



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Evaluación de la inmunogenicidad mucosa y
sistémica del péptido recombinante T1SP10
Aislado MN del VIH en ratones Balb/C.

T E S I S P R O F E S I O N A L

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

RUBEN FORTINO SALGADO SEGURA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

ASESOR: DR: JAVIER VARONA SANTOS



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunidad en Mucosas de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM. bajo la tutoría de la Dra. Leticia Moreno Fierros y la asesoría de Javier Varona Santos, con apoyo de CONACYT 43102M UNAM DGAPA PAPIIT.

A los que vendrán.

*De lo escrito yo amo sólo aquello que alguien escribe con sangre.
Escribe tu con sangre: y te darás cuenta de
que la sangre es espíritu.*

*Quién de vosotros puede a la vez reír y estar elevado?
Quién asciende a las montañas más altas se ríe de todas las tragedias,
fingidas o reales.*

*Cuanto mas quiere elevarse hacia la altura y hacia la luz,
Tanto mas fuertemente tienden sus raíces hacia la tierra,
Hacia abajo, hacia lo obscuro, lo profundo, -hacia el mal.*

*Mil metas ha habido hasta ahora,
Pues mil pueblos ha habido.
Sólo falta la cadena que ate las mil cervices,
Falta la única meta.*

A mi hijo
A mi esposa
A Mí

Agradecimientos:

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo, mostrándome con su ejemplo que la sencillez es muestra de grandeza, por sus enseñanzas y paciencia me ha permitido conocer un poco del complejo pero fascinante mundo de la investigación.

Al futuro Dr. Javier Varona Santos (El cubano) por su gran apoyo, ayuda y paciencia brindados durante el desarrollo de este trabajo y por transmitirme que las adversidades no son complicaciones insuperables y por que el atreverse a tomar retos y disfrutarlos engrandece.

A todos los compañeros del laboratorio de Inmunidad en Mucosas de la F.E.S. Iztacala, a la M. en C. Leticia Verdín, a la futura Dra. Rita Esquivel, a la futura Bióloga Maricela Carrasco, al M. en C. Marco Rodríguez, al Dr. Saúl Rojas, al Dr. Aldo Resendiz y al Dr, Maximiliano Ibarra, que me aportaron una gran enseñanza en mi desarrollo académico y personal.

Agradezco a mis padres, en especial a mi madre por su ejemplo de lucha y superación, por su apoyo y paciencia para ver realizada esta meta.

A mi esposa Atzin por tu gran apoyo, por tus enseñanzas, por decidir compartir tu vida conmigo y por eres la gotita que me llena el alma.

A mi campeón, mi amigo, mi valiente, mi angelito, mi diablito, mi viento despiadado, por que me has enseñado vivir al extremo, a ti Edahito.

A mis hermanos, Karen y Eduardo, por sus ánimos y su ejemplo.

A mis suegros (Hugo y Leonor Carreño) por su apoyo e interés en la realización de este trabajo.

A todos los familiares y amigos que me apoyaron, aconsejaron y no me dejaron caducar en esta meta.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme nuevos conocimientos y por que en ella forjé mi vida personal.

Índice

Índice de Figuras	2
Abreviaturas	3,4
Resumen	5
Introducción	6
Respuesta inmune en mucosas	6
Estrategias vacunales del HIV	9
Adyuvantes mucosales	11
Péptidos vacunales para el HIV	12
Péptido T1SP10 MN(A) y r T1SP10	13
Objetivos	15
Estrategia Experimental	16
Metodología	17
Obtención de r T1SP10	17
Purificación de rT1SP10	17
Cuantificación de r T1SP10	17
Obtención de Cry1Ac	18
Esquema de inmunización.	18
Obtención de muestras.	18
Análisis de la respuesta de Anticuerpos IgA, IgG e Isotipos	19
Análisis Estadístico.	20
Resultados	21
Electroforesis SDS-PAGE y WESTERN BLOT de r T1SP10.	21
Respuesta en suero de Abs IgG anti-ASA V3 y anti-r TISP10 MN(A)	22
Respuesta en suero de subclases IgG1 e IgG2A anti-ASA V3 y anti-r TISP10 MN(A)	24
Respuesta Mucosal en Intestino Grueso de abs IgG e IgA anti-r TISP10 MN(A) y anti-Cr1Ac .	27
Respuesta Mucosal en Vagina de IgG e IgGA anti-r TISP10 MN(A) y anti-Cry1Ac.	29
Discusión	31
Conclusiones	40
Bibliografía	41

INDICE DE FIGURAS

Fig.1. Diagrama Metodológico.	16
Fig.2. Respuesta de Abs IgG anti-ASAV3 y anti r T1SP10 en suero.	22
Fig.3. Respuesta de subclases IgG 1 e IgG 2A anti-ASAV3 y anti r T1SP10 en suero.	24
Fig.4. Respuesta de Abs IgG e IgA anti rT1SP10 y anti-Cry1Ac en intestino grueso.	27
Fig. 5. Respuesta de Abs IgG e IgA anti rT1SP10 y anti-Cry1Ac en vagina.	29

ABREVIATURAS

A492	Absorbancia a 492nm
Aa	Aminoacido
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Antigen presenting cell
ASC	Antibody secreting cell
B cell	B lymphocyte
<i>B. thuriengiensis</i>	<i>Bacillus thuriengiensis</i>
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
CCR5	CC chemochine receptor
CD	Cluster of differentiation
CD4bs	D4 Binding site
cDNA	complimentary DNA
CFA	Células formadoras de anticuerpos
CT	Toxina de cólera
CTLs	Cytotoxic T lymphocytes
CXCR4	CXC chemokine receptor 4
DCs	Dendritic cells
DLN	Daining lymph nodes
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNP	Dominio Principal de Neutralizacion.
DTH	Delayed type hypersensitivity
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacid
ELISA	Prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas
gag	Group antigen
GalCer	β-Galactosylceramide
GALT	Tejido linfoide asociado a intestinos
GI	Gastrointestinal
gp120	Surface envelope glycoprotein (120kD)
gp160	Precursor envelope glycoprotein (160kD)
gp41	Transmembrane envelope glycoprotein (41kD)
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HbSAG	Antígeno de membrana del virus de Hepatitis B
HIV-1/2	Human immunodeficiency virus type 1/2
HLA	Human leucocyte antigen
i.n.	Inmunización intranasal
i.p.=	Inmunizacionj Intraperitoneal
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN	Interferón
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M

IL	Interleucina
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Lc	Linfocitos
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
LP	Lámina propia
LT	lymphoid tissue
Mab	Monoclonal antibody
MadCAM-1	Molécula de adhesión celular adreína mucosa-1
MALT	Tejido linfocítico asociado a mucosas
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NALT	Tejido linfocítico asociado a nasofaringe
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS-T	Solución amortiguadora de fosfatos con Tween 20 al 0.05%
PCR	Polymerase chain reaction
pCry1Ac	Protoxina Cry1Ac
pIgA	Inmunoglobulina A polimérica
pIgR	Receptor Ig polimérico
PP	Placas de Peyer
R5	CCR5
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
SC	Componente secretor
SDS-PAGE	Geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SHIV	Simian-human immunodeficiency virus
SI	Syncytium-inducing
S-IgA	Inmunoglobulina A secretora
S-IgM	Inmunoglobulina M secretora
SIV	Simian immunodeficiency virus
T cell	T lymphocyte
Th	T helper
Th1/Th2	T helper cells type 1/2

Resumen

El número de personas que viven con el VIH en todo el mundo se estima en 40,3 millones en el 2005. El conocimiento de la biología y estructura de HIV-1 es de vital importancia para poder desarrollar una vacuna, ya que el tejido de mucosas es el principal sitio de transmisión del HIV y el mayor reservorio para la replicación. La obtención de una respuesta inmune en la mucosa detendría al virus antes del ingreso y su diseminación. Actualmente se están utilizando péptidos sintéticos lineales como potenciales vacunas sintéticas, el diseño de estos péptidos inmunogénicos que produzcan anticuerpos neutralizadores contra el HIV han derivado de glicoproteínas del HIV y SIV, particularmente en esta investigación se trabajó con un péptido que contiene la región hipervariable Asa V3 identificado como el dominio principal de neutralización (DPN) localizado en el tetrapéptido GPGRFY que es altamente conservado, el cual es la parte central del DPN.

En el presente trabajo se determinó la inmunogenicidad del péptido por sí solo y coadministrado con la protoxina Cry 1Ac y la CT como adyuvantes. Los resultados de este estudio demostraron que la administración del péptido rT1SP10 MN (A) es inmunogénico, y no requiere de adyuvante, ya que indujo altas respuestas de anticuerpos específicas IgG, IgG1 e IgG2A en suero y en secreciones de vagina e intestino grueso de IgG e IgA tanto por la inmunización intranasal como intraperitoneal y dichas respuestas en general fueron similares o mayores a las obtenidas al coadministrar el péptido con Cry1Ac o CT. Mientras que Cry1Ac y CT no presentaron efecto adyuvante, Cry1Ac por la ruta i.n, en general disminuyó marcadamente las respuestas de anticuerpos en suero y en mucosas, mientras que la ruta i.p. en algunos casos generó respuestas similares y en otros casos menores a las inducidas con el péptido solo. La CT en general indujo respuestas de anticuerpos similares a las obtenidas mediante la inmunización con el péptido solo. De hecho en todas las muestras analizadas (suero, lavados intestinales y vaginales) de los animales inmunizados con rT1SP10 MN(A) se detectaron respuestas de anticuerpos anti rT1SP10 MN(A), mientras que solo en suero se detectaron respuestas significativas de anticuerpos anti ASA V3. f), en suero y en lavados de intestino grueso en ratones inmunizados con rT1SP10 MN(A) se indujo una mayor respuesta de anticuerpos IgG en ambas rutas de inmunización, en los lavados vaginales IgG fue mayor a IgA por la ruta i.p, mientras que por la ruta intranasal la inmunización del péptido rT1SP10 MN(A) sólo o más CT indujo respuestas de IgA mayores a las de IgG, pero al coadministrar rT1SP10 MN(A) más Cry1AC se indujeron respuestas similares de ambos isotipos.

Introducción

El número de personas que viven con el VIH en todo el mundo ha alcanzado el nivel más elevado, y ha pasado de unas cifras estimadas de 37,5 millones en 2003 a 40,3 millones en el 2005. En ese último año, más de tres millones de personas fallecieron por causa de enfermedades relacionadas con el SIDA, y de ellas, más de 500 000 eran niños. Por tales motivos la importancia del conocimiento de la estructura y composición del HIV es de vital importancia para poder elucidar una posible vacuna. (134)

HIV es un virus que en su superficie está envuelto de púas llamadas trimeros que son esenciales en la entrada viral a las células. Éstos trimeros consisten en una compleja proteína de la cual se inicia la fijación de la glicoproteína GP120 a la superficie de la célula, y una proteína que abre la membrana, gp41; La superficie de la glicoproteína gp120 se encuentra glicosylada con carbohidratos que abarcan aproximadamente 40% a 50% del peso molecular. Está compuesta de cinco regiones constantes (C1–C5) intercalando con cinco regiones inconstantes (V1–V5) La vinculación virus-célula consiste en la interacción de Gp120 del HIV con los receptores moleculares CD4 y receptores de citocinas de la célula, El dominio CD4 (CD4bd) en la molécula de gp120 es una región conservada, región estructura-dependiente, es responsable de la interacción entre el virus y la molécula de CD4 en la superficie de células. (80, 131,103)

Se ha designado que esta interacción es eje del proceso de infección del HIV-1, se asume que anticuerpos específicos para el CD4bd serían particularmente eficaces para bloquear la infección, y, realmente, muchos de los anticuerpos monoclonales dirigidos a esta región neutralizan. (54,29)

La importancia de anticuerpos en la prevención de la infección de HIV-1 es muy importante, la respuesta más consistente de protección inmune contra las infecciones virales es la presencia de anticuerpos neutralizadores por lo cual se ha puesto énfasis en identificar anticuerpos que neutralicen al HIV-1. (23, 116,32),

Respuesta inmune en mucosas

El tejido de mucosas es el principal sitio de transmisión del HIV y el mayor reservorio para la replicación del mismo, el objetivo de la respuesta inmune en la mucosa es detener antes del ingreso y la diseminación viral, recientes estudios de la transmisión de HIV a través de la mucosa ayudan diseñar estrategias para aumentar la eficacia de una vacuna contra el HIV.

La mucosa gastrointestinal y vaginal juegan un papel fundamental en la enfermedad temprana de HIV sirviendo como sitio de entrada del virus (rectal o vaginal) (70,102), al inicio y al término de la transmisión el sitio predominante de replicación y amplificación del virus es el intestino grueso, y es el sitio inicial de la depleción de células T CD4 (intestino grueso) (140).

Por lo tanto el HIV debe ser considerado como una enfermedad del sistema inmune de mucosas. En particular, los estudios de infección de SIV en Rhesus macacos sugieren que, sin tener en cuenta la ruta de infección, la mucosa gastrointestinal, no el tejido linfoide periférico, inicialmente y predominantemente es el sitio de infección de HIV-1/SIV, indicado por la acumulación local temprana de linfocitos infectados de SIV y por una alta carga viral en la mucosa intestinal (140). En la inoculación intravaginal temprana en los macacos (durante los primeros 2–7 días), el SIV se localiza en el tejido mucosal (endocervical) sin diseminarse al sistema circulatorio (128,150). Se ha sugerido que una vacuna que induzca una inmunidad local, en particular de CTL CD8, puede controlar localmente la replicación viral dentro de los tejidos antes que se de una diseminación sistémica.

Se ha demostrado que la mucosa inducida localmente por CTL, puede protegerse contra el virus, se ha demostrado que la inmunización en mucosas de macacos con un péptido vacunal de HIV/SIV es más eficaz contra SHIV. Estos estudios de protección indujeron CTL CD8 locales, el anticuerpo en la superficie de la mucosa también puede contribuir a la protección contra la transmisión mucosal de SIV (5, 8, 11,87).

La transmisión natural de HIV termina en la superficie de la mucosa, y la prevención de la transmisión a través de la mucosa es fundamental para el desarrollo de una vacuna para HIV. Estudios en macacos con SIV sugieren que la infección HIV/SIV ocurre también a través del orificio faringuel, cervical-vaginal, y en la alta mucosa gastrointestinal (70). En la ausencia de mucosa perturbada por algún trauma, las rutas propuestas de entrada del HIV-1 en la mucosa sana son la lámina propia incluyendo células M, células dendríticas, y células del epitelio (102).

La entrada de HIV/SIV por la lamina propia de la mucosa es mediada por células M (células especializadas del epitelio), las células dendríticas, y células del epitelio. La infección de SIV a través de la cavidad oral es una infección rápida de las amígdalas que son una fuente rica de células M, sugiriendo que las células M suben y transportan el SIV. Las células M pueden mediar el transporte del antígeno en el intestino, pero están ausentes en la mucosa vaginal. Las células dendríticas vinculan HIV-1 gp120 a través de la señal-DC y pueden capturar entre las uniones del epitelio HIV/SIV y diseminarlo a los órganos linfoides. Este mecanismo puede predominar en el tracto genital, y subepitelial que es el mayor lugar de repetición viral después de la infección Cervico-vaginal de SIV. Las células HIV-infectadas pueden cruzar la barrera epitelial por transcitosis en el intestino grueso, que expresa galactoceramida y CCR5 pero no CXCR4 y puede transferir R5 selectivamente, pero no el virus X4. (70)

Recientes evidencias indican que células dendríticas se ligan al HIV-1 gp120 a través de la lectina tipo C (DC-SIGN), sugiriendo que células dendríticas ubicadas en el epitelio pueden capturar HIV-1 y entregarlo a las células T subyacentes produciéndose la diseminación a los órganos linfoides secundarios (20,46). Esta ruta puede ser más importante en el tracto genital,

donde faltan las células M (59). El HIV puede cruzar la barrera de epitelio por transcitosis durante el contacto entre las células HIV-infectadas y la superficie apical del epitelio celular (15). El proceso de transcitosis puede inhibirse por la inducción de anticuerpos de la mucosa (IgA o IgM contra el HIV).

Los mecanismos de interacción entre las células infectadas del HIV-1 y células del epitelio de la mucosa humana no son bien comprendidos. Los contactos del HIV-1 usan a CD4 como un receptor en las células, hay dos principales correceptores para el HIV-, CCR5 y CXCR4. Los sitios obligatorios de estos dos correceptores comparten características como son la exposición aumentada en CD4 que liga y compite con CD4i Abs y anti-asa V3 Abs por ligar a gp120. Además, una simple sustitución en el Asa V3 puede convertir a los virus que usan CXCR4 en virus que usaran CCR5 (24,57). Es entonces probable que ambos correceptores actúen recíprocamente con una región similar de gp120, pero ellos no pueden compartir los residuos del contacto.

