH. 1998. CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 95:5740-5745.

Wang WK, Dudek T, Essex M and Lee TH. 1999. Hypervariable region 3 residues of HIV type 1 gp120 involved in CCR5 coreceptor utilization: therapeutic and prophylactic implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 96:4558-4562.

Wang WK, Lee CN, Dudek T, Chang SY, Zhao YJ, Essex M and Lee TH. 2000. Interaction between HIV type 1 glycoprotein 120 and CXCR4 coreceptor involves a highly conserved arginine residue in hypervariable region 3. *AIDS Research and Human Retroviruses* 16:1821-1829.

Wang K, Huang LH, Kong J and Zhang XW. 2008. Expression of the capsid protein of porcine circovirus type 2 in *Lactococcus lactis* for oral vaccination. *Journal of Virological Methods* 150:1-6.

Wassen L and Jertborn M. 2005. Kinetics of local and systemic immune responses after vaginal immunization with recombinant cholera toxin B subunit in humans. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:447-452.

Watanabe K, Joh T, Okayama N, Seno K, Tsuchida K, Takahashi N, Todoroki I, Yokoyama Y, Tochikubo K and Itoh M. 1999. Recombinant cholera toxin B subunit acts as a non-toxic and non-allergic adjuvant for the mucosal immunization against *Helicobacter pylori* in mice. *Gastroenterology* 116:G3663.

Wegmann U, Klein JR, Drumm I, Kuipers OP and Henrich B. 1999. Introduction of peptidase genes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* into *Lactococcus lactis* and controlled expression. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4729-4733.

Werning ML, Corrales MA, Prieto A, de Palencia PF, Navas J and Lopez P. 2008. Heterologous expression of a position 2-substituted (1->3)-beta-D-glucan in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 74:5259-5262.

Willem M. 1992. Gene expression system for lactic acid bacteria. *Current Opinión in Microbiology* 2:289-295.

Wiriyarat W, Sukpanichnant S, Sittisombut N, Ballachandra K, Promkhatkaew D, Butraporn R, Sutthent R, Boonlong J, Matsuo K, Honda M, Warachit P and Puthavathana P. 2005. Specific immune response and pathological findings in balb/c mice inoculated with recombinant Bcg expressing HIV-1 antigen. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 23:41-51.

Wollowski I, Taek J, Bakalinsky A, Neudecker CH, Pool ZB. 1999. Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. *American Society for Nutritional Science* 77-82.

Womack C, Roth W, Newmann C, Rissing P, Lovell R, Haburchak D, Essex M and Bond VC. 2001. Identification of non-B human immunodeficiency virus type 1 subtypes in rural Georgia. *Journal of Infectious Diseases* 183:138-42.

Wu SG, Pascual DW, Lewis GK and Hone DM. 1997. Induction of mucosal and systemic responses against human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 in mice after oral immunization with a single dose of a salmonella-HIV vector. *AIDS Research and Human Retroviruses* 13:1187-1194.

Wyatt R and Sodroski J. 1998 The human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoproteins: fusogens, antigens and immunogens. *Science* 280:1884-8.

Xin KQ, Hoshino Y, Toda Y, Igimi S, Kojima Y, Jounai N. 2003. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface bound HIV env. *Blood* 102:223-228.

Xu FF, Hong M and Ulmer JB. 2003. Immunogenicity of an HIV-1 gag DNA vaccine carried by attenuated *Shigella*. *Vaccine* 21:644-648.

Xu YG and Li YJ. 2007. Induction of immune responses in mice after intragastric administration of *Lactobacillus casei* producing porcine parvovirus VP2 protein. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7041-7047.

Yigang XU and Yijing LI. 2008. Construction of recombinant *Lactobacillus casei* efficiently surface displayed and secreted porcine parvovirus VP2 protein and comparison of the immune responses induced by oral immunization. *Immunology* 124:68-75.

Yoshino N, Fujihashi K, Hagiwara Y, Kanno H, Takahashi K, Kobayashi R, Inaba N, Noda M and Sato S. 2009. Co-administration of cholera toxin and apple polyphenol extract as a novel and safe mucosal adjuvant strategy. *Vaccine* 27:4808-4817.

Zegers ND, Kluter E, Van Der Stap H, Van Dura E, Van Dalen P, Shaw M, and Baillie L. 1999. Expression of the protective antigen of bacillus anthracis by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax. *Journal of Applied Microbiology* 87:309-14.

Zhang H, Orti G, Du Q, He J, Kankasa C, Bhat G and Wood C. 2002. Phylogenetic and phenotypic analysis of HIV type 1 env gp120 in cases of subtype C mother to child transmission. *AIDS Research Human Retroviruses* 18:1415-1423.

Zhang H, Fayad R, Wang X, Quinn D and Qiao L. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 gag specific mucosal immunity after oral immunization with papillomavirus pseudoviruses encoding gag. *Journal of Virology* 78:10249-10257.

Zhuang Z, Wu Z, Chen M and Wang PG. 2008. Secretion of human interferon- β 1b by recombinant *Lactococcus lactis*. *Biotechnology Letters* 30:1819-1823.

Zolla-Pazner S, Zhong P, Revesz K, Volsky B, Williams C, Nyambi P and Gorny MK. 2004. The cross clade neutralizing activity of a human monoclonal antibody is determined by the GPGR V3 motif of HIV-1. *AIDS Research Human Retroviruses* 20:1254-8.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Itza Eloisa Luna Cruz

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: INDUCCIÓN DE INMUNIDAD EN MUCOSAS CONTRA EL VIH MEDIANTE LA SECRECIÓN DEL ASA V3 FUSIONADA A LA SUBUNIDAD A₂B DE LA TOXINA DEL CÓLERA EN *Lactococcus lactis*.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud.

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 14 de Octubre de 1975, hija de Pedro Luna Cabriales y Fausta Cruz Delgado.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2000.

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunobiología en 2002.

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2010, y asistente de investigación en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Biología desde 2004.

Publicaciones: Itza Luna Cruz, Cristina Rodríguez Padilla, Reyes Tamez Guerra, Juan M Alcocer Gonzalez. 2003. Desarrollo de vacunas basadas en bacterias lácticas para inducir inmunidad en mucosas contra VIH. Ciencia UANL. Vol.VI:1 pp31-38.

Itza Luna Cruz, Roberto Montes de Oca, Cristina Rodríguez Padilla, Vicente Madrid Marina, Reyes Tamez Guerra, Juan Alcocer González. 2002. Desarrollo de vacunas usando bacterias lácticas: Construcción y Expresión de antígenos del VIH en *Lactococcus lactis*. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol.44:1pp249

Artículo enviado: Leny J. Álvarez-Araujo, Itza E. Luna-Cruz, Patricia Tamez-Guerra, Lydía G. Rivera-Morales, Laura Trejo-Ávila, Reyes S. Tamez-Guerra, Cristina Rodríguez-Padilla y J. M. Alcocer-González. Clonación y Expresión del fibroblasto FGF-10 humano en *Lactococcus lactis* mediante un sistema inducible controlado. Ciencia UANL.