



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“INMUNIZACIÓN GÉNICA CON
EPÍTOPOS VARIABLES DE VIH-1”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A:

Q.C.B.CLAUDIA LISETTE CHARLES NIÑO

DIRECTOR DE TESIS: DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RECONOCIMIENTOS

A CONACYT por otorgarme una beca con numero de registro 189656 para llevar a cabo mis estudios de Maestría.

A Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por otorgarme un complemento de beca para llevar a cabo mis estudios.

A mi Comité Tutorial : Dra. Luz Maria Lopez Marin, Dr Luis Vaca Dominguez y Dr. Karen Manoutcharian.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Karen Manoutcharian Airapetian.

A César y Grecia con mucho amorsss....
Por amarme y estar conmigo siempre
Sin tu llegada preciosa, esta tesis no existiría

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a Dios quien me permite lograr mis metas dandome salud y el cariño de mucha gente.

A mi precioso, César, por ayudarme, apoyarme, alentarme, creer en mi, por la oportunidad de hacernos felices, gracias por todo, TE AMO.

A mis padres y abuelo (Q.E.D.) por enseñarme a valorar el trabajo, por educarme en la constante búsqueda de la superación. Gracias por la libertad y confianza.

A mis hermanos: Yaya, Nelly, Keka, Gris, Gina y Memo cuya pasión por sus trabajos, estudios o actividades cotidianas me motivó a seguir adelante cada día, además de su apoyo incondicional cuando estábamos lejos.

A mis sobrinos hermosos Tenoch y Josesito por que sus sonrisas me ayudaron mucho en momentos de tristeza.

A mi amiga incondicional Tany a quien agradezco mucho su comprensión y su compañía en cada fracaso y triunfo en mi vida, lo logre gracias a tu incansable apoyo.

A mis amigos : Jorge, Rene, Alma, Memo, Omar, Ulises, Mario, Rolando, Mariano y Adrián a quienes agradezco por estar conmigo de una u otra forma.

A Dora y Angel, gracias por querer tanto a nuestra Grecia y quedarse con ella para que pudiera escribir esta tesis, además de esta amistad tan linda.

A mis padres de la ciencia por que con su ejemplo me motivaron a elegir este camino: M. en C. Agustina Vega Alonso, M. en C. Maria Guadalupe Rodriguez, Dra. Ana Ma Rivas Estilla, M. en C. Ma. De Lourdes Garza, M. en C. Carmen Barboza, Dra. Karina Trujillo y Dr Karen Manoutcharian.

A el Dr. Karen Manoutcharian quien nos ha enseñado a vivir con su filosofía y de quien aprendi muchisimo más que solo ciencia para el futuro próximo, gracias por su mayor enseñanza : “es mejor morir como hombres antes que vivir como ratas“ .

A mis compañeros de laboratorio, por sus consejos, sus regaños y sobretodo por hacer ameno cualquier momento: M. en C. Jorge, Alejandra, Carmen, Hilda, Rodrigo, Lenin, Mayra, Marcia , M. en C. Gonzalo y M. en C. Mariel. Al Dr. Jose de Jesus por su gran ayuda y comentarios en la redacción en inglés.

Al IIB y a la UNAM por haberme dado la oportunidad de superarme y lograr esta meta.

A CONACyT y a DGEP por haberme brindado una beca para poder realizar mis estudios de maestría.

ÍNDICE

CONTENIDO	PAG.
I. Resumen.	6
II. Abstract.	8
III. Introducción.	
3.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).	10
3.1.1 Subtipos de VIH.	11
3.1.2 Genoma y estructura.	13
3.1.3 Proteínas virales.	15
3.1.4 Ciclo viral.	21
3.1.5 Epidemiología.	25
3.1.6 Patogénesis.	25
3.1.7 Respuesta inmune contra la infección.	27
3.1.8 Vacunas.	28
3.2 Procesamiento antigénico.	31
3.2.1 Procesamiento para la presentación por MHC I.	31
3.2.2 Procesamiento para la presentación por MHC II.	32
3.2.3 Aminoácidos de anclaje para MHC I.	34
3.2.4 Importancia de la diversidad de HLA y la infección por VIH.	35
3.3 Inmunización génica	37
3.4 Despliegue en fagos filamentosos	39
IV. Planteamiento del problema	41
V. Hipótesis.	41
VI. Objetivo.	41
VII. Objetivos Específicos.	41
VIII. Metodología.	
8.1 Construcción de inmunógenos y antígenos.	42
8.1.1 Diseño de oligonucleótidos.	42
8.1.2 Ensamblaje de la cadena pesada de una inmunoglobulina.	44
8.1.3 Amplificación por PCR.	49
8.1.4 Clonación de los inmunógenos y antígenos.	51