Registros oficiales de casos sugieren que la afinidad de gp120 para CXCR4 y para CCR5 puede ser diferente. las uniones de HIV-1 ha sido divididas en dos categorías basadas en su uso del correceptor: "R5" las uniones usando el receptor de las citocinas CCR5 como un correceptor e infectando macrófagos y las células dendríticas principalmente, y "X4" usando CXCR4 como un correceptor que infecta a células T CD4 que expresan principalmente este receptor de citocinas. En la transmisión del HIV-1 a través de la mucosa, la infección inicial normalmente es un R5, no X4, incluso cuando el donador tiene ambos virus (144,91). Meng et al. Sugieren que las células del epitelio del intestino grueso expresan galactosylceramida que puede servir como un receptor alternativo a CD4 en células donde faltan CD4 y CCR5, pero no CXCR4, y puede transferir R5 selectivamente, pero no X4. (91). Se propone esta selectividad como un mecanismo potencial para la transmisión selectiva de virus R5. De acuerdo con la, producción o entrega de citocinas (CCR5) o anticuerpos que bloquean la interacción viral a través de CCR5 pueden ser especialmente eficaces como un mecanismo inmunológico de protección (79).

En contraste, en células T-CD4 de sangre predomina CXCR-4 y son los objetivos para los virus X4, después de la transmisión de HIV por la mucosa, los primeros sitios perceptibles de repetición viral son DC intraepitelial y subepitelial, células T-CD4, y macrófagos. Sin embargo, el inicio de replicación del HIV depende del sitio anatómico de infección (70). Ejemplo, el objetivo del HIV en el tracto gastrointestinal superior son los linfocitos de la lámina propia que expresan CCR5 y CXCR4, reportados como CCR5 negativos en el tracto superior del IG, en contraste con macrófagos de otro sitio (91). Después de la infección Cervico-vaginal con SIV en los macacos, el subepitelio de DC es el primer y mayor sitio de una temprana repetición viral. DC también puede emigrar a áreas de células T en el tejido de la mucosa regional e infecta linfocitos T. El periodo local (el mucosal) de replicación y de interacción viral local con las células de la mucosa sin la diseminación sistémica son cruciales para la generación potencial de respuestas inmunes locales preventivas (anticuerpos y CTL CD8) que puede eliminar mucha de la carga viral después de la transmisión a través de la mucosa y puede reducir la enfermedad.(150)

La replicación de SIV se estudio por hibridación in situ en la mucosa (del tejido endocervical) y tejidos linfoides sistémicos después de la inoculación intravaginal en macacos. El primer descubrimiento de niveles bajos de ARN viral se observó en el tejido endocervical. La cantidad de ARN viral en la región endocervical aumenta entre 3 y 7 días. Sin embargo, se encontró ARN de SIV en nudos linfáticos distantes y médula 12 días después de la inoculación en la mucosa (150). En otro estudio, después de la inoculación intravaginal de SIV, se descubrieron las células infectadas en los nudos linfáticos iliacos interiores a los 2 días y en la sangre a los 5 días (128). En cualquier caso, los mecanismos de diseminación inmunológicos pueden tener unos días para erradicar localmente el virus antes de que disemine ampliamente. Los sucesos iniciales de interacción entre HIV y la mucosa ayudarán en el desarrollo de nuevas vacunas a través de la mucosa y la prevención de la transmisión del HIV a través de la mucosa. (79)

Estrategias Vacunales del HIV.

El conocimiento de la estructura y biología del HIV y sus interacciones con el sistema inmune han promovido estrategias de vacunación como son virus atenuados, virus inactivados y proteínas recombinantes que pueden proteger contra una variedad de patógenos virales en los humanos, pero no han sido de utilidad contra la infección del HIV. Muchos virus pueden mutar a través del pase de cultivos de tejidos permaneciendo infecciosos, pero pierden su potencial de patogenicidad. Estos virus patógenos atenuados han proporcionado protección segura y eficaz contra la viruela, sarampión, y polio. Datos en monos indican que esta estrategia protege contra la infección de SIV (30).

Las deleciones en genes no estructurales del SIV no producen reacciones patógenas en la infección en monos adultos. Monos infectados con virus gen-anulados estuvieron protegidos de una subsecuente infección del SIV patógeno. Sin embargo, monos adultos infectados con virus patógenos atenuados desarrollan tardíamente la enfermedad y en monos recién nacidos se desarrolla la enfermedad poco después la infección (3).

En humanos que recibieron sangre infectada con una deleción genética del HIV, se reporto que estuvieron libres de la enfermedad en un principio. Pero tiempo después se desarrollo el HIV. (78). A partir de estos resultados se ha dudado acerca de la seguridad de esta modalidad de vacuna para el HIV .La inactivación física o química de virus inmunogenicos como es el caso influenza y polio proporcionan una eficaz inmunidad .En el caso de vacunas de virus inactivados de SIV proporcionan una inmunidad efectiva en monos (100) Sin embargo esta inmunidad esta muy restringida por la diversidad de aislados virales. La duración de esta protección otorgada por la vacuna con virus inmunogenicos inactivados decae rápidamente. Por que no se genera una respuesta inmune neutralizante.

Proteínas virales purificadas, expresadas en mamíferos o células bacterianas usando tecnología recombinante de DNA pueden usarse como una vacuna antigenica, utilizado con éxito en la vacuna de la hepatitis B (103)

mientras que para el caso del HIV con este tipo de vacunas no se presentan evidencias de protección contra la infección.(27).

Las limitaciones observadas de las estrategias vacunales tradicionales por prevenir las infecciones de HIV, ha creado la exploración de nuevas alternativas, como son el uso de plásmidos de ADN y de vectores recombinantes, ya se ha mostrado la inoculación intramuscular de un plásmido que codifica bajo el control de un potente promotor (33) Este tipo de vacuna es seguro y eficaz en la respuesta de CTL en primates no humanos . Se ha mostrado la diferencia de respuesta a plásmidos de DNAs en humanos y animales de laboratorio la cual es más alta en los animales de laboratorio, a partir de esto se han hecho cambios alterando nucleótidos en los genes virales y elementos reguladores en los plásmidos para aumentar su inmunogenicidad. (34)

Se esta trabajando para aumentar la inmunogenicidad de estas vacunas utilizando plásmidos con citocinas, formulaciones con polímeros y con microorganismos recombinantes vivos como potenciales vacunas para el HIV , a los cuales se les puede insertar genes del HIV y SIV pudiendo ser seguras y eficaces como vacunas vivas atenuadas , como son la vacuna del virus de la viruela o la vacuna de la tuberculosis BCG (124,147).

Estos virus y bacterias diseñados se reproducen en el individuo inoculado desarrollando inmunidad, hacia el vector y el gen del HIV. Estos organismos, se reproducen generando una respuesta humoral y celular en los portadores de la vacuna, los vectores mejor estudiados son los poxvirus. Pudiendo ser el virus de vaccinia un vector eficaz para los genes de HIV, la desventaja que presenta el virus de Vaccinia es que puede diseminarse y causar una encefalitis fatal en un individuo immuno suprimido infectado de HIV-1 evitando su uso (114,56,122)

Un ensayo en Tailandia está evaluando la eficacia de una vacuna recombinante de canarypox con una proteína recombinante HIV, aunque su inmunogenicidad ha defraudado en ensayos con humanos (37).

Los estudios con vectores adenovíricos recombinantes han dado resultado particularmente el Adenovirus serotipo 5, hecho por replicación incompetente con deleción en los genes E1 y/o E3, se ha demostrado favorablemente este inmunogen como un vector para HIV en pequeños animales de laboratorio y primates no humanos (125,126). De hecho, las construcciones vacunales de HIV están entrando en una fase avanzada en ensayos clínicos humanos. Varios estudios han demostrado que un recombinante adenovírico puede obtener respuestas inmunes específicas de células T al HIV en humanos. El problema que existe con esta vacuna, es que la inmunidad pre-existente al vector disminuye la inmunogenicidad de estas estructuras significativamente (7).

Otros vectores recombinantes vivos están explorándose como potenciales vacunas para el HIV. Éstos incluyen los virus alfa de una sola cuerda de ARN (virus Semliki arbolan y el virus de la encefalitis caballar

venezolano) y el parvo virus adeno-asociado. Patógenos atenuados de mycobacterium Bacille Calmette-Guerin también está evaluándose como un vector de HIV en preclínica y fase temprana en el humano; Aunque plásmidos de ADN y estrategias de vectores recombinantes vivos inducen respuestas inmunes celulares, el inmunogen de la proteína necesita obtener un anticuerpo capaz de neutralizar el virus. Varias estrategias para crear un inmunogen que genere una respuesta del anticuerpo ampliamente neutralizadora se están desarrollando. No obstante se puede diseñar un inmunogen de la proteína para obtener anticuerpos que neutralicen un único aislado del HIV, es improbable que el anticuerpo neutralice un número significativo de otros aislados de HIV debido a su extrema diversidad genética. Porque las regiones conservadas genéticamente son resguardadas del acceso de los anticuerpos por las estructuras muy inconstantes de las Asas (V1-V5) y azúcares, las Asas inconstantes y sitios de glicosilación deletionados en las proteínas están evaluándose como inmunógenos (148,22)

Se está evaluando los inmunógenos del trimero que se encuentra sobre la estructura del virus para obtener anticuerpos neutralizantes, generando anticuerpos monoclonales que puede neutralizar un amplio espectro de aislados de HIV, pudiendo asumir que será posible configurar un inmunógeno que pueda obtener una respuesta de anticuerpos ampliamente neutralizadora (28,31,12).

Adyuvantes mucosales

Recientes estudios han mostrado que la inmunización nasal es el procedimiento más eficaz para la inducción mucosal y de respuestas inmunes sistémicas (90). La inmunización nasal con vacunas proteína-péptido coadministrado con un adyuvante mucosal induce eficazmente la inmunidad de mucosas en el tracto reproductor de hembra aun más que la inmunización oral (42).

Se ha mostrado que la inmunización nasal de rhesus macacos con p55gag de SIV junto con la toxina de cólera nativa como adyuvante mucosal (el nCT) induce respuestas específicas para p55gag de IgA e IgG en secreciones vaginales (63).

Vacunas de virus muertos son menos arriesgadas pero se consideran menos eficaces, requieren más dosis y proporcionan un tiempo de protección más corto. Se necesitan adyuvantes inmunes que refuercen la potencia de vacunas inactivas. Los adyuvantes clásicos fueron empleados en vacunas inyectables como el adyuvante Freund e hidróxido de aluminio o fosfato (alumbre) también se han usado como propulsores o cebadores mucosales de la vacuna del SIDA.(76,99,149)

Como resultado varios subcomponentes de bacterias, como los lípidos bacterianos, han sido particularmente populares desde que se han usado con éxito con otras vacunas experimentales. Los lipopolisacáridos de inmunotoxinas bacterianas (LPS) de bacterias gram-negativas inducen respuesta predominantemente de APC y células B. Varios laboratorios han probado

adyuvantes lipídicos de un purificado bacteriano fraccionado de LPS, es decir, lípido de monophosphoryl UN (MPL), Mycoplasma-derived synthetic macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2), toxina de cólera subunidad B asociado lípidos de GM1, glycerol lysophosphatidyl (GPL), y nuevos fosfolípidos como el cocleates (16,48,81,86,105,121). Normalmente se han usado otros adyuvantes de toxinas de origen bacteriano, incluso la toxina de cólera (CT), exotoxina de Pseudomonas (ntPE), y variantes de Escherichia coli (heat-labile toxin LT) o enterotoxina LT, por ejemplo, R192G, LTK63, y LTR72 con o sin la actividad ADP-ribosyltransferasa (9, 10, 99,101).

En pruebas preclínicas CT era el adyuvante más popular, pero no es práctica para el uso en los humanos debido a su toxicidad. La aplicación nasal de CT B unidad subordinada (el CT-B) o la nCT produce acumulación en las bombillas olfativas del CNS a través de GM1 en las neuronas olfativas (137). Además, la nCT se conoce por inducir niveles altos Ag-específicos totales y de Ab IgE, respuestas IL-4-dependiente que son debido a la naturaleza de la adjuvanticidad (6, 29, 54,75). Para superar estos problemas patológicos potentes de nCT, se ha desarrollado y caracterizado dos mutantes no tóxicos de toxina de cólera (el mCT; E112K y S61F) eso retiene las propiedades adyuvantes a pesar de faltar el ADP-ribosyltransferase asociada la actividad toxica de la enzima (95,96). Se ha mostrado que la mutante CT E112K es uno de los adyuvantes más eficaces, seguro, y estable entre los mutantes basados en toxina que se han probado (6, 54,29).

Otro adyuvante del cual se han informado ventajas es la protoxina de Cry1Ac del *Bacilo Thuringiensis* que es favorablemente inmunogenica (92,136) y tiene efectos adyuvantes sistémicos y mucosales, aumenta respuestas del anticuerpo específicas a las proteínas como la albúmina de suero bovino y de hepatitis B (135), a los polisacáridos del tipo 6 polisacárido capsular del neumococo y de una vacuna polivalente de polisacárido de neumococo(97).

Cry1Ac tiene ventajas adicionales contra otros adyuvantes del mucosas (58,61): no es tóxico a los vertebrados, y su costo de la producción es bajo (120,45). Cry1Ac puede ser un candidato atractivo para mejorar la eficacia de vacunas contra las infecciones de mucosas;

Péptidos vacunales para el HIV

Se han usado los peptidos sintéticos lineales para estudiar las propiedades inmunológicas de proteínas y para el reemplazo como reactivos en el diagnóstico de enfermedades virales y auto-inmunes como potenciales vacunas sintéticas, el diseño de péptidos inmunogenicos para producir anticuerpos neutralizadores contra el HIV son de gran interés, estos péptidos han derivado de glicoproteinas del HIV y SIV, se están creando péptidos para elucidar las estructuras de regiones de interés. La solución más obvia es usar una vacuna artificial conteniendo mixotopes péptido/proteína diseñados para crear una respuesta inmune. Sin embargo, el número teórico de péptidos para representar todas las variantes de un inmunogeno de HIV es enorme. Según los informes publicados, la vacuna candidata contra la región hypervariable Asa

V3 debe incluir varios cientos de péptidos, algunos péptidos vacunales han producido reacciones inmunogénicas de amplio-espectro, pero de un costo sumamente alto e impráctico. (84, 85,93)

Péptido T1SP10 MN(A) y r T1SP10

En 1987 se identificó al dominio principal de neutralización (DPN) del VIH-1, el cual se localiza hacia el extremo carboxilo-terminal de gp120, en la región variable (V3). Esta región aunque presenta una alta variabilidad en su secuencia de nucleótidos y aminoácidos, tiene una estructura terciaria conservada, en forma de asa, mantenida por puentes disulfuro y su tamaño es entre 34 y 36 aminoácidos de largo. En el centro de esta se localiza el tetrapéptido GPGR altamente conservado entre diferentes aislados, el cual es la parte central denominado DPN. Numerosos trabajos señalan que esta región tiene una participación importante durante el ciclo infeccioso, de tal manera que los anticuerpos dirigidos en su contra presentan actividad neutralizante. De estos estudios se concluyó que la V3 puede ser un epítipo de importancia para el desarrollo de vacunas que induzcan una buena respuesta de anticuerpos neutralizantes.

El diseño del péptido TISPIO MN(A) contiene, el principal dominio neutralizador (PND) del (HIV-1) que es una sucesión de 24 aminoácidos localizada en la región hipervariable del Asa V3 de la proteína viral. Por lo cual se han desarrollado péptidos con esta secuencia de aminoácidos, como lo es el péptido T1SP10: KQIINMWQEVGKAMYACTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTK. Los aminoácidos del péptido TISPIO MN(A) 428-443 (aa) (TI, KQIINMWQEVGKAMYA), contiene, en el amino terminal, sucesiones de gp120 del HIV, expuestos para inducir las respuestas celulares de Th+CD4 en ratones y humanos (13,1). Esta sucesión de T1 se enlaza a una sucesión del carboxilo Terminal derivada de la variable (V3) dominio de gp120 (aa 320-324) del HIV-1. Contiene a ambos, principalmente uno que neutraliza determinante (SP10, aa 302-3 19) y un sitio designado como (A) (aa 320-324; FYTTK) que es reconocido por CTL+CD8 en ratones BALBc (108,19,49,51,50). El péptido TISPIO MN(A) se sintetizó en Applied Biosystems (Foster City, CA).

Se ha demostrado que la conservación de las estructuras en el Asa V3 es crucial a su función. Para reducir los altos costos de la síntesis del péptido T1SP10 basándose en la secuencia anterior se diseñó un primer (3 pares de oligonucleótidos) para crear un gen sintético por hibridación, se clono y se secuenció, anexándole un vector de expresión quedando de la siguiente manera y llevando el nombre de r T1SP10.

rT1SP10

MDLEKQIINMWQEVGKAMYASTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKTKTESKPNS
A AGTIWEFEAYVEOKLISEEDLNSAVDHHHHHHH

En el presente trabajo se determinó si este nuevo péptido es inmunogénico. Por otra parte se estudio si la protoxina Cry 1Ac tenia efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos, ya que en trabajos previos del laboratorio solo se había evaluado hacia proteínas y polisacáridos con excelentes resultados como fue contra *Naegleria fowleri* (123), sin embargo no se había probado hacia péptidos vacunales, por lo tanto se coadministró para ver su respuesta inmune como adyuvante. También se utilizó la coadministración de C.T ya reportada como excelente adyuvante como control positivo.

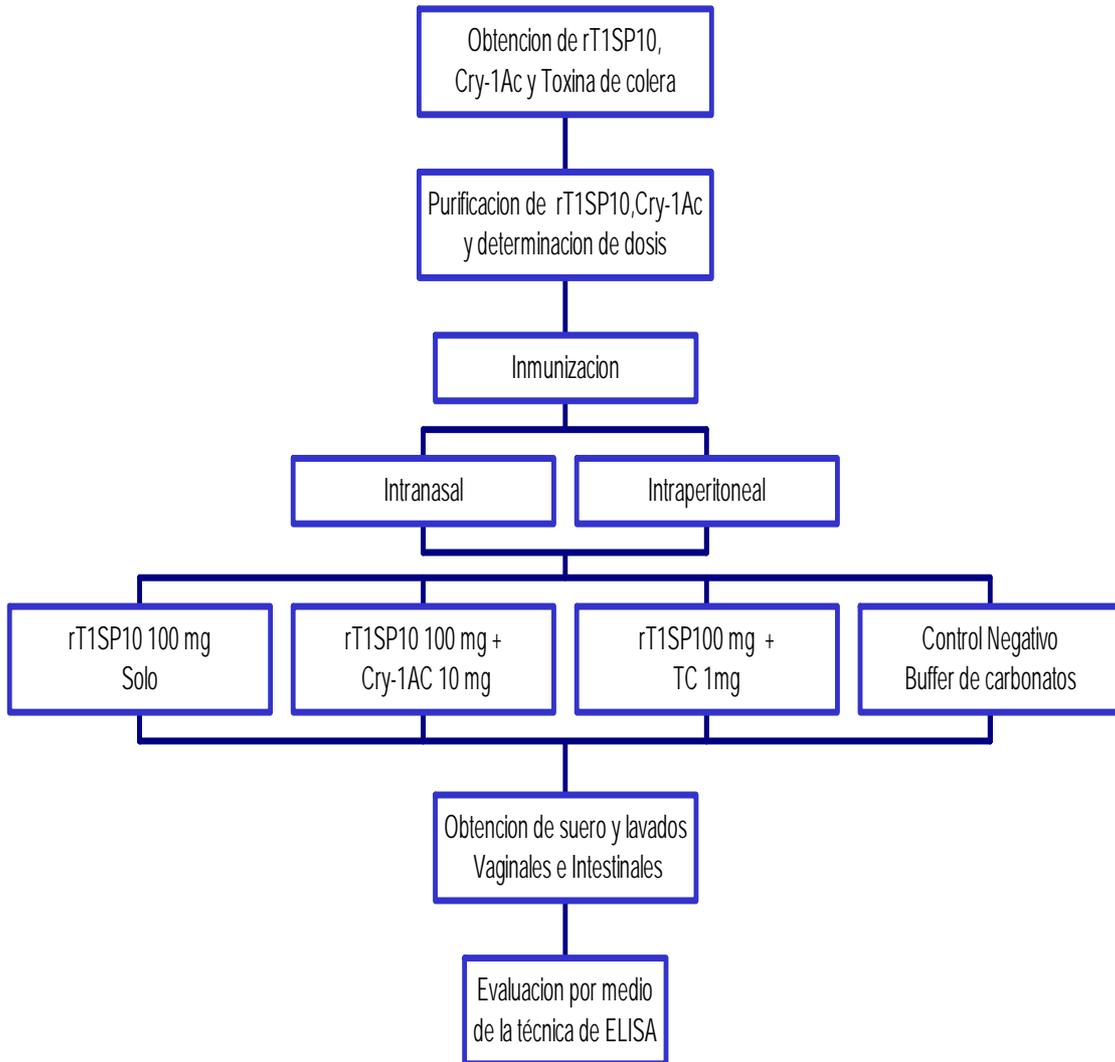
Objetivo

- Determinar si el péptido r T1SP10, es inmunogénico a nivel mucoso y sistémico cuando es administrado por las rutas intraperitoneal e intranasal

Objetivos particulares

- Analizar las respuestas de anticuerpos anti rT1SP10 en suero Vagina e intestino grueso en ratones inmunizados con r T1SP10.
- Determinar si Cry 1Ac tiene un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos al ser coadministrada con r T1SP10.

Estrategia Experimental



Metodología

Obtención de r T1SP10

Expresión en E. coli

Se trabajó con la cepa recombinante de E. coli JM103 (pOS9300) donada por el Dr. Donald Dean de la Ohio State University (Columbus, USA.) Las bacterias se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) contiene 100 µg/ml ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina. La inducción de la proteína rT1SP10 se realizó agregando al medio de cultivo isopropyl-β-D-thiogalactopiranosido al 1mM (IPTG). Purificándose del cultivo de E.coli a las 48 h se cosecharon las bacterias centrifugación a 10,000×g por 10 min,

Purificación de rT1SP10

Se deshíela el pellet celular 15 min en hielo y se resuspende las células en el buffer de lysis, 2–5 ml por gramo. La capacidad de las resinas de Ni-NTA depende de la proteína normalmente esta entre 5–10 mg/ml. Ni-NTA Agarose tiene una capacidad de 0.3 µmol/ml (8.0 mg/ml) para DHFR 6xHis-etiquetado (~26 kDa).

El Buffer de Lisis contiene 20 mM imidazol para desenredar la ligación, y aumentando la pureza de las proteínas. Si la proteína no liga bajo estas condiciones, la cantidad de imidazole se reduce a 1–5 mM. 2. Se agrego lisozima a 1 mg/ml incubándose en el hielo 30 min, posterior a esto se sonico en hielo. Durante 5 minutos de 200–300 W dejando en congelamiento entre cada sonicada, el lisado se centrifuga 10,000 rpm x para 10-15 min a 4°C, se guarda el sobre nadante. Una cierta proporción de la proteína celular, incluso la proteína rT1SP10, puede permanecer insoluble y se localizará en el pellet. Para una mayor recuperación de la proteína, se resuspende en imidazol 20 mM a 5 ml / gr. La capacidad de las resinas de Ni-NTA depende de la proteína normalmente es entre 5 y 10 mg/ml. Se agrego 1 ml al 50% de Ni-NTA a 4 ml del lisado y se mezclo agitando suavemente (200 rpm en un shaker rotatorio) a 4°C para 60 min. El imidazol al 20 mM en el lisado suprime la vinculación nontagged que contamina proteínas y da una mayor pureza. Se introdujo la mezcla del lisado–Ni-NTA en una columna con el tapón de toma de corriente hacia abajo Se quito la gorra del tapón y se colecciono el flujo a través de la columna. Se lavo dos a veces con 4 ml de, los lavados se colectaron los lavados para su análisis por SDS-PAGE. Se eluyo la proteína 4 veces con 5 ml buffer de elucion y se colecto en tubos tubos para su análisis por el SDS-PÁGINA. Posterior a esto para bajar la concentraciones de Urea se dializo en una solución de sacarosa al 7% por 24 horas posterior a esto se guardo para su utilización en las inmunizaciones.(133)

Cuantificación del péptido r T1SP10

Se determinó la concentración de r T1SP10 por el metodo de Microbardford, utilizando una curva de albúmina sérica bovina a partir de una solucion madre de 1mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) como blanco. La

lectura se realizó en lector de elisa a una absorbancia de 492 nm . La concentración del péptido se calculo obteniendo la ecuación estándar por regresión lineal con mínimos cuadrados.

Obtención de Cry1Ac

Se trabajó con la cepa recombinante de E. coli JM103 (pOS9300) donada por el Dr. Donald Dean de la Ohio State University (Columbus, USA.) Las bacterias se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) conteniendo 50mg/ml de ampicilina. La inducción de la proteína Cry1Ac se realizó agregando al medio de cultivo isopropyl- β -D-thiogalactopiranosido al 1mM (IPTG) (Ge et al, 1990). Purificándose de cultivos de E.coli a las 48 h de cultivo las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10,000 \times g por 10 min, después a las pastillas celulares se resuspendieron en buffer TE (Tris-HCl 50 mM sodio etil-diamino tetraacetato (EDTA) .50 mM, pH 8) y se sonicaron (Ultrasonic Peosessor) tres veces por 5 min en hielo. Posteriormente los cuerpos de inclusión fueron colectados por centrifugación (10,000 \times g por 10 min). El paquete celular se lavó dos veces con TE; dos veces con NaCl 0.5 MALT, conteniendo 1% de Triton X-100 y una vez con agua bidestilada fría. La protoxina Cry1Ac se solubilizó en buffer CBP (Na₂CO₃ 0.1 M pH 9.6, 2-mercaptoetanol al 1%) 30 min a 37°C. El material particulado se descartó por centrifugación a 10,000 \times g por 10 min. Por último, la concentración de la proteína se cuantificó por la técnica de Bradford y la pureza de la proteína se determinó por electroforesis SDS-PAGE. La Toxina de cólera se compro en Sigma Chemical Co., St Louis, MO (extracto total)

Esquema de inmunización

En todos los experimentos se usaron ratones Balb/c de 8-10 semanas. Los antígenos fueron administrados por la ruta intranasal e intraperitoneal. En la inmunización intranasal. los ratones fueron ligeramente anestesiados con éter etílico. Cada grupo constó de 5 ratones a los cuales se les aplicaron cuatro dosis de antígeno a los 7, 14, 21 y 28 días, Los antígenos aplicados a cada grupo fueron: a) rT1SP10 Solo ; b) rT1sp10/Toxina de cólera (Sigma Chemical Co., St Louis, MO extracto total; c) rT1SP10/ Cry-1Ac extracto total e)Control Negativo (Buffer de carbonatos)Los grupos fueron sacrificados siete días después de la última inmunización, para obtener muestras de suero, lavados Vaginales e Intestinales

Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de suero, lavados Vaginales e Intestinales de ratones inmunizados por las rutas intranasal e Intraperitoneal, de los grupos a) rT1SP10 Solo; b) rT1sp10 /Toxina de cólera c) rT1SP10/Cry-1Ac e)Control Negativo (Buffer de carbonatos)los cuales fueron sacrificados siete días después de la última inmunización

Suero

Se obtuvo a partir de la sangre colectada por punción cardiaca o por punción de la arteria aorta abdominal. El suero se recuperó por centrifugación y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Intestino Grueso

El contenido del IG se obtuvo con 3 ml de RPMI 1X frío introduciendo una cánula (de 10 cm. de largo por 2 mm de grosor). Para evitar la hidrólisis por proteasas, se añadió p-hidroximercurobenzoato (pHMB) a una concentración final de 5 mM. En ambos casos los restos sólidos fueron macerados para solubilizar los anticuerpos que pudieran estar incorporados. Todas las muestras fueron centrifugadas a $10,000 \times g$ a 4°C por 20 min para separar la fracción soluble de los paquetes celulares o restos alimenticios, según fuera el caso (80). Los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C hasta que fueron analizados.

Secreciones vaginales:

Se hicieron 5 lavados con una micropipeta con $50 \mu\text{l}$ de medio PBS, hasta recuperar un volumen de $150 \mu\text{l}$ todas las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4°C ; para eliminar los componentes particulados. Los sobrenadantes fueron almacenados a -70°C hasta ser analizados.

Análisis de la respuesta de Anticuerpos IgA, IgG e Isotipos

Los niveles de anticuerpos en las muestras de suero y de mucosas (Lavados de Vagina e Intestino grueso) se evaluaron por medio de la técnica de ELISA. Placas de 96 pozos se recubrieron con $100 \mu\text{l}$ de rT1SP10 diluido 50 mM hasta una concentración de final que oscila entre $.01-0.007 \mu\text{g/ml}$ en buffer de carbonatos (0.1 M Na_2CO_3 , pH 9.6) incubándose toda la noche a 4°C , después se lavaron con PBS-T, se bloquearon con leche descremada al 6% en PBS-T y se incubaron 1-2 h a 37°C ; a finalizar este tiempo las placas se lavaron con PBS-T y se colocaron las muestras de suero y mucosas (Lavados de Vagina e Intestino grueso) a diferentes diluciones incubándose toda la noche a 4°C Posteriormente, las placas se lavaron con PBS-T y se agregaron anticuerpos peroxidados de cabra anti-IgG-HRP 2004-03-16 Dilución 1:10,000, anti-IgA-HRP 2004-03-16 Dilución 1:1000 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) de ratón o biotinilados anti-IgG1 e IgG2a (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) de ratón, los anticuerpos se incubaron 1 hora a 37°C . Para el uso de anticuerpos biotinilados se agregó estreptoavidina peroxidada y se incubó toda la noche a 4°C . Después las placas se lavaron con PBS-T y se adicionó a solución reveladora (o-fenilendiamina 10 mg/ml, H_2O_2 30% en buffer de fosfato-citrato 50 mM pH 5.2), después la reacción se detuvo con ácido sulfúrico $25 \mu\text{l}$ de H_2SO_4 2N. Por último, la absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas (Thermo Labsystems).

Análisis Estadístico

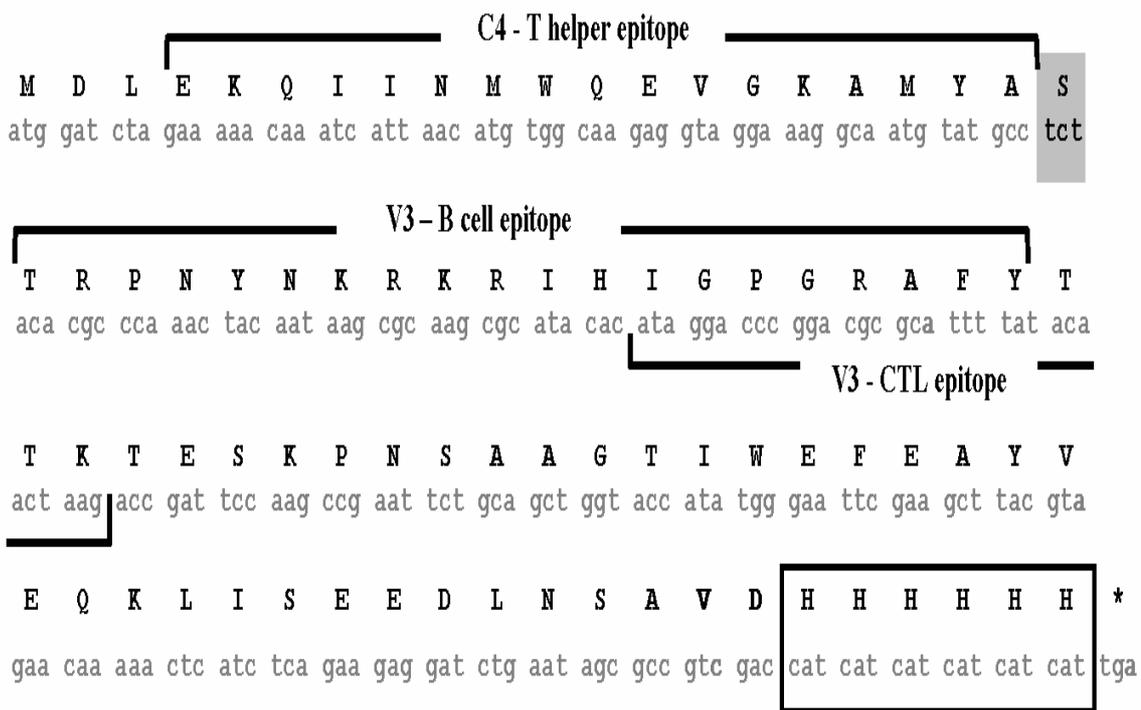
El análisis de significancia estadística entre los niveles de anticuerpos en los grupos experimentales se determinó con un Análisis de Varianza ($p < 0.001$), seguido de una comparación múltiple de medias (Prueba de Tukey) ($P < 0.05$).

RESULTADOS

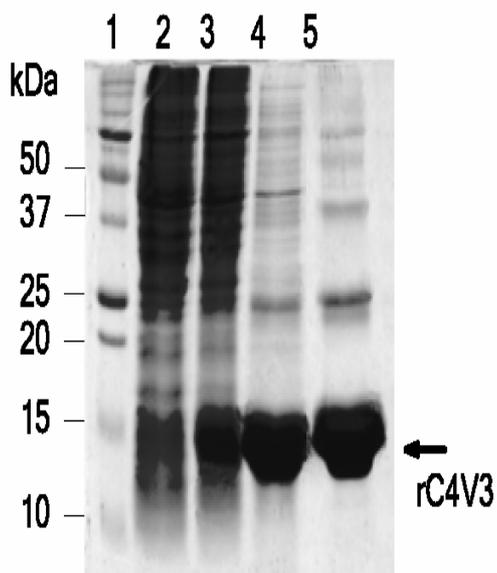
Electroforesis SDS-PAGED y WESTERN BLOT de r T1SP10:

Se obtuvo un rendimiento de 3mg /ml del péptido r T1SP10 purificado

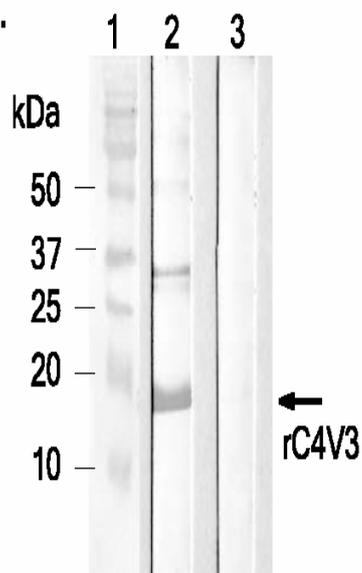
A.



B.



C.