8.1.5 Obtención de fagos recombinantes.	53
8.1.6 Purificación de ADN de cadena sencilla.	54
8.1.7 Secuenciación.	55
8.1.8 Extracción de ADN plásmidico.	55
8.2 Inmunización.	56
8.3 Ensayos de proliferación celular.	56
IX. Resultados	
9.1 Obtención de inmunógenos y antígenos.	58
9.2 Secuenciación.	60
9.3 Inmunización	63
9.4 Ensayos de proliferación celular.	64
X. Discusión	69
XI. Conclusiones	73
XII. Perspectivas	75
XIII. Bibliografía	76

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Ad5	Adenovirus serotipo 5
ADN	Acido Desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
APL	Péptidos modificados (<i>Altered peptide ligands</i>)
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
cb	Carbincilina
CDR	Región determinante de la Complementariedad (<i>Complementary determining Regions</i>)
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
cpm	Cuentas por minuto
CRFs	Formas Recombiantes Circulantes (<i>Circulating Recombinant Forms</i>)
CTh	Célula T cooperadora CD4+ (Th)
CTL	Célula T Citotóxica CD8+
D.O.	Densidad óptica
dNTPs	Deoxinucleotidos Trifosfatados
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
Ea	Biblioteca de epítipo Gag en fago M13 AMXMLXXXI
Eb	Biblioteca de epítipo Gag en fago M13 AXQXLXETX
EgN	Epítipo Gag nominal en fago M13
ELN	Epítipo L nominal en fago M13
ELv	Biblioteca de epítipo L en fago M13
Epítipo Gag	Epítipo CTL que deriva de la proteína p24 ¹⁹⁷ AMQMLKETI ²⁰⁵
Epítipo L	Epítipo CTL que deriva del loop V3 de la proteína gp 120 ³¹⁸ RGPGRAFVTI ³²⁷
EtOH	Etanol
FR	Región intermedia entre las regiones de complementariedad de una inmunoglobulina (<i>Framework</i>)
HCDR3	Región determinante de complementariedad 3 de la cadena pesada de una inmunoglobulina
HLA	Antígeno Leucocitario Humano (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
IE	Indice de Estimulación
Ig	Inmunoglobulina
IN	Enzima Integrasa
kDa	Kilodaltones
kn	Kanamicina
LTNP	Pacientes progresores Lentos (<i>Long Terminal Non-Progresors</i>)
LTR	Secuencias repetitivas largas (<i>Long Terminal Repeat</i>)
MA	Proteína de la Matriz celular de VIH
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Mg	Magnesio
mL	Mililitro

mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NC	Proteína de la Núcleo Cápside de VIH
Nef	Factor negativo (proteína de VIH)
NES	Secuencia de exportación nuclear
ng	Nanogramos
NGN	Construcción de epítipo Gag nominal (ADN)
NGRa	Biblioteca de epítipo Gag (ADN) AMXMLXXXI
NGRb	Biblioteca de epítipo Gag (ADN) AXQXLXETX
NIH	Instituto Nacional de Salud (<i>National Institute of Health</i>)
NLS	Secuencia de localización nuclear
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Sitio de Reconocimiento del cebador (<i>primer binding site</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PIC	Complejo de pre-integración viral
PNRF	Construcción de péptido no relacionado en fago M13
PT	Enzima Proteasa
RE	Retículo Endoplásmico
REr	Retículo Endoplásmico rugoso
Rev	Regulador de la expresión de proteínas virales (proteína de VIH)
rpm	Revoluciones por minuto
RRE	Elemento Respuesta de Rev
RT	Enzima Transcriptasa Reversa
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV	Virus de la Inmunodeficiencia de Simios
SU	Glicoproteína de Superficie de VIH
TAP	Transportador Asociado al procesamiento de antígeno
Tat	Transactivador de la transcripción (proteína de VIH)
TM	Glicoproteína de Transmembrana de VIH
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de colonias
V _H	Región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina
VHBL	Biblioteca de epítipo L (ADN)
VHPL	Construcción de epítipo L nominal (ADN)
Vif	Factor de la infectividad viral (proteína de VIH)
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
μCi	Microcuries
μg	Microgramos
μl	Microlitro

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figuras

1. Tipos y subtipos del VIH	11
2. Distribución mundial del VIH-1	12
3. Estructura del VIH-1	13
4. Genoma del VIH-1	14
5. Ciclo viral del VIH-1	21
6. Respuesta inmune generada en las tres etapas de la infección por el VIH-1	26
7. Procesamiento de antígenos para la presentación por moléculas MHC-I	32
8. Procesamiento de antígenos para la presentación por moléculas MHC-II	33
9. Aminoácidos de anclaje preferentes para la molécula HLA I	34
10. Esquema representativo de un fago filamentoso	40
11. Secuencia de aminoácidos del epítipo/péptido Gag silvestre y modificaciones en aminoácidos de anclaje	43
12. Secuencia de aminoácidos del epítipo/péptido L silvestre y modificaciones en aminoácidos centrales	44
13. Ensamblaje de la V _H de una Inmunoglobulina	46
14. Vector VHEXpress	51
15. Vector fagémido p8GSAET	51
16. Confirmación de clonas positivas de la biblioteca NGRa	59
17. Confirmación de clonas positivas de la biblioteca Ea	60
18. ADN de cadena sencilla	60
19. Índices de estimulación del ensayo de proliferación celular realizados a los ERI con las diferentes construcciones del epítipo L en forma de ADN.	65
20. Índices de estimulación del ensayo de proliferación celular realizados a los ERI con las diferentes construcciones del epítipo L en forma de fagos recombinantes.	66
21. Índices de estimulación del ensayo de proliferación celular realizados a los ERI con las diferentes construcciones del epítipo L en forma de fagos recombinantes (3 días de estimulación).	67
22. Índices de estimulación del ensayo de proliferación celular realizados a los ERI con las diferentes construcciones del epítipo Gag en forma de ADN.	68

Tablas

1. Reacción de ensamblaje	45
2. Secuencias de los oligonucleótidos	47
3. Reacción de amplificación para clonación en VHEXpress	49
4. Condiciones de reacción	49
5. Reacción de amplificación para clonación en pG8SAET	50
6. Condiciones de reacción	50
7. Protocolo de inmunización y ensayo de proliferación celular	56
8. Secuencia en aminoácidos de los antígenos secuenciados	52
9. Grupos e inmunógenos utilizados	64

I.- RESUMEN

INMUNIZACIÓN GÉNICA CON EPÍTOPOS VARIABLES DE VIH-1

INTRODUCCIÓN. Actualmente existen 40 millones de personas infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), en este año han muerto mas de 3 millones a causa del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). La generación de una respuesta inmune amplia en la fase aguda de la infección es crucial en la contención del virus y progresión a SIDA. La importancia de la respuesta inmune celular en la contención viral y progresión a SIDA ha sido comprobada por múltiples hallazgos encontrados en experimentos *in vivo* e *in vitro*; 1) la presencia de una respuesta amplia de linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos están asociados a la disminución en la carga viral mantenida por años en pacientes progresores lentos (LTNP) en comparación con los que no lo son, 2) en macacos se ha mostrado que la depleción de CTLs aumenta drásticamente la carga viral y la progresión a la enfermedad, 3) en líneas celulares infectadas y en contacto con CTL aislados de pacientes infectados existe inhibición de la replicación viral. La hipótesis principal para explicar la falta de esta respuesta protectora en la mayoría de los pacientes infectados, es el escape a través de mutaciones en los epítopos virales. Se argumenta que los antígenos de naturaleza variable (VIH-1) predeterminan el comportamiento del sistema inmune, de manera que al ponerse en contacto con nuevas variantes del antígeno, se estimulan preferentemente aquellas clonas de células B y T de memoria, cuyos receptores de superficie reconocen las secuencias originales del antígeno o no reconocen nuevas variantes. Esto pudiera inhibir la capacidad del sistema inmune para combatir la infección.

Se sabe que los epítopos presentados en moléculas del MHC-I son generalmente de proteínas intracelulares tanto propias como foráneas y el surco o hendidura de este alberga péptidos procesados de entre 8 y 11 aminoácidos. Cada haplotipo de MHC-I tiene preferencia por ciertos aminoácidos en posiciones 1,2 y 8,9 del epítipo y que se denominan aminoácidos de anclaje. Se ha reportado que un cambio en uno de estos aminoácidos de un epítipo restringido a cierto MHC-I, puede no unirse a este haplotipo específico, o puede ser cargado por otro siempre y cuando el cambio sea por un aminoácido de anclaje preferencial para este haplotipo. Muchos estudios han demostrado que modificaciones en los aminoácidos de anclaje en un determinado epítipo CTL con el objetivo de incrementar la afinidad péptido/MHC puede potenciar su inmunogenicidad.

Una nueva estrategia para el desarrollo de una vacuna exitosa puede ser la construcción de inmunógenos capaces de inducir la respuesta celular amplia que reconozca variantes de un epítipo CTL además de ser presentado por diferentes haplotipos. Esto podría lograrse al usar bibliotecas de variantes de este epítipo cuyas variaciones sean en las posiciones de anclaje y en el centro del epítipo. El desarrollo de este nuevo concepto de vacuna nos permitirá atacar los principales y más fuertes obstáculos que se presentan al elaborar una vacuna contra VIH-1, así como otros patógenos con altos niveles de variabilidad antigénica. OBJETIVO. Construcción de inmunógenos con las características necesarias para inducir un diverso y mayor repertorio de CTLs contra VIH-1. MATERIAL Y MÉTODOS. Los epítopos/péptidos CTL restringidos al haplotipo de ratón H2^d que se trabajaron fueron: 1) ¹⁹⁷AMQMLKETI²⁰⁵ (deriva de p24) 2) ³¹⁸RGPGRAFVTI³²⁷ (deriva del loop V3 gp120), denominados Gag y