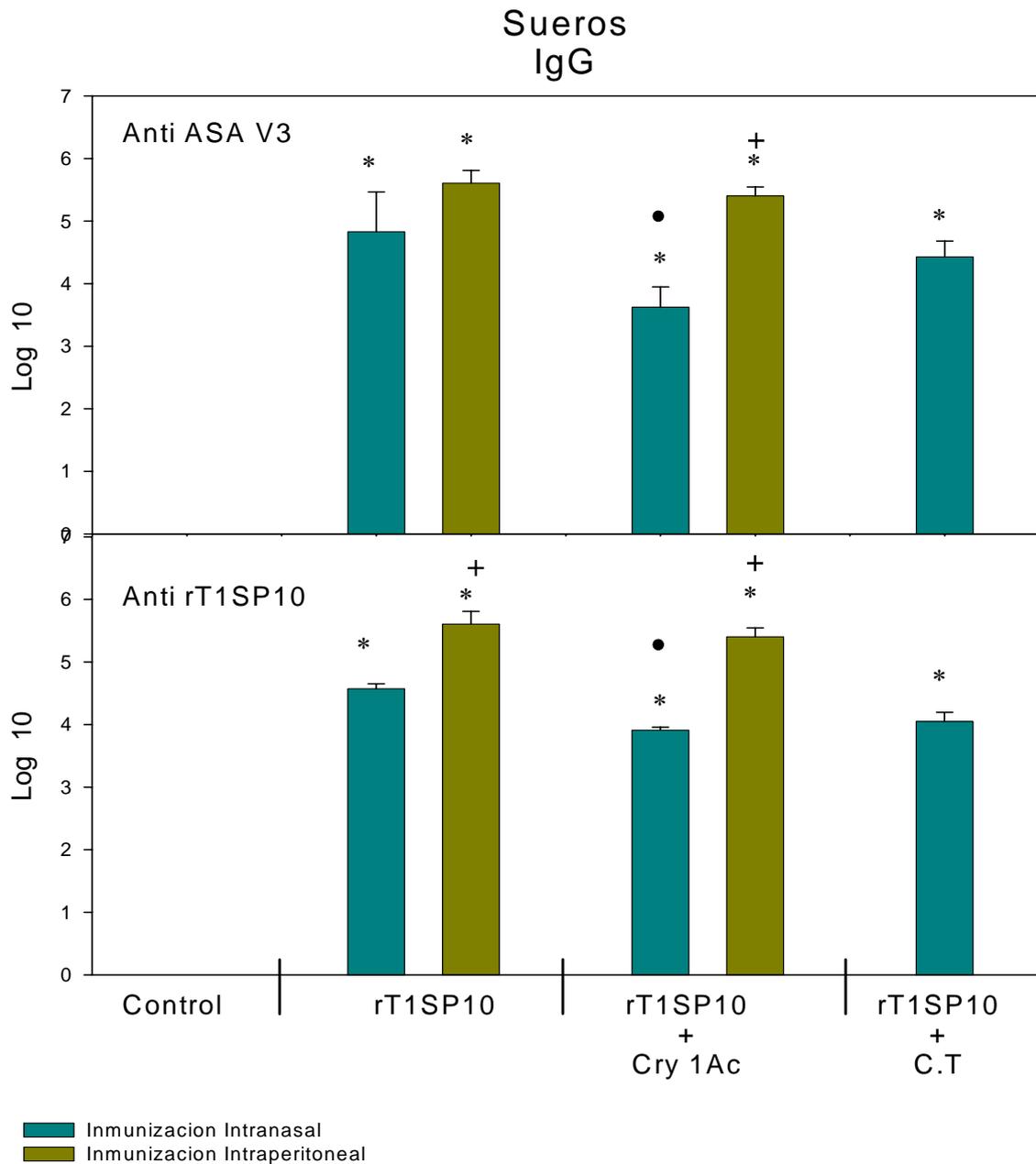


Fig.1. Respuestas de anticuerpos anti-ASA V3 y anti r T1SP10 de clases IgG en suero, grupos de 5 ratones hembra Balb/c fueron inmunizados por la ruta intranasal e intraperitoneal en tratamientos de 100µg de rT1sp10, 100µg de rT1sp10 + 10µg Cry1Ac y 100µg de rT1sp10 + 1µg de C.T, los controles se inmunizaron solo con PBS. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se dan como lecturas de Absorbancia a 492 nm (A 492) los cuales se titularon representándose en escala logarítmica, las barras representan la media ± E.S de cada grupo experimental (N=5); Los resultados fueron comparados con ANOVA de 3 variables, seguido de la prueba de Tukey M. El signo (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo control P< 0.001, la (+) indica diferencia significativa entre rutas de inmunización i.n e i.p P< 0.001 y el (•) indica diferencia significativa ± entre el péptido solo y coadministrado con Cry1Ac y C.T P< 0.001.

Respuesta en suero de Abs IgG anti-ASA V3 y anti-r TISP10 MN(A) por inmunización i.n e i.p con rTISP10 MN(A), rTISPIO MN(A) + Cry 1Ac y rTISPIO MN(A) + C.T

Se determino la presencia de anticuerpos anti-ASA V3, y anti-rTISP10 MN(A), en las muestras de suero, de ratones hembra Balb/c, que fueron inmunizados por la rutas intranasal o intraperitoneal con el péptido rTISP10 solo o con Cry1A o CT.

La determinación de dosis de rTISPIO MN(A) se definió a través de investigaciones anteriores (1), los ratones fueron inmunizados con 100 µg de rTISPIO MN(A) los días 0,7, 14, y 28 solo o coadministrado con 10 ug de Cry1Ac o 1 ug de CT.

Por ambas rutas se indujeron repuestas significativas de IgG anti-rTISP10 MN(A) y anti-gp120 (ASA V3), en los sueros de los ratones inmunizados con los 3 tratamientos (péptido rTISP10 MN(A) solo o coadministrado con Cry1Ac o CT). En general las respuestas inducidas por la ruta i.p. fueron mayores a las obtenidas por la ruta intranasal. Aunque por la inmunización intranasal con rTISPIO MN(A) se estimuló en suero una alta respuesta de anticuerpos IgG anti-ASA V3 (Fig 1), que no fue sigificativamente diferente entre las rutas de inmunización.

No se encontró efecto adyuvante ni de Cry1Ac ni de CT en la respuesta de anticuerpos anti ASA V3 ni anti T1SP10, ya que al coadministrar rTISPIO MN(A) con Cry1Ac por la ruta i.p. se indujeron respuestas similares a las obtenidas con el péptido solo. Mientras que la administración intranasal del péptido rTISPIO MN(A) más Cry1Ac o más CT produjo respuestas de IgG anti-ASA V3, y anti-rTISP10 MN(A) significativamente menores a las inducidas con el rTISP10 MN(A) solo. Estos resultados indican que el péptido recombinante rTISPIO MN(A) es inmunogénico y no requiere adyuvante.

Sueros
IgG1 e IgG 2A
Dilucion 1: 1000

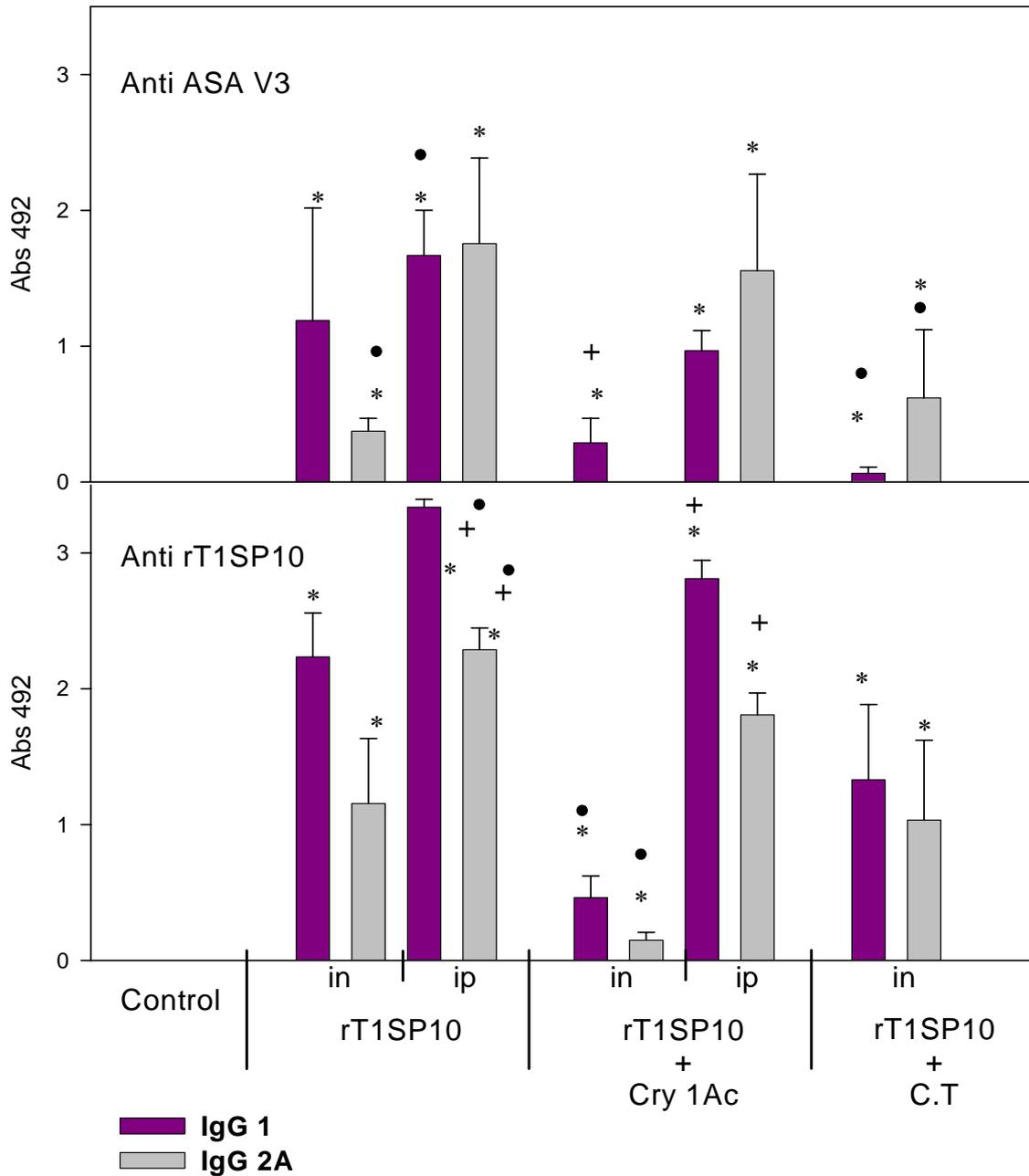


Fig. 2. Respuestas de anticuerpos anti-ASAV3 y anti r T1SP10 de clases IgG 1 e IgG 2A en suero .Grupos de 5 ratones hembra Balb/c fueron inmunizados por la ruta intranasal e intraperitoneal en tratamientos de 100µg de rT1sp10, 100µg de rT1sp10 + 10 Cry1Ac y 100µg de rT1sp10 + 1µg de C.T, los controles se inmunizaron solo con PBS . Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se dan como lecturas de Absorbancia a 492 nm (A 492) .Las barras representan la media ± E.S de cada grupo experimental (N=5). Los resultados fueron comparados con ANOVA de 3 variables, seguido de la prueba de Tukey. El signo (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo control P< 0.001, el signo (+) indica diferencia significativa entre rutas de inmunización i.n e i.p P< 0.001 y el (•) indica diferencia significativa ± entre el péptido solo y coadministrado con Cry1Ac y C.T P< 0.001

Respuesta en suero de subclases IgG1 e IgG2A anti-ASA V3 y anti-rTISP10 MN(A) por inmunización i.n e i.p con rTISP10 MN(A), rTISPIO MN(A) + Cry 1Ac y rTISPIO MN(A) + C.T

Como una forma de caracterizar la respuesta inmune inducida como Th1 o Th2, se cuantificaron por ELISA las subclases de anticuerpos IgG1 e IgG 2^a anti ASA V3 y Anti r T1SP10 en los sueros de los ratones inmunizados por la ruta i.p e intranasal con rTISP10 MN(A) solo o + Cry 1Ac o + C.T. (Fig.2).

En los animales inmunizados con el péptido rTISP10 MN(A) solo se indujeron respuestas de anticuerpos IgG1 e IgG 2a significativas anti ASA V3 y anti rTISP10 MN(A), por ambas rutas de inmunización, aunque la magnitud de la respuesta de las diferentes subclases de IgG anti ASA V3 y anti rTISP10 MN(A) fue diferente y varió dependiendo de la ruta inmunización. Por ambas rutas se observaron mayores respuestas de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti rTISP10 que anti ASA V3. En general por la ruta intraperitoneal se indujeron altas respuestas de IgG1 e IgG2a anti rTISP10 MN(A) y anti ASA V3, significativamente mayores a las inducidas por la ruta intranasal. Además observamos que por ambas rutas la respuesta de anticuerpos IgG1 anti rTISP10 MN(A) fue mayor a la respuesta IgG2a. En contraste se detectaron respuestas similares de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti ASA V3 por la ruta intraperitoneal mientras que por la ruta intranasal la respuesta de anticuerpos IgG1 anti ASA V3 inducida tendió a ser mayor a la respuesta de anticuerpos IgG2a, la cual fue muy baja.

No se detectó efecto adyuvante alguno en la respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti ASA V3 o anti rTISP10 MN(A) al coadministrar el péptido rTISP10 MN(A) con Cry1Ac o CT. Al coadministrar Cry1ac por la ruta i.p. se indujeron altas respuestas de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti rTISP10 MN(A), aunque significativamente menores a las inducidas con el péptido solo. Las respuestas de la subclase IgG1 anti rTISP10 MN(A) al coadministrar Cry1Ac vía i.p. fueron mayores a las de la subclase IgG2a; mientras que las respuestas de IgG1 anti ASA V3 fueron bajas y tendieron a ser menores aunque no significativamente que las respuestas de IgG2a, las cuales fueron similares a las obtenidas al inmunizar por la ruta i.p. con el péptido rTISP10 MN(A) solo.

En contraste al coadministrar Cry1Ac con el péptido rTISP10 MN(A) por la ruta intranasal se detectaron muy bajas respuestas de anticuerpos anti rTISP10 MN(A) y anti ASA V3 que fueron significativamente menores que las inducidas con el péptido solo por la ruta intranasal. Al coadministrar Cry1Ac por la ruta intranasal, la respuesta de IgG1 anti rTISP10 MN(A) fue baja aunque mayor a la respuesta de IgG2a, mientras que al analizar la respuesta anti ASA V3 solo se detectó una muy baja respuesta de anticuerpos IgG1 y no se indujeron respuestas significativas de la subclase IgG2a.

Al coadministrar por la vía intranasal CT con el péptido rTISP10 MN(A) encontramos respuestas moderadas similares en magnitud de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti rTISP10 MN(A), las respuestas de IgG1 fueron menores a las inducidas con el péptido solo mientras que las respuestas de IgG2a fueron

similares. Al analizar la respuesta anti el ASA V3 observamos que al coadministrar CT solo se detectaron bajas respuestas significativas de IgG2a similares a las obtenidas con el péptido solo, mientras que no se indujeron respuestas significativas de IgG1 anti ASA V3 al coadministrar CT.

Intestino Grueso
IgG e IgA

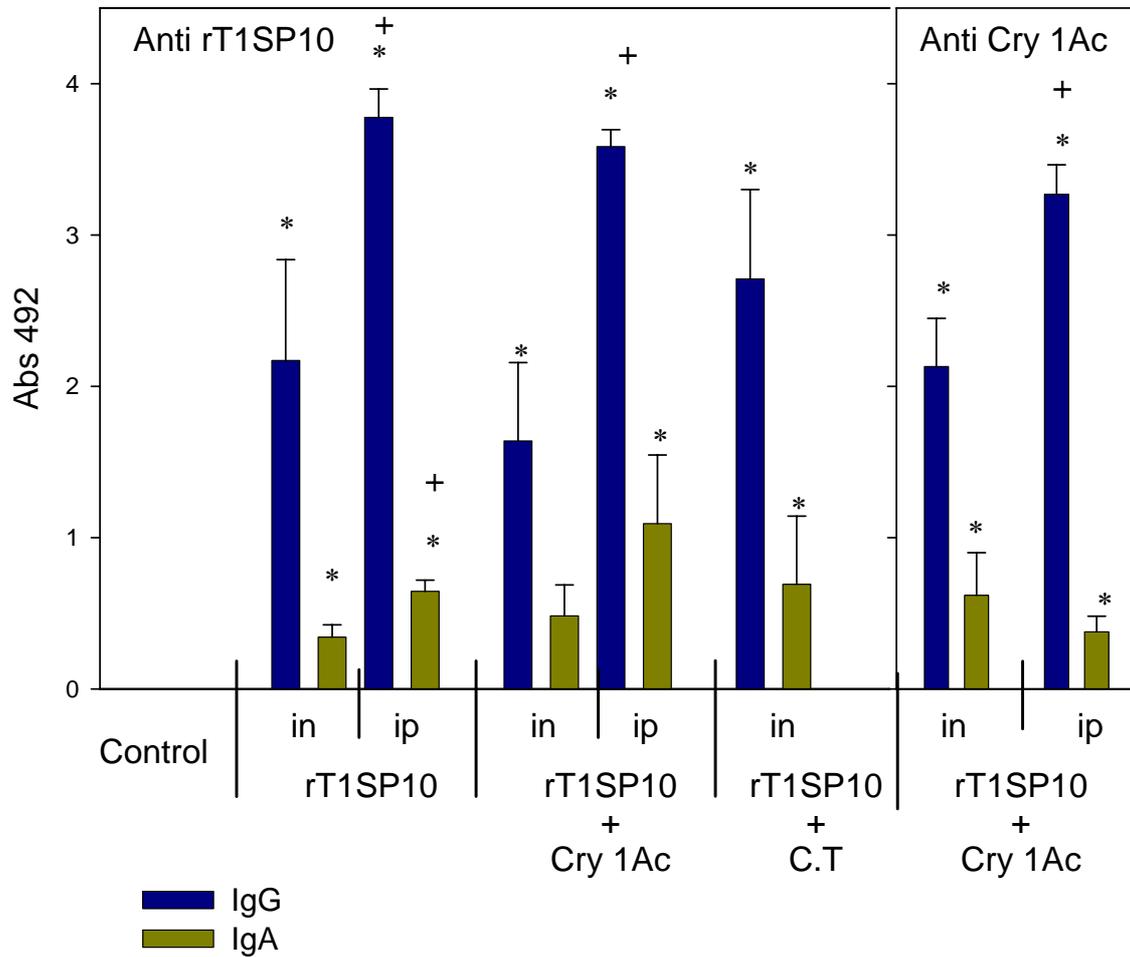


Fig. 3. Respuestas de anticuerpos anti rT1SP10 y anti-Cry1Ac (Para corroborar la respuesta específica) de clases IgG e IgA en intestino grueso. Grupos de 5 ratones hembra Balb/c fueron inmunizados por la ruta intranasal e intraperitoneal en tratamientos de 100µg de rT1sp10, 100µg de rT1sp10 + 10 Cry1Ac y 100µg de rT1sp10 + 1µg de C.T, los controles se inmunizaron solo con PBS. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se dan como lecturas de Absorbancia a 492 nm (A 492). Las barras representan la media ± E.S. de cada grupo experimental (N=5). Los resultados fueron comparados con ANOVA de 3 variables, seguido de la prueba de Tukey. El signo (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo control $P < 0.001$, la (+) indica diferencia significativa entre rutas de inmunización i.n e i.p $P < 0.001$ y el (•) indica diferencia significativa ± entre el péptido solo y coadministrado con Cry1Ac y C.T $P < 0.001$.

Respuesta Mucosal en Intestino Grueso de abs IgG E IgA anti-rTISP10 MN(A) y anti-Cry1Ac por inmunización i.n e i.p con rTISP10 MN(A), rTISPIO MN(A) + Cry 1Ac y rTISPIO MN(A) + C.T

Se detectaron respuestas significativas de anticuerpos anti rTISPIO MN(A) en los fluídos de intestino grueso de los ratones inmunizados con el péptido rTISPIO MN(A) solo y coadministrado con Cry1Ac o CT, por ambas vías de inmunización. Mediante todos los tratamientos se indujeron altas respuestas de IgG que fueron significativamente mayores a las respuestas de IgA. Las respuestas de IgG generadas por la ruta intraperitoneal fueron significativamente mayores a las obtenidas por la ruta intranasal.

No se observó efecto adyuvante ni de Cry1Ac ni de toxina de cólera en la respuesta de anticuerpos IgA ni IgG anti rTISPIO MN(A) inducida en intestino grueso, ya que observamos que la magnitud de las respuestas inducidas al coadministrar rTISPIO MN(A) con Cry1Ac o CT fueron similares a las obtenidas con el péptido rTISPIO MN(A) solo.

En las muestras de lavados intestinales de intestino grueso de los animales inmunizados con el péptido rTISPIO MN(A) más Cry1Ac también analizamos la respuesta de anticuerpos anti Cry1Ac. Encontramos que, de manera similar a lo observado con la respuesta anti rTISPIO MN(A), se indujeron altas respuestas de anticuerpos IgG anti Cry que fueron significativamente mayores a las respuestas de IgA, asimismo encontramos que por la ruta i.p. se indujeron mayores respuestas de IgG que por la ruta intranasal.

Vagina Dilucion
1:8
IgG e IgA

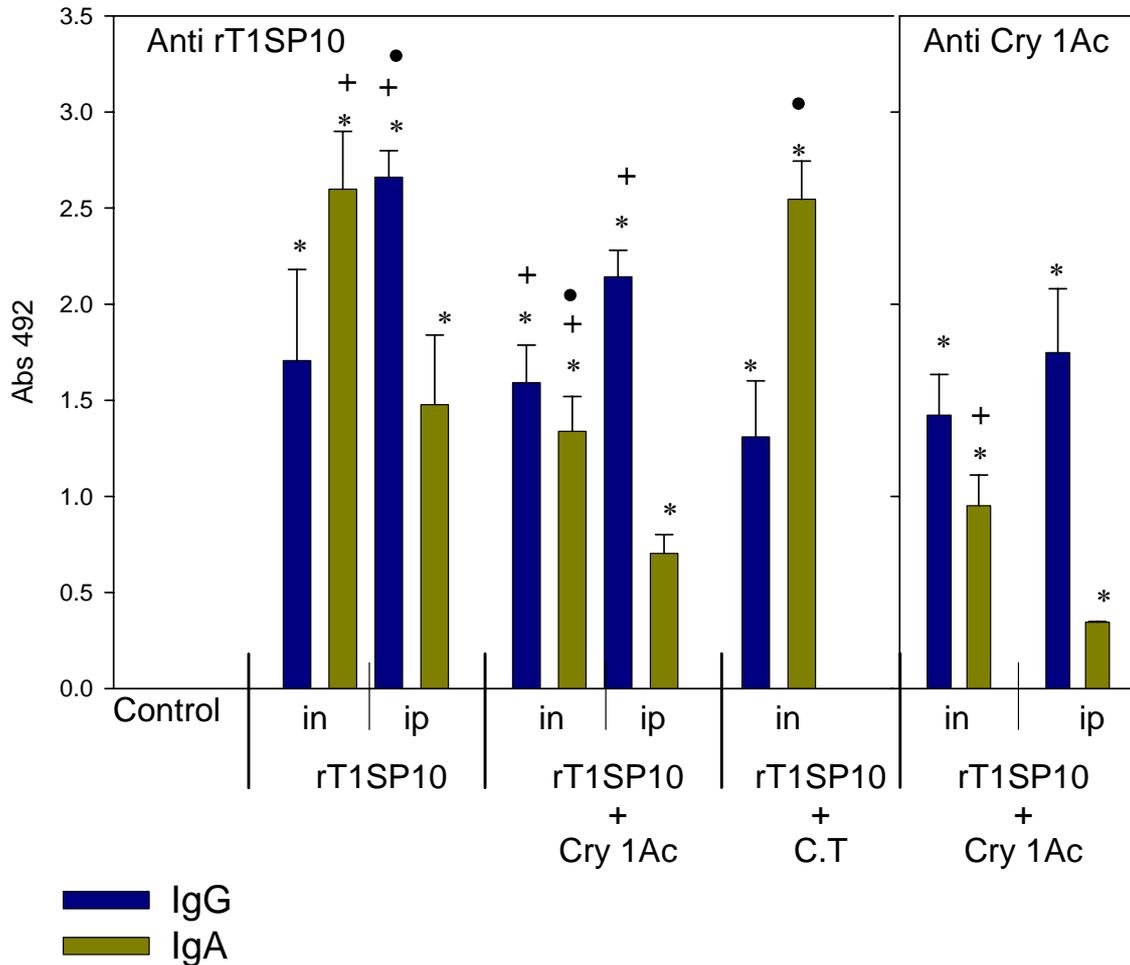


Fig. 4 . Respuestas de anticuerpos anti rT1SP10 y anti-Cry1Ac (Para corroborar la respuesta especifica) de clases IgG e IgA en vagina .Grupos de 5 ratones hembra Balb/c fueron inmunizados por la ruta intranasal e intraperitoneal en tratamientos de 100µg de rT1sp10, 100µg de rT1sp10 + 10 Cry1Ac y 100µg de rT1sp10 + 1µg de C.T, los controles se inmunizaron solo con PBS . Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se dan como lecturas de Absorbancia a 492 nm (A 492) .Las barras representan la media ± E.S de cada grupo experimental (N=5). Los resultados fueron comparados con ANOVA de 3 variables, seguido de la prueba de Tukey. . El signo (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo control P< 0.001, la (+) indica diferencia significativa entre rutas de inmunización i.n e i.p P< 0.001 y el (•) indica diferencia significativa ± entre el peptido solo y coadministrado con Cry1Ac y C.T P< 0.001.

Respuesta Mucosal de IgG e IgA anti-r TISP10 MN(A) y anti-Cry1Ac en vagina por inmunización i.n e i.p con rTISP10 MN(A), rTISPIO MN(A) + Cry 1Ac y rTISPIO MN(A) + C.T.

Para determinar la presencia de abs IgG e IgA anti-rTISP10 MN(A), las muestras de lavados vaginales se diluyeron 1:8 ya que las primeras lecturas rebasaban el límite de lectura confiable (Datos no mostrados).

Los tres tratamientos de inmunización, rTISP10 MN(A) solo o más Cry1Ac o más CT, por ambas rutas indujeron respuestas significativas de anticuerpos IgG e IgA en vagina, aunque la magnitud de dichas respuestas varió dependiendo de la ruta de inmunización y del tratamiento.

Mediante la inmunización con el péptido solo y coadministrado con CT, por la ruta intranasal se indujeron altas respuestas de anticuerpos IgA, las cuales fueron mayores a las respuestas de IgG obtenidas con ambos tratamientos. Sin embargo la coadministración intranasal con el péptido más Cry1Ac indujo respuestas moderadas similares de anticuerpos IgA e IgG anti rTISP10 MN(A).

En contraste por la ruta intraperitoneal se indujeron mayores respuestas de anticuerpos IgG anti rTISP10 MN(A) que de IgA en lavados vaginales de ratonas inmunizadas con el péptido solo o más Cry1Ac.

No se detectó efecto adyuvante ni de Cry1Ac ni de CT en la respuesta de anticuerpos en vagina anti rTISP10 MN(A). Por la ruta intraperitoneal se indujeron mayores respuestas de IgG e IgA en vagina mediante la administración del péptido solo que las inducidas al administrar el péptido más Cry1Ac. Mientras que por la ruta intranasal se indujeron respuestas similares de IgG en vagina por los 3 tratamientos (péptido solo o más Cry1Ac o más CT). La respuesta de IgA inducida en vagina por la ruta intranasal con el péptido solo fue similar a la inducida al coadministrar el péptido más CT, en contraste al coadministrarlo con Cry1Ac la respuesta de IgA fue significativamente menor.

Al analizar la respuesta de anticuerpos anti Cry1Ac en los lavados vaginales de los animales inmunizados con el péptido más Cry1Ac encontramos que por ambas rutas se indujeron respuestas similares de IgG, las cuales fueron mayores a las respuestas de IgA. Por la ruta intranasal se registraron mayores respuestas de IgA anti Cry1Ac que por la ruta i.p.

Discusión

Los resultados del presente trabajo demuestran que: (a) la administración del péptido recombinante r T1SP10 es inmunogénico, y no requiere de adyuvante, ya que se indujeron altas respuestas de anticuerpo específicas en suero y en secreciones de vagina e intestino grueso tanto por la inmunización intranasal como intraperitoneal con el péptido solo; y dichas respuestas en general fueron similares o mayores a las obtenidas al coadministrar el péptido con Cry1Ac o CT. (b) la respuesta inmune varía dependiendo de la ruta de inmunización utilizada. En general mediante todos los tratamientos por la ruta intraperitoneal se obtuvieron mayores respuestas, aunque por la ruta intranasal las respuestas inducidas en general fueron significativas y altas. (c) Cry1Ac no presentó efecto adyuvante alguno en la respuesta de anticuerpos anti rT1SP10, por la ruta intranasal, en general disminuyó marcadamente las respuestas de anticuerpos en suero y en mucosas, mientras que por la ruta i.p. en algunos casos generó respuestas similares y en otros casos menores a las inducidas con el péptido solo. (d) CT tampoco presentó efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos anti r T1SP10 aunque en general las respuestas de anticuerpos inducidas al coadministrar el péptido más CT por la ruta i.n fueron similares a las obtenidas mediante la inmunización con el péptido solo. (e) En todas las muestras analizadas (suero, lavados intestinales y vaginales) de los animales inmunizados con rT1SP10MN(A) se detectaron respuestas de anticuerpos anti rT1SP10MN(A), mientras que solo en suero se detectaron respuestas significativas de anticuerpos anti ASA V3. (f) En suero y en lavados intestinales de intestino grueso de los animales inmunizados con rT1SP10MN(A) se indujeron mayoritariamente respuestas de anticuerpos IgG por ambas rutas de inmunización. (g) en lavados vaginales las respuestas de IgG inducidas por la ruta i.p. también fueron mayores a las de IgA, mientras que por la ruta intranasal la inmunización del péptido rT1SP10MN(A) sólo o más CT indujo respuestas de IgA mayores a las de IgG, pero al coadministrar rT1SP10MN(A) más Cry1AC se indujeron respuestas similares de ambos isotipos.

El objetivo central de este trabajo consistió en caracterizar la inmunogenicidad del péptido r T1SP10 y determinar si Cry1Ac y CT podrían funcionar como adyuvantes aumentando la respuesta inmune hacia el péptido. En estos resultados cabe destacar que el péptido r T1SP10 promueve una mayor respuesta de anticuerpos IgG específicos, en suero, mucosa intestinal y vaginal, por sí solo que administrado vía intranasal (i.n.) o intraperitoneal (i.p.) con los adyuvantes.

El uso de péptidos que presentan epitopes de la región conservada GPGRAF, como lo es el péptido rT1SP10 es muy importante ya que estudios en humanos y ratón han revelado que la región de gp120 donde se encuentra el Asa V3, entre los residuos de cisteína 301 Y 336 (GPGRIFY) evoca una importante respuesta de anticuerpos neutralizadores contra el HIV estimulando la respuesta de linfocitos T-cooperadores (Th) y Linfocitos T-Citotóxicos (CTL). La secuencia de aminoácidos del ASA V3 es el principal determinante neutralizador PND, revisando la región del asa V3, se

identificaron residuos conservados (GPGRAFY) que son reconocidos por anticuerpos neutralizadores evocados por diferentes secuencias de aislados de HIV GPGRAFY. (47, 108, 118,66)

La secuencia del ASA V3 en GP120 del HIV-1 es una región inmunodominante que consiste de epítomos para células B, por lo cual para incrementar la inmunogenicidad de esa región se han usado y desarrollado numerosos sistemas de presentación antígenos. Como son péptidos multi epítomos donde se conjugan la región conservada GPGRAFY con epítomos como son P24EC, ELDKA y RILAVERYLKD los cuales se localizan en dominios N y C de GP41 para inducir respuestas de anticuerpos específicos, el péptido T1SP10 MN(A), contiene, en el amino terminal, sucesiones de gp120 del HIV, expuestas para inducir las respuestas celulares de CD4+ Th en ratones y humanos, (1,13)mas la variable (V3) dominio del HIV-1, gp120 (PND)y un sitio que es reconocido por CD8+ CTL en ratones BALBc, en la presente investigación el péptido recombinante rT1SP10MN(A) por si solo indujo una respuesta inmune alta por ambas vías de inmunización, intranasal e intraperitoneal. La respuesta en suero de IgG anti-ASA V3 fue bastante alta obteniendo títulos entre 1:40,00 y 1:50,000 la respuesta de IgG puede ser de gran importancia ya que los mecanismos de acción de IgG pueden darse en el plasma neutralizando y dejando células libres de virus, por Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) de células infectadas y lisis viral por la activación del complemento Fc-mediado.

En investigaciones anteriores el péptido original T1SP10 MN(A), fue administrado por la ruta intranasal donde solo produjo una respuesta inmune detectable de anticuerpos IgG en suero, y de IgA e Intestino Grueso, solo cuando se coadministró con un adyuvante como lo es la C.T, solo la respuesta de fluidos vaginales si genero repuesta inmune sin adyuvante en cambio nosotros encontramos respuesta significativa anti r T1SP10 de IgA e IgG en suero, intestino grueso y vagina, sin la coadministración de un adyuvante(52).

Es importante observar, que en otras investigaciones la gran cantidad de IgG en suero también esta presente en la mucosa genital de los ratones así como en los primates (27,36), las altas concentraciones de IgG en suero, intestino grueso y vagina podrían desempeñar un papel importante que bloquee la entrada de la infección por patógenos transmitidos por las mucosas vaginal e intestinal como lo ha sido contra herpes simple virus tipo 2 (HSV-2) y con *Chlamydia trachomatis* (26, 53,71,73,113,110). Es cuestionable si IgG que se difunde en secreciones intestinales podría jugar un gran papel como IgA en la prevención de la entrada viral. En contraste con IgA, IgG es altamente susceptible a la degradación en el lumen intestinal y a las proteasas bacterianas, por lo cual las concentraciones de IgG detectadas son generalmente más bajas que las de IgA (65, 72,145). En contraste en el presente trabajo encontramos que la respuesta de IgG inducida en intestino grueso fue mucho mayor que la respuesta de IgA (Graf.3). Varios trabajos demostrado que la IgA es importante para inmunoprotección de las mucosas. Sin embargo algunas evidencias apoyan que la IgG también podría participar en la inmunoprotección de las mucosas., Por ejemplo, en experimentos realizados en ratones deficientes de IgA o con niveles normales de este isotipo,

se ha encontrado que la IgG puede prevenir infecciones virales intestinales de ratones infectados con rotavirus (106,107).