L respectivamente. Las bibliotecas de variantes se obtuvieron modificando los epítomos de la siguiente manera (donde x representa cualquiera de los 20 aminoácidos): 1) Gag: AMXMLXXXI, AXQXLXETX (2 bibliotecas) 2) L: RGPGXAXXXX, XGXGXAXGXI (una biblioteca). La construcción de los inmunógenos fue mediante el uso de oligonucleótidos específicos que codifican para los epítomos y las variantes como se mencionó, además de oligonucleótidos de amplificación que introducen sitios de restricción para su clonación. La clonación de estos epítomos y bibliotecas se realizó tanto en ADN (vector VHEXpres) como en fago M13 recombinante fusionado a pVIII (fagemido p8GSAET). El ADN necesario para la inmunización fue obtenido por el método de lisis alcalina. Los fagos recombinantes fueron purificados de una doble precipitación con PEG/NaCl como se ha descrito anteriormente. La secuenciación manual fue realizada utilizando el kit "Sequenase version 2.0 Quick-Denature plasmid sequencing kit" y dATP a-S³⁵ de acuerdo a las instrucciones del fabricante, de 20 fagos recombinantes de cada biblioteca. Se inmunizaron ratones hembra Balb/c AnN de 4 a 6 semanas con los diferentes inmunógenos, administrando 75 µg de ADN intradermicamente y 1 x 10¹¹ UFC de fago recombinante por vía subcutánea e intraperitoneal cada 7 días. Los ratones inmunizados fueron sacrificados 5 días después de la última inmunización y los bazo extraídos para su perfusión obteniendo los esplenocitos para los ensayos de proliferación celular. Los cultivos se realizaron colocando 1 x 10⁴ células por pozo y 1 x 10¹⁰ UFC de los antígenos (aislados y secuenciados previamente) y se incubaron por 72 hrs a 37°C, 5% CO₂. La cosecha se realizó en membranas de fibra de vidrio y selladas con líquido de centelleo después de 16 hrs de añadido 0.5µCi de ³H-timidina por pozo. Se realizó la lectura de la incorporación de timidina en un lector betaplate presentando cuentas por minuto (cpm).

RESULTADOS. Se construyeron 6 bibliotecas en base de dos epítomos CTL, uno derivado del loop V3 de la proteína gp120 (antígeno L) y otro derivado de la proteína p24 Gag de VIH-1 (antígeno Gag). Las complejidades de las bibliotecas fueron desde las 9,000 hasta las 19,000 clonas y las secuencias de los antígenos secuenciados fueron diversas, ya que el 100% de los antígenos seleccionados al azar de cada biblioteca fueron diferentes en secuencia (n=20). En los ensayos de proliferación celular con los ERI tanto con bibliotecas de L como de Gag, se observó un reconocimiento amplio (70-88%) hacia variantes en comparación con los ERI con epítomo silvestre o vector como control. El reconocimiento fue específico hacia los antígenos que provienen de la biblioteca inmunizada, y no así con los de otra biblioteca. Se comprobó que la respuesta generada fue lo bastante amplia como para reconocer diversos antígenos (reactividad cruzada), al enfatizar que los antígenos que se reconocieron no estaban presentes en la biblioteca con la cual fueron inmunizados los ratones.

CONCLUSIÓN. Como se ha descrito anteriormente, una de las principales causas de que hasta hoy no exista una vacuna contra la infección por VIH es la variabilidad antigénica. En el presente trabajo presentamos resultados preliminares que nos demuestran que la utilización de bibliotecas en base de epítomos CTL pueden ser una herramienta novedosa e importante que permita evitar el escape inmune de patógenos que presentan variabilidad antigénica.

II.-ABSTRACT

GENIC IMMUNIZATION WITH HIV-1 VARIABLE EPITOPES

INTRODUCTION. At the moment 40 million people are infected with Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Last year 2006, 3 million of people have died from the Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). The generation of a broad immune response (humoral and cellular) during the acute phase of AIDS illness, is crucial to reduce the viral replication and progression toward AIDS. The importance of the immune cellular response has been proved by multiple findings *in vivo* and *in vitro*; 1) the presence of a broad and specific CD8+ T cell response (CTLs) has been associated with the reduction of viral load in long terminal non-progressors patients (LTNP) that maintained per years a very low viral numbers in contrast with patients that did not response, 2) in macaques has been observed that the depletion of CTLs cells drastically increase the viral load and the progression