La evidencia de un papel primario de los anticuerpos secretados de IgG en la protección contra infecciones vaginales es contraria al paradigma extensamente aceptado que IgA es el anticuerpo protector principal en las superficies de la mucosa. Mientras que la evidencia disponible indica que IgG es principalmente responsable de inmunidad secretora en la zona genital femenina, (138). Nuestros datos apoyan los datos que indican que la concentración de IgG en vagina es alta, ya que se idujeron altas respuestas de IgG en vagina al administrar el péptido recombinante rT1SP10MN por ambas rutas de inmunización, sin embargo por la ruta intranasal nosotros encontramos que la respuesta de IgA inducida fue mayor a la de IgG (graf: 3). Apoyando el papel de la IgG en la protección de la mucosa vaginal, en un trabajo reciente se encontró que al administrar intravenosamente anticuerpos monoclonales de IgG contra-VIH que demostraban una amplia actividad neutralizadora in vitro, éstos son altamente eficaces para prevenir la transmisión oral o vaginal en macacos con SHIV CXCR4 (X4) y CCR5 (R5). También se ha logrado prevenir la infección del SHIV en macacos administrando una combinación de diferentes epítomos como son:Gp120 (CD4-binding site), Gp120 (CD4-binding site), Gp120 (V3 loop) Gp120 (probably glycan structure),Gp41 (ELDKWA) y Gp41 (NWFDIT)Gp41 (40). La administración de una triple combinación de anticuerpos (anticuerpo 2F5 anti-gp41 ELDKWA, anticuerpo de 2G12 anti-gp120 C3-V4, y anticuerpo F105 anti-gp120 CD4 (CD4bs) del sitio de vinculación obligatorio), previno la transmisión oral de SHIV en macacos recién nacidos (4). En otras investigaciones previnieron la transmisión vaginal de SHIV patógeno en macacos usando una combinación de 2F5,2G12, e inmunoglobulinas de HIV o el anticuerpo monoclonal humano b12 anti-CD4bs humano [87,111]. Los anticuerpos bloquearon entrada viral en las superficies mucosales o el virus se eliminó en un paso posterior a la entrada. Los anticuerpos monoclonales de IgG fueron detectados en secreciones vaginales de estos animales, pero las concentraciones fueron extremadamente bajas comparadas con suero. En estos estudios los anticuerpos IgG que eliminaron el virus en la mucosa a través de la neutralización o por reacciones de citotoxicidad dependiente anticuerpo (ADCC) derivaron del suero, ya que fueron administrados intravenosamente, no obstante, la eficacia de estos anticuerpos en la prevención de la infección después del desafío, sugiere que la inducción de IgA mucosal e IgG es importante para el desarrollo de una vacuna.

Las respuestas de anticuerpos IgG inducidas en intestino y vagina al administrar rT1SP10MN(A) fueron altas, aunque más bajas respecto a las detectadas en suero. Aunque en este trabajo no estudiamos si la IgG detectada en mucosas era producida localmente, varios trabajos apoyan la existencia de células plasmáticas productoras de IgG en la lámina propia de las mucosas. Varios estudios realizados en ratones inmunizados continúan proporcionando evidencia de que la inmunización mucosal con candidatos vacunales de VIH es capaz de inducir respuestas de anticuerpos IgA en secreciones,y de anticuerpos IgG específicos en suero y CTL mucosal (69,82,130,17,101,142). Inmunizando ratones con subunidades antigénicas de HIV/SIV, antígenos conteniendo partículas, vectores vivos y vacunas de DNA administradas por

varias rutas mucosales varios autores han obtenido respuestas de anticuerpos neutralizadores IgA en secreciones e IgG en suero (139, 68,18).

Así mismo, nuestros resultados sugieren que a nivel sistémico la actividad inmune esta dirigida hacia la parte específica del asa V3, induciendo una respuesta de IgG extremadamente alta.

En base a esto se podría explicar que la inmunogenicidad del péptido r T1SP10, es principalmente dirigida por una respuesta de IgG. No obstante, sería de gran importancia entender el tipo de interacción del péptido r T1SP10 con la respuesta inmune ya que en lavados intestinales y vaginales no se encontró respuesta inmune de IgG e IgA anti ASA V3.

La respuesta de los subisotipos de IgG que son IgG1 e IgG2a obtenidas por la administración del péptido recombinante T1SP10MN(A) fueron significativamente altas indicando que se indujo un patrón mezclado Th1 y Th2. Las respuestas anti rT1SP10MN(A) inducidas por ambas rutas con el péptido solo o más Cry1Ac, fueron predominantemente IgG1, sin embargo en los ratones inmunizados con el péptido más CT se indujeron respuestas similares de ambas subclases de IgG. Mientras que el patrón de respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti ASA V3 inducido, con los diferentes tratamientos fue variable: con el péptido solo se indujeron respuestas similares de IgG1 e IgG2a por la ruta i.p. y mayores respuestas de IgG1 por la ruta intranasal, mientras que al administrar el péptido por la ruta intranasal más CT solo se indujo IgG2a, al coadministrar el péptido con Cry 1Ac vía i.p se obtuvieron niveles similares de ambas subclases y por la ruta in solo se indujo una baja respuesta de IgG1.

Se encontró que por la ruta i.n. se indujo en suero una respuesta inmune de IgG anti ASAV3 y r T1SP10, casi tan alta a la obtenida por ruta intraperitoneal. Estos resultados son importantes porque sugiere que se pueden inducir respuestas contra los virus que preservan la conformación dependiente de epítomos antigénicos, siendo con frecuencia los blancos primarios de estos anticuerpos neutralizantes, que inducen selectivamente anticuerpos IgG de la subclase de IgG2a en ratones y de las subclases IgG1 e IgG3 en los seres humanos (127). Estas subclases de anticuerpos IgG pueden ser particularmente eficaces en la neutralización. Porque se ha reportado que los anticuerpos monoclonales IgG2a pueden complementar la neutralización de virus-específicos HSV-2, y la administración pasiva en ratones de los anticuerpos monoclonales IgG2a es mucho más protectora contra el reto con HSV-2, que cantidades iguales de los anticuerpos monoclonales IgG1 (64). Las subclases IgG2a de ratón y las subclases humanas IgG1 e IgG3 se unen con una alta afinidad al FcR tipo1 en neutrofilos y macrófagos (127), haciendo estas subclases a los anticuerpos más eficaces para la fagocitosis.

La región del Asa V3 es determinante para el uso de los coreceptores CCR5 y CCR4, por lo cual anticuerpos dirigidos directamente hacia el asa v3 que bloquean la vinculación del receptor se controlaría la replicación del HIV. El péptido r T1SP10 el cual contiene la región constante de GPGRFY se administró de dos formas, solo y con un adyuvante que es Cry 1Ac , la

inmunización coadministrada con un adyuvante se da para intensificar la respuesta inmune, ya que las limitaciones que presentan los péptidos como son baja o nula inmunogenicidad por ser muy pequeños y por problemas de degradación proteolítica (21).

La importancia de este estudio es que el péptido r T1SP10 es capaz de inducir una importante respuesta de IgG anti-AsA v3 y anti – r T1SP10 obteniendo una respuesta inmune bastante alta, el análisis de la muestra, registro que en suero, la respuesta del anticuerpo IgG es muy alta oscilando entre los valores de titulación, la respuesta inmune anti-AsA V3 es bastante alta en los ratones inmunizados con concentraciones de 100µg (Graf:1).

En investigaciones donde el modelo experimental cambió y se inmunizaron conejos por ruta intranasal con el péptido T1SP10 en cantidades de 100µg, la respuesta del anticuerpo anti –T1S1P10 en suero en titulación tuvieron valores de 1:200 a 1:6400, los valores obtenidos en esta investigación marcan una gran variabilidad en los resultados (141); Destacando que en trabajos previos en los que se inmunizaron ratones o conejos con el péptido T1SP10 sintético, fue necesario utilizar adyuvantes para inducir las respuestas inmunes, mientras que el péptido recombinante utilizado por nosotros es inmunogénico y no requiere de adyuvante alguno.

En otros estudios con péptidos del VIH no se encontraron respuestas anti-GP120 de IgG hacia el péptido en suero, cuando los macacos fueron inmunizados por vía intranasal (112).

Las respuestas de IgA anti-r T1SP10 inducidas en intestino grueso en los ratones inmunizados con el péptido solo o más Cry1Ac o CT fueron significativamente más bajas que las de IgG. Por la ruta intraperitoneal se obtuvieron respuestas de IgG más altas que por la ruta intranasal. Esto se debe posiblemente a que la administración i.p. de antígenos, al ser una ruta parenteral de inmunización, asegura que cantidades exactas y adecuadas de la vacuna, puedan alcanzar la circulación sistémica, resultando una efectiva respuesta inmune en suero contra los patógenos invasores (104). Interesantemente las respuestas de IgA inducidas en vagina fueron altas, a diferencia de lo observado en intestino grueso.

La respuesta de IgA que se obtuvo en vagina fue bastante alta para el tratamiento del péptido solo por la vía i.n., donde se observa que la inmunización intranasal induce niveles muy altos de IgA (Graf.4). Aunque los detalles de su función todavía se están aclarando, la IgA desempeña papeles múltiples en la defensa mucosal (77,119). En virtud de que proporciona una primera línea de defensa "mecanismo de exclusión inmune": esto refiere la habilidad de cruzarse en la conexión de microorganismos, realza la participación en el moco facilitando la disociación, y de tal modo previene el contacto directo del patógeno con la superficie mucosa. La exclusión inmune se puede lograr por cualquier anticuerpo de IgA que reconozca un epítipo externo-expuesto en el patógeno. Los estudios de anticuerpos monoclonales de IgA han demostrado que los "anticuerpos no neutralizantes de IgA contra los antígenos superficiales microbianos pueden prevenir la adherencia epitelial y la

infección mucosal (2, 19, 94,143). Si el patógeno tiene éxito y entra en contacto con la superficie mucosal la especificidad de IgA puede bloquear o obstaculizar las moléculas superficiales microbianas que participan en la adhesión epitelial (132).

Además, el receptor polimérico basolateral--apical de la inmunoglobulina (pIgR)-media el transporte de IgA polimérico en vesículas a través de las células epiteliales o glandulares, IgA puede interceptar patógenos entrantes dentro de los compartimientos vesiculares de la célula epitelial (19,89). La IgA puede prevenir infecciones mucosales de la célula a través de mecanismos adicionales: como la neutralización del virus y la prevención de la infección de la célula, mediando el transporte del virus a través de la barrera epitelial vía pIgR (117),o por medio de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC Antibody-dependent cellular cytotoxicity) que conducen a la destrucción de las células infectadas locales (14,137).

A través de estos resultados se observa la importancia de la ruta intranasal , para generar respuesta inmune en mucosas distantes como lo es en vagina , generando principalmente respuesta inmune de anticuerpos IgA , mas no así en la provocada por la inmunización intraperitoneal la cual indujo menores niveles de IgA , pero mayores de IgG (Graf:4) así se define que NALT es un sitio inductivo importante para la iniciación de las respuestas mucosales antígeno-específicas de IgG de IgA , así como inmunorespuestas CTL, en sitios mucosales y sistémicos, NALT funciona para maximizar la barrera inmunológica. El desarrollo de una vacuna basada en la inducción en el NALT, que es uno de los componentes dominantes del tejido linfoide organizado, y contiene todas las células inmunocompetentes que se requieren para la inducción de inmunorespuestas antígeno-específicas. Teniendo por lo tanto un papel central en el desarrollo de una vacuna nasal. La vacunación nasal ha demostrado ser un régimen eficaz para el estímulo del sistema inmune respiratorio, esta ruta de la inmunización mucosal puede generar inmunorespuestas antígeno-específicas humorales y celulares, al aplicar dosis más pequeña del antígeno que en la vacunación oral, porque los antígenos no son expuestos a la degradación por las enzimas digestivas. (92,150,145,55,62,74).

En este trabajo se examinó la utilidad de Cry-1Ac como adyuvante para aumentar la respuesta inmune al péptido r T1SP10 ya que en investigaciones anteriores indicaban que la protoxina Cry1Ac podría ser atractiva para su uso en vacunas sistémicas y de mucosas debido a las características que ha presentadó como inmunogeno y adyuvante de proteínas y polisacáridos (135,97). Además se había observado que la pCry1Ac *in vitro* era capaz de activar a linfocitos B y TCD4⁺ e incrementar la expresión de IL-2 e IFN- en linfocitos provenientes del bazo y placas de Peyer. Sin embargo los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que ni Cry1Ac ni la CT que es considerada el mejor inmunógeno y adyuvante de mucosas, ejercieron efecto adyuvante alguno en las respuestas de anticuerpos hacia el péptido recombinante T1SP10MN(A).

En este trabajo se coadministró el péptido con la toxina de cólera como adyuvante porque en varios trabajos se mostraron que es un potente adyuvante, aunque también hay algunos reportes en que al igual que lo encontrado por nosotros ha carecido de utilidad como adyuvante. (115). Aunque nosotros no observamos efecto adyuvante de CT, las formas descritas en que la toxina de cólera mejora la respuesta inmune son las siguientes: (a) incremento de la permeabilidad del epitelio intestinal que conduce a una alta absorción del antígeno co-administrado; (b) aumento de la presentación del antígeno por una variedad de células; (c) promoción de la diferenciación del isótipo en células B que incrementan la formación de IgA; y (d) estimulación del complejo así como efectos inhibitorios sobre la proliferación de células T y la producción de citocinas. CT aumenta la presentación del antígeno por células dendríticas (DC), macrófagos y células B, CT ha mostrado regular la expresión de moléculas MHC/HLA-DR, CD80/B7.1 y CD86/B7.2 co-estimulando moléculas así como receptores de quimiocinas como CCR7 y CXCR4. Además, CT también induce la secreción de IL-1 desde DC; CT induce principalmente respuestas inmunes Th2 caracterizadas por células T+CD4 células que producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y por la producción de IgA, IgG1 y anticuerpos IgE. (35,43, 60,83).

El uso de adyuvantes es útil cuando se requiere incrementar la respuesta inmune hacia antígenos que no son inmunogénicos por sí mismos, sin embargo cuando los antígenos son altamente inmunogénicos como es el caso de T1SP10MN(A), el uso de adyuvantes como CT o Cry1Ac no es útil, posiblemente porque parte de la respuesta inmune se dirige hacia el adyuvante y otra parte hacia el inmunógeno.

Por otra parte los resultados en los que se encontró una notable disminución de la respuesta inmune hacia el péptido al coadministrarlo con Cry1Ac, también podrían sugerir que Cry1Ac pudiera estar creando tolerancia hacia el péptido.

La tolerancia mucosal es un mecanismo por el cual el sistema inmunológico se abstiene de responder de una manera deletérea a antígenos inofensivos que entran en contacto a través de las superficies mucosales. La base inmunológica de este fenómeno no se entiende totalmente, pero por lo menos se han descrito tres mecanismos diferentes: (A) la ignorancia del antígeno por el sistema inmunológico; (b) deleción de células T que responden al antígeno ingerido; (c) la generación de células del T reguladoras que controlan y modulan abajo la respuesta inflamatoria (39), la inducción natural de tolerancia oral podría ser potencialmente útil como profiláctico o para tratamientos terapéuticos para las enfermedades inflamatorias. Sin embargo, se requieren adyuvantes para la inducción eficaz de inmunidad mucosal, que refuercen la tolerancia mucosal para la aplicación de una inmunoterapia eficaz.

La inducción de tolerancia mucosal es antígeno-específica pero puede expresarse de una manera no específica ('by stander suppression') a través de citocinas supresoras producidas por células T reguladoras en el órgano inflamado, este acercamiento se ha utilizado para suprimir las respuestas inmunes contra los mismo-antígenos; sin embargo. Ha sido posible prevenir o retardar el ataque autoinmune en enfermedades experimentales en varios sistemas animales seleccionando autoantígenos o derivados de péptidos(56), en modelos de

ratones de artritis autoinmune, 1 diabetes tipo 1, encefalitis autoinmune experimental, miastenia gravis, condritis autoinmune, uveitis autoinmune y tyroditis autoinmune. Todas las rutas de administración mucosal (intranasal, bucal, rectal, genital) son eficaces para inducir tolerancia, aunque los grados varían. La dosificación, la ruta y frecuencia de administración del autoantígeno han demostrado ser cruciales. Considerando que las dosis bajas de antígenos administrados nasalmente favorecen la proliferación de células T reguladoras que producen IL-10, dosis bajas del antígeno administrados por la ruta oral promueven la activación de células CD8+ y CD4+ reguladas por células T produciendo TGF-. Dosis grandes de antígenos parecen inducir efectos alérgicos de células T+CD4, considerando que dosis altas pueden inducir su apoptosis; La absorción de péptidos por la mucosa puede producir el desarrollo de inmunidad o tolerancia, o incluso ambos, la decisión se toma en el epitelio o en el tejido linfoide subyacente y principalmente se determina por la naturaleza físico-química del antígeno. La tolerancia puede transferirse por suero y células de los animales tolerados, posiblemente los anticuerpos humorales IgA, antígenos circulantes o fragmentos tolerogénicos y citocinas pueden actuar para conferir una la respuesta TH1 O TH2 de células T, se ha observado que la inducción de tolerancia sistémica a través de la mucosa depende de la barrera epitelial sugiriendo una función central. El papel de las células absorbentes del epitelio, como los enterocitos intestinales, en la inducción de tolerancia se ha subrayado por varios estudios (88,67).

Los enterocitos del epitelio expresan moléculas co-estimuladoras como MHC clase I, las moléculas involucran en la presentación del antígeno a subpoblaciones de células T y formas anormales de moléculas MHC clase II, activando selectivamente células T+CD8 supresoras y la presentación abortiva a células T+ CD4, se han mostrado que los enterocitos del epitelio producen citocinas, como IL-10 y TGF- β , eficaces para suprimir la fase inductiva de respuestas mediadas por células T+CD4. Todos los tipos de APCs incluyendo DCs, macrófagos y células B, se presentan en los tejidos mucosales pero, debido a su heterogeneidad y de la dificultad de aislar subpoblaciones de APCs de los tejidos mucosales, su papel induciendo tolerancia no se ha elucidado todavía. Aunque las células B activadas y macrófagos del tejido son APCs poderosos para la memoria de las células T, la evidencia sugiere que la no estimulación de células B por la presentación del antígeno resulta en la tolerancia de células T (38,41).

La inducción de tolerancia sistémica se ha utilizado para suprimir las respuestas inmunes contra los mismos antígenos. Ha sido así posible retardar el ataque y disminuir la intensidad de las enfermedades autoinmunes experimentales en una variedad de sistemas animales por la inmunización mucosal de auto-antígenos en el intestinal, o la mucosa respiratoria (por inmunización intranasal de antígenos), por ejemplo, la administración oral de colágeno tipo II retarda el ataque de artritis autoinmune. (39)

Para ser eficaces, los candidatos a vacunas de HIV deben ser capaces de generar respuestas inmunes celulares además de humorales. En este trabajo se analizaron únicamente las respuestas de anticuerpos hacia el péptido rT1SP10MN(A), para estudios futuros se requiere caracterizar la respuesta inmune celular inducida ya que el péptido utilizado además del epítipo para linfocitos B, incluye un epítipo de linfocitos CD8+ y otro de linfocitos +CD4.

La magnitud de las respuestas de los isotipos IgG e IgA dependió de la ruta usada y del sitio mucosal analizado. Nuestros datos indican que la ruta de inmunización intranasal es eficiente para inducir respuestas inmunes sistémicas y en las mucosas. Varios estudios sugieren que la inmunización intranasal de antígenos es más potente que la inmunización vaginal, oral o rectal para inducir inmunorespuestas en la zona genital , y que la inmunización de i.p. induce respuestas vaginales más altas de IgG que por la inmunización vaginal directa (44,129). Esto se reafirma con los resultados encontrados en los cuales la respuesta de IgG fue mayor en la inmunización i.p. (Graf.4)

CONCLUSIONES

- El péptido recombinante r T1SP10 es altamente inmunogénico a nivel sistémico y de mucosas del intestino grueso y vagina.
- Cry1Ac y CT no tuvieron efecto adyuvante en las respuestas de anticuerpos anti r T1SP10, ya que el péptido por si solo indujo iguales o mayores respuestas sistémicas y en mucosas.
- La respuesta inmune inducida por r T1SP10 varía según la vía de administración utilizada y el sitio mucoso analizado, aportando evidencias sobre la regionalización del sistema inmune de mucosas.
- Las inmunizaciones intraperitoneal e intranasal de r T1SP10, resultaron eficaces para inducir altas respuestas de anticuerpos IgG anti-RT1SP10 en mucosas del tracto genital femenino.
- Se encontró que la vía i.p fue en general más efectiva que la intranasal ya que promovió niveles más altos de anticuerpos específicos en suero y mucosa intestinal, excepto en la mucosa vaginal donde se obtuvieron respuestas inmunes de IgA más altas por la vía intranasal.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahlers, J. D., C. D. Pendleton, N. Dunlop, A. Minassian, P. L. Nara, and J. A. Berzofsky. 1993. Construction of an HIV-1 peptide vaccine containing a multideterminant helper peptide linked to a V3 loop peptide 18 inducing strong neutralizing antibody responses in mice of multiple MHC haplotypes after two immunizations. *J. Immunol.* 150:5647.
2. Apter, F.M., Michetti, P., Winner, L.S.I., Mack, J.A., Mekalanos, J.J. and Neutra, M.R. (1993) Analysis of the roles of antilipopolysaccharide and anti-cholera toxin immunoglobulin A (IgA) antibodies in protection against *Vibrio cholerae* and cholera toxin by use of monoclonal IgA antibodies in vivo. *Infect. Immun.*, 61, 5279-5285.
3. Baba TW, Jeong YS, Penninck D, et al. 1995. Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science* 267:1820–25
4. Baba, T.W., Koch, J., Mittler, E.S., Greene, M., Wyand, M., Penninck, D. and Reprecht, R.M. (1994) Mucosal infection of neonatal rhesus monkeys with cell-free SIV. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 10, 351-357.
5. Baba, T.W., Liska, V., Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Xu, Ayehunie, S., Cavacini, L.A., Posner, M.R., Katinger, H., Stiegler, G., et al. 2000. Human neutralizing monoclonal antibodies of the subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat. Med.* 6, 200–206.
6. Barbas, C. F. et al. (1992) Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 9339–9343.
7. Barouch DH, Pau MG, Custers JH, et al. 2004. Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of pre-existing anti-Ad5 immunity. *J. Immunol.* 172:6290–97
8. Belyakov, I.M., Ahlers, J.D., Brandwein, B.Y., Earl, P., Kelsall, B.L. Moss, B., Strober, W., and Berzofsky, J.A. 1998a. The importance of local mucosal HIV-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes for resistance to mucosal-viral transmission in mice and enhancement of resistance by local administration of IL-12. *J. Clin. Invest.* 102, 2072–2081.
9. Belyakov, I.M., Ahlers, J.D., Clements, J.D., et al. 2000. Interplay of cytokines and adjuvants in the regulation of mucosal and systemic HIV-specific CTL. *J. Immunol.* 165:6454–6462.
10. Belyakov, I.M., Derby, M.A., Ahlers, J.D., et al. 1998. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal response. Mrsny, R.J., Daugherty, A.L., Fryling, C.M., et al. 1999. Mucosal administration of a chimera composed of *Pseudomonas* exotoxin and the gp120 V3 loop sequence of HIV-1 induces both salivary and serum antibody responses. *Vaccine* 17:1425–1433

11. Belyakov, I.M., Hel, Z., Kelsall, B., Kuznetsov, V.A., Ahlers, J.D., Nacsa, J., Watkins, D., Allen, T.M., Sette, A., Altman, J., et al. 2001. Mucosal AIDS vaccine reduces disease and viral load in gut reservoir and blood after mucosal infection of macaques. *Nat. Med.* 7, 1320–1326.
12. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17:657–700
13. Berzofsky, J. A., C. D. Pendleton, M. Clerici, J. Ahlers, D. R. Lucey, S. D. Putney, and G. M. Shearer. 1991. Construction of peptides encompassing multideterminant clusters of human immunodeficiency virus envelope to induce in vitro T cell responses in mice and humans of multiple MHC types. *J. Clin. Invest.* 97:876.
14. Black, K.P., Cummins, J.E. Jr. and Jackson, S. (1996) Serum and secretory IgA from HIV-infected individuals mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 81, 182-190.
15. Bomsel, M. 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat. Med.* 3, 42–47
16. Borsutzky, S., Fiorelli, V., Ebensen, T., et al. 2003. Efficient mucosal delivery of the HIV-1 Tat protein using the synthetic lipopeptide MALP-2 as adjuvant. *Eur. J. Immunol.* 33:1548–1556.
17. Bradney, C.P., Sempowski, G.D., Liao, H.X., Haynes, B.F. and Staats, H.F. (2002) Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization. *J. Virol.*, 76, 517-524.
18. Bukawa, H., Sekigawa, K., 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. *Nat. Med.*, 1, 681-685.
19. Burns, J.W., Siadat-Pajouh, M., Krishnaney, A.A. and Greenberg, H.B. (1996) *Science*, 272, 104-107.
20. Cameron, P.U., Freudenthal, P.S., Barker, J.M., Gezelter, S., Inaba, K., and Steinman, R.M. 1992. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4⁺ T cells. *Science* 257, 383–386.
21. Carlo Di Bello*, Antonella Pasquato and Monica Dettin 2004 Synthetic Peptides for AIDS Research *Current Protein and Peptide Science*, 5, 225-234
22. Chan DC, Fass D, Berger JM, et al. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 93:681–84
23. Check, E. 2003. AIDS vaccines: back to ‘plan A’. *Nature* 424, 912–914

24. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath P, Wu L, Mackay C, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85:1135–48
25. Cohen J. 2003. AIDS vaccine trial produces disappointment and confusion. *Science* 299:1290–91
26. Cotter, T.W., Meng, Q., Shen, Z.L., Zhang, Y.X., Su, H. And Caldwell, H.D. Protective efficacy of major outer membrane protein-specific immunoglobulin A (IgA) and IgG monoclonal antibodies in a murine model of Chlamydia trachomatis genital tract infection.(1995) *Infect. Immun.*, 63, 4704-4714.
27. Crowley-Nowick, P.A., Bell, M., Edwards, R.P., McCallister, D., Gore, H., Kanbour-Shakir, A., Mestecky, J. and Partridge, E.E. (1995) Normal uterine cervix: characterization of isolated lymphocyte phenotypes and immunoglobulin secretion *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34, 241-247.
28. D'Souza MP, Livnat D, Bradac JA, et al. 1997. Evaluation of monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type-1 primary isolates by neutralization assays: performance criteria for selecting candidate antibodies for clinical trials. *J. Infect.Dis.* 175:1056–62
29. D'Souza, M. P. *et al.* (1995). Neutralization of primary HIV-1 isolates by anti-envelope monoclonal antibodies. *AIDS* 9, 867–874.
30. Daniel MD, Kirchhoff F, Czajak SC, et al. 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion of the *nef* gene. *Science* 258:1938–41
31. Darren PWHI, Burton DR. 2001. The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv. Immunol.* 77:195–262
32. Dimmock, N. J. 1993. Neutralization of animal viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 183, 1–149.
33. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, et al. 1997. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15:617–48
34. Egan MA, Charini WA, Kuroda MJ, et al. 2000. Simian immunodeficiency virus (SIV) gag-DNA-vaccinated rhesus monkeys develop secondary cytotoxic T lymphocyte responses and control viral replication after pathogenic SIV infection. *J. Virol.* 74:7485–95
35. Eriksson K, Fredriksson M, Nordström I, Holmgren J. Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1/Th2 development. *Infect Immun* 2003;71:1740–7.
36. Eriksson, K., Quiding-Järbrink, M., Osek, J., Möller, Å., Björk, S., Holmgren, J. and Czerkinsky, C. (1998) Specific-antibody-secreting cells in the

rectums and genital tracts of nonhuman primates following vaccination. *Infect. Immun.*, 66, 5889-5896.

37. Evans TG, Keefer MC, Weinhold KJ, et al. 1999. A canarypox vaccine expressing multiple human immunodeficiency virus type 1 genes given alone or with rgp 120 elicits broad and durable CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in seronegative volunteers. *J. Infect. Dis.* 280:290–98

38. Eynon EE, Parker DC. Small B cells as antigenpresenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens *JExpMed* 1992;175:131-138.

39. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol* 1999;73:153–264.

40. Ferrantelli, F. and Ruprecht, R.M. (2002) Neutralizing antibodies against HIV -- back in the major leagues? *Curr. Opin. Immunol.*, 14, 495-502.

41. Fuchs EJ, Maczinger P B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 1992;258:1156-1159,

42. Fujihashi, K, and J. R. McGhee. The mucosal immune response. In *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. S. H. E. Kaufmann, ed. Edward Arnold, London, *In press*.

43. Gagliardi M, Sallusto F, Marinaro M, Vendetti S, Riccomi A, De Magistris M. Effects of the adjuvant cholera toxin on dendritic cells: stimulatory and inhibitory signals that result in the amplification of immune responses. *Int J Med Microbiol* 2002;291:571–5.

44. Gallichan W.S., Rosenthal K.L., Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus, *Vaccine* 13 (1995)1589–1595.

45. Ge, A. Z., R. M. Pfister, and D. H. Dean. 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. *Gene* 93:49–54.

46. Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., Kewal-Ramani, V.N., Littman, D.R., et al. 2000. DC-SIGN, La infección de HIV natural involucra que los mucosal aparecen del cuerpo que forma un límite con el mundo externo. a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances transinfection of T cells. *Cell* 100, 587–597.

47. Goudsmit, J., Debouck, C., Melen, H., Smit, L., Bakker, M., Asher, D.M., Wolff, A.V., Gibbs, C.J. and Gajdusek, D.C., 1988. , Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, pp. 4478–4482

48. Gould-Fogerite, S., Edghill-Smith, Y., Kheiri, M., et al. 1994. Lipid matrix-based subunit vaccines: a structurefunction approach to oral and parenteral immunization. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10:S99–S103.
49. Hart, M. K., T. J. Palker, T. J. Matthews, A. J. Langlois, N. W. Lerche, M. E. Martin, R. M. Scarce, C. McDanal, D. P. Bolognesi, and B. F. Haynes. 1990. Synthetic peptides containing T and B cell epitopes from human immunodeficiency virus envelope gp120 induce anti-HIV proliferative responses and high titers of neutralizing antibodies in rhesus monkeys. *J. Immunol.* 145:2677.
50. Hart, M. K., K. J. Weinhold, R. M. Scarce, E. M. Washburn, C. A. Clark, T. J. Palker, and B. F. Haynes. 1991. Priming of anti-human immunodeficiency virus (HIV) CD8⁺ cytotoxic T cells in vivo by carrier-free HIV synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9448
51. Haynes, B. F., V. Torres, A. J. Langlois, D. P. Bolognesi, M. Gardner, T. J. Palker, R. M. Scarce, D. M. Jones, M. A. Moody, C. McDanal, and T. J. Matprime. 1993. Induction of HIVMN neutralizing antibodies in primates using a 1.51:1646. boost regimen of hybrid synthetic gp120 envelope peptides. *J. Immunol.* 151:1646.
52. Herman F. Staats,* W. Garrett Nichols, and Thomas J. Palke. 1996. Mucosal Immunity to HIV-1. 1996. Systemic and Vaginal Antibody Responses After Intranasal Immunization with the HIV-1 C4/V3 Peptide TI SPIO MN(A). *The Journal of Immunology* April: 462-474
53. Hildesheim, A., McShane, L.M., Schiffman, M., Bratti, M.C., Rodriguez, A.C., Herrero, R., Morera, L.A., Cardenas, F., Saxon, L., Bowman, F.P. and Crowley-Nowick, P.A. (1999) Cytokine and immunoglobulin concentrations in cervical secretions: reproducibility of the Weck-cel collection instrument and correlates of immune measures. *J. Immunol. Methods*, 225, 131-143.
54. Hioe, C. E. et al. (1997). Neutralization of HIV-1 primary isolates by polyclonal and monoclonal human antibodies. *Int. Immunol.* 9, 1281–1290.
55. Hiroi, T. et al. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long term V3J1 peptide-specific neutralizing immunity in TH1- and TH2-deficient conditions. *J. Immunol.* 167, 5862–5867 (2001).
56. Hirsch VM, Fuerst TR, Sutter G, et al. 1996. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine
57. Hoffman TL, LaBranche CC, Zhang W, Canziani G, Robinson J, Chaiken I, Hoxie JA, Doms RW. 1999. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4- independent HIV- 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6359–64
58. Hofte, H., and H. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242–255.

59. Hoglund, S., Akerblom, L., Ozel, M., et al. 1990. Characterization of immunostimulating complexes (ISCOMS) of HIV-1. *Viral Immunol.* 3:195–206.
60. Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral–mucosal adjuvant and antigen vector system. *Vaccine* 1993;11:1179–84.
61. Igor M. Belyakov* and Jay A. Berzofsky. 2004, Immunobiology of Mucosal HIV Infection and the Basis for Development of a New Generation of Mucosal AIDS Vaccines Immunity, Vol. 20, 247–253, March,
62. Imaoka, K. *et al.* Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces TH1/TH2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J. Immunol.* 161, 5952–5958 (1998).
63. Imaoka, K., C. J. Miller, M. Kubota, M. B. McChesney, B. Lohman, M. Yamamoto, K. Fujihashi, K. Someya, M. Honda, J. R. McGhee, and H. Kiyono. 1998. Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J. Immunol.* 161:5952 in modified vaccinia virus Ankara. *J. Virol.* 70:3741–52
64. Ishizaka, S. T., P. Piacente, J. Silva, and E. M. Mishkin. 1995. IgG subtype is correlated with efficiency of passive protection and effector function of anti-herpes simplex virus glycoprotein D monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 172:1108-1111
65. Jackson, S., Mestecky, J., Moldoveanu, Z. and Spearman, P. (1999) In *Mucosal Immunology*, Second edition, pp. 1567-1575.
66. Javaherian, K., Langlois, A.J., McDanal, C., Ross, K.L., Eckler, L.I., Jellis, C.L., Profy, A.T., Rusche, J.R., Bolognesi, D.P., Putney, S.D. and Matthews, T., 1989. , Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, pp. 6768–6772
67. Kaiserhan D. The intestinal epithelial cell: a non conventional type of antigen-presenting cell. In: Auricchio S, Ferguson A, Troncone R, eds. *Mucosal immunity and the gut epithelium: interactions in health and disease*. Basel: Karger; 1995, p. 32-39,
68. Kawamura, M., Naito, T., Ueno, M., Akagi, T., Hiraishi, K., Takai, I., Makino, M., Serizawa, T., Sugimura, K., Akashi, M. and Baba, M. (2002) Induction of mucosal IgA following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Virol.*, 66, 291-298.
69. Klavinskis, L.S., Barnfield, C., Gao, L. and Parker, S. (1999) Intranasal immunization with plasmid DNA-lipid complexes elicits mucosal immunity in the female genital and rectal tracts *J. Immunol.*, 162, 254-262.

70. Kozlowski, P.A., and Neutra, M.R. 2003. The role of mucosal immunization in prevention of HIV transmission. *Curr. Mol. Med.* 3, 217–228.
71. Kozlowski, P.A., Cu-Uvin, S., Neutra, M.R. and Flanigan, T.P. (1997) Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women *Infect. Immun.*, 65, 1387-1394.
72. Kozlowski, P.A., Lynch, R.M., Patterson, R.R., Cu-Uvin, S., Flanigan, T.P. and Neutra, M.R. (2000) Modified wick method using Weck-Cel sponges for collection of human rectal secretions and analysis of mucosal HIV antibody. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 24, 297-309.
73. Kozlowski, P.A., Williams, S.B., Lynch, R.L., Flanigan, T.P., Patterson, R.R., Cu-Uvin, S. and Neutra, M.R. (2002) Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle *J Immunol.*, 169, 566-574.
74. Kurono, Y. *et al.* Nasal immunization induces *Haemophilus influenzae*-specific TH1 and TH2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. *J. Infect. Dis.* 180, 122–132 (1999).
75. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393: 648–59
76. Lambert, J.S., Keefer, M., Mulligan, M.J., et al. 2001. A Phase I safety and immunogenicity trial of UBI microparticulate monovalent HIV-1 MN oral peptide immunogen with parenteral boost in HIV-1 seronegative human subjects. *Vaccine* 19:3033–3042.
77. Lamm, M.E. (1997) Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.*, 51, 311-340.
78. Learmont JC, Geczy AF, Mills J, et al. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. *N. Engl. J. Med.* 340:1715–22
79. Lehner, T. 2002. The role of CCR5 chemokine ligands and antibodies to CCR5 coreceptors in preventing HIV infection. *Trends Immunol.* 23 347–351.
80. Leonard CK, Spellman NW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. 1990. Assignment of intrachain disulphide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265:10373–82
81. Lian, T., Bui, T., and Ho, R.J. 1999. Formulation of HIV-envelope protein with lipid vesicles expressing ganglioside GM1 associated to cholera toxin B enhances mucosal immune responses. *Vaccine* 18:604–611.

82. Lowell, G.H., Kaminski, R.W., VanCott, T.C., Slike, B., Kersey, K., Zawoznik, E., Loomis-Price, L., Smith, G., Redfield, R.R., Amselem, S. and Birx, D.L. (1997) Proteosomes, emulsomes, and cholera toxin B improve nasal immunogenicity of human immunodeficiency virus gp160 in mice: induction of serum, intestinal, vaginal, and lung IgA and IgG. *J. Infect. Dis.*, 175, 292-301.
83. Lycke N. The mechanism of cholera toxin adjuvanticity. *Res Immunol* 1997;148:504–20.
84. M. H. V. Van Regenmortel. 2001. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. *Biologicals* 29, 209–213
85. Maksyutov, A.Z., Bachinskii, A.G., Bazhan, S.I. 2002. Searching for local similarities between HIV-1 and human proteins. Application to vaccines. *Mol. Biol. (Mosk.)* 36:447–459.
86. Mannino, R.J., Canki, M., Feketeova, E., et al. 1998. Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:273–287.
87. Mascola, J.R., Stiegler, G., VanCott, T.C., Katinger, H., Carpenter, C.B., Hanson, C.E., Beary, H., Hayes, D., Frankel, S.S., Birx, D.L. and Lewis, M.G. (2000) Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat. Med.*, 6, 207-210.
88. Mayer L, So LP, Yio XY, Small G. Antigen trafficking in the intestine. *AnnNYAcadSci* 1996;778:28-35.
89. Mazanec, M.B., Kaetzel, C.S., Lamm, M.E., Fletcher, D. And Nedrud, J.G. (1992) Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6901- 6905.
90. McGhee, J. R., and H. Kiyono. 1998. The mucosal immune system. In *Fundamental Immunology*, 4th Ed. W. E. Paul, ed. Academic Press, San Diego, p. 909.
91. Meng, G., Wei, X., Wu, X., Sellers, M.T., Decker, J.M., Moldoveanu, Z., Orenstein, J.M., Graham, M.F., Kappes, J.C., Mestecky, J., et al. 2002. Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5 cells. *Nat. Med.* 8, 150–156.
92. Mestecky, J., Blumberg, R., Kiyono, H. & McGhee, J. R. in *Fundamental Immunology* 5th edn Ch. 31 (ed. Paul, W. E.) 965–1020 (Academic, San Diego, 2003).
93. Meyer, D., Anderson, D.E., Gardner, M.B., et al. 1998. Hypervariable epitope constructs representing variability in envelope glycoprotein of SIV induce a broad humoral immune response in rabbits and rhesus macaques. *AIDS Res. Hum. Retro.* 14:751–760.

94. Michetti, P., Mahan, M.J., Slauch, J.M., Mekalanos, J.J. and Neutra, M.R. (1992) Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 60, 1786-1792.
95. Moore JP, Sattentau QJ, Wyatt R, Sodroski J. 1994. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J. Virol.* 68:469–84
96. Moore JP, Sodroski J. 1996. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J. Virol.* 70:1863–72
97. Moreno-Fierros, L., E. J. Ruiz-Medina, R. Esquivel, R. Lo´pez-Revilla, and S. Piña-Cruz. 2003. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand. J. Immunol.* 57:45–55.
98. Moreno-Fierros, L., N. Garc´ıa, R. Guti´errez, R. Lo´pez-Revilla, and R. I. Va´zquez-Padron. 2000. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in BALB/c mice. *Microb. Infect.* 2:885–890.
99. Mrsny, R.J., Daugherty, A.L., Fryling, C.M., et al. 1999. Mucosal administration of a chimera composed of *Pseudomonas* exotoxin and the gp120 V3 loop sequence of HIV-1 induces both salivary and serum antibody responses. *Vaccine* 17:1425–1433.
100. Murphy-Corb M, Martin LN, Davison-Fairburn B, et al. 1989. A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science* 246:1293–97
101. Neidleman, J.A., Vajdy, M., Ugozzoli, M., et al. 2000. Genetically detoxified mutants of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* are effective adjuvants for induction of cytotoxic T-cell responses against HIV-1 gag-p55. *Immunology* 101:154–160
102. Neutra, M.R., Pringault, E., and Kraehenbuhl, J.-P. 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 275–300.
103. Norman L. Letvin. 2005. PROGRESS TOWARD AN HIV VACCINE. *Harvard Medical School, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Annu. Rev. Med.* 56:213–23
104. Nugent et al; 1998. Design and delivery of non-parenteral vaccines. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics.* 23: 257-285.

105. O'Hagan, D.T., Rafferty, D., McKeating, J.A., et al. 1992. Vaginal immunization of rats with a synthetic peptide from human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 73:2141–2145.
106. Offit, P.A. and Clark, H.F. (1985) *J. Virol.*, 54, 58-64. [68] Silvey, K.J., Hutchings, A.B., Vajdy, M., Petzke, M.M. and Neutra, M.R. (2001) Role of immunoglobulin A in protection against reovirus entry into Murine Peyer's patches. *J. Virol.*, 75, 10870-10879.
107. O'Neal, C.M., Harriman, G.R. and Conner, M.E. (2000) Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. *J. Virol.*, 74, 4102-4109.
108. Palker, T. J., M. E. Clark, A. J. Langlois. T. J. Matthews, K. J. Weinhold, R. R. Randall. D. P. Bolognesi, and S. F. Haynes. 1988. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to mv-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1932.
109. Palker, T. J., T. J. Matthews, A. Langlois, M. E. Tanner, M. E. Martin, R. M. Scearce. I. E. Kim, J. A. Berzofsky, D. P. Bolognesi, and S. F. Haynes. 1989. envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes. *J. Immunol.* Polyvalent human Immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of 142:3612.
110. Parr, E.L. and Parr, M.B. (1997) Immunoglobulin G is the main protective antibody in mouse vaginal secretions after vaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type 2. *J. Virol.*, 71, 8109-8115.
111. Parren, P.W., Marx, P.A., Hessel, A.J., Luckay, A., Harouse, J., Cheng-Mayer, C.,
112. Moore, J.P. and Burton, D.R. (2001) Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. *J. Virol.*, 75, 8340-8347.
113. Quesnel, A., Cu-Uvin, S., Murphy, D., Ashley, R.L., Flanigan, T. and Neutra, M.R. (1997) Comparative analysis of methods for collection and measurement of immunoglobulins in cervical and vaginal secretions of women. *J. Immunol. Methods*, 202, 153-161.
114. Redfield RR, Wright DC, James WD, et al. 1987. Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. *N. Engl. J. Med.* 316:673–76
115. Rita esquivel Perez ,and Leticia Moreno Fierros.2005.Mucosal and Systemic Adjuvant Effects of Cholera Toxin and Cry 1Ac Protoxin , on the SPECIFIC Antibody Response to HIV-1 C4/V3 Peptides, Are Different and Depend on the Antigen Co-Administered. *VIRAL IMMUNOLOGY* .V 18,4.
116. Robbins, J. B., Schneerson, R. & Szu, S. C. 1995. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against

infectious diseases by inactivating the inoculum. *J. Infect. Dis.* 171, 1387–1398. A review of the data that support the hypothesis that serum antibodies confer protection against viruses and bacteria by inactivating these pathogens.

117. Robinson, J.K., Blanchard, T.G., Levine, A.D., Emancipator, S.N. and Lamm, M.E. (2001) A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo. *J. Immunol.*, 166, 3688-3692.

118. Rusche, J.R., Javaherian, K., McDanal, C., Petro, J., Lynn, D.L., Grimaila, R., Langlois, A., Gallo, R.C., Arthur, L.O., Fischinger, P.J., Bolognesi, D.P., Putney, S.D. and Matthews, T.J., 1988. , Antibodies that inhibit fusion of HIV infected cells bind a 24 amino acid sequence of the viral envelope, gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, pp. 3198–3202

119. Russell, M.W., Kilian, M. and Lamm, M.E. (1999) In *Mucosal Immunology*, Second Edition., pp. 225-240. Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J. And McGhee, J.R. (eds). Academic Press, San Diego, CA.

120. Ryan, E. J., L. M. Daly, and K. H. G. Mills. 2001. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotechnol.* 19:293–304.

121. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., et al. 2003. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160–encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses. *J. Immunol.* 170:495–502.

122. Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, et al. 2002. Recombinant canarypox vaccine elicited CTL specific for dominant and subdominant simian immunodeficiency virus epitopes in rhesus monkeys. *J. Immunol.* 168:1847–53

123. Saull Rojas-Hernández. Marco A. Rodríguez-Monroy, Rubén López-Revilla, Aldo A. Reséndiz-Albor, and Leticia Orenó-Fierros^{1*}. 2004. Intranasal Coadministration of the Cry1Ac Protoxin with Amoebal 4368–4375 Lysates Increases Protection against *Naegleria fowleri* Meningoencephalitis. VOL. 72, 4368–4375

124. Shen L, Chen ZW, Miller MD, et al. 1991. Recombinant virus-vaccine-induced SIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Science* 252:440–43

125. Shiver JW, Emini EA. 2004. Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. *Annu. Rev. Med.* 55:355–72

126. Shiver JW, Fu TM, Chen L, et al. 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415:331–35

127. Snapper, C. M., and F. D. Finkelman. 1993. Immunoglobulin class switching, p. 837-864. In W. E. Paul (ed.), *Fundamental immunology*. Raven Press, New York, N.Y.

128. Spira, A.I., Marx, P.A., Patterson, B.K., Mahoney, J., Koup, R.A., Wolinsky, S.M., and Ho, D.D. 1996. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J. Exp. Med.* 183, 215–225.
129. Staats H.F., Montgomery S.P., Palker T.J., Intranasal immunization is superior to vaginal, gastric, or rectal immunization for the induction of systemic and mucosal anti-HIV antibody responses, *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 13 (1997) 945–952.
130. Staats, H.F., Bradney, C.P., Gwinn, W.M., Jackson, S.S., Sempowski, G.D., Liao, H.X., Letvin, N.L. and Haynes, B.F. (2001) Cytokine requirements for induction of systemic and mucosal CTL after nasal immunization. *J. Immunol.*, 167, 5386-5394.
131. Starlich BR, Hahn BH, Shaw GM, Mc-Neely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC. 1986. Identification and characterisation of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the Retrovirus of AIDS. *Cell* 45:637–48
132. Svanborg-Eden, C. and Svennerholm, A.M. (1978) Secretory immunoglobulin A and G antibodies prevent adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infect. Immun.*, 22, 790-797.
133. The QIAexpressionist™ March 2001 Fifth Edition.
134. Vazquez-Padron, R. I., L. Moreno-Fierros, L. Neri-Baza'n, G. de la Riva, and R. Lopez-Revilla. 1999. Intra-gastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci.* 64:1897–1912.
135. Vazquez-Padron, R. I., L. Moreno-Fierros, L. Neri-Baza'n, G. de la Riva, and R. Lopez-Revilla. 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 49:578–584.
136. Van Egmond, M., Damen, C.A., van Spruiel, A.B., Vidarsson, G., van Garderen, E. and van de Winkel, J.G.J. (2001) IgA and the IgA Fc receptor *Trends Immunol.*, 22, 205-211.
137. Van Rompay, K.K., Berardi, C.J., Dillard-Telm, S., Tarara, R.P., Canfield, D.R., Montefiori, D.C., Cole, K.S., Montelaro, R.C., Miller, C.J. and Marthas, M.L. (1998) Passive immunization of newborn rhesus macaques prevents oral simian immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, 177, 1247-1259.
138. VanCott, T.C., Kaminski, R.W., Mascola, J.R., Kalyanaraman, V.S., Wassef, N.M., Alving, C.R., Ulrich, J.T., Lowell, G.H. and Birx, D.L. (1998) HIV-1 neutralizing antibodies in the genital and respiratory tracts of mice intranasally immunized with oligomeric gp160. *J. Immunol.*, 160, 2000-2012.

139. Veazey, R.S., DeMaria, M., Chalifoux, L.V., Shvetz, D.E., Pauley, D.R., Knight, H.L., Rosenzweig, M., Johnson, R.P., Desrosiers, R.C., and Lackner, A.A. 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4⁺ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280, 427–431.
140. Vecino, W.H., Morin, P.M., Agha, R., Jacobs, W.R. Jr. And Fennelly, 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. *Immunol. Lett.*, 82, 197-204.
141. Winchell JM, Van Kruiningen HJ, Silbart LK. 1997 Mucosal immune response to an HIV C4/V3 peptide following nasal or intestinal immunization of rabbits. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Jul 1;13(10):881-9
142. Winner, III, L.S., Mack, J., Weltzin, R.A., Mekalanos, J.J., Kraehenbuhl, J.-P. and Neutra, M.R. (1991) *Infect. Immun.*, 59, 977-998.
143. Wolinsky, S.M., Wike, C.M., Korber, B.T.M., Hutto, C., Parks, W.P., Rosenblum, L.L., Kunstman, K.J., Furtado, M.R., and Munoz, J.L. 1992. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* 255, 1134–1137.
144. Wright, P.F., Kozlowski, P.A., Rybczyk, G.K., Goepfert, P., Staats, H.F., VanCott, T.C., Trabattoni, D., Sannella, E. and Mestecky, J. (2002) Detection of mucosal antibodies in HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 18, 1291-1300.
145. Yanagita, M. *et al.* Nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) immunity: fimbriae-specific TH1 and TH2 cell-regulated IgA responses for the inhibition of bacterial attachment to epithelial cells and subsequent inflammatory cytokine production. *J. Immunol.* 162, 3559–3565 (1999).
146. Yasutomi Y, Koenig S, Haun SS, *et al.* 1993. Immunization with recombinant BCG-SIV elicits SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys. *J. Immunol.* 150: 3101–7.
147. Ye Y, Si ZH, Moore JP, *et al.* 2000. Association of structural changes in the V2 and V3 loops of the gp120 envelope glycoprotein with acquisition of neutralization resistance in simian-human immunodeficiency virus passaged in vivo. *J. Virol.* 74:955–62.
148. Yoshizawa, I., Soda, Y., Mizuochi, T., *et al.* 2001. Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. *Vaccine* 19:2995–3003.
149. Yuki, Y. & Kiyono, H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev. Med. Virol.* 13, 293–310 (2003).
150. Zhang, Z.-Q., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K.A., Reimann, K.A., Reinhart, T.A., Rogan, M., Cavert, W., Miller, C.J., *et al.* 1999.

Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in ciency virus-infected rhesus macaques. *J. Immunol.* 155, 5855–resting and activated CD4_ T cells. *Science* 286, 1353–1357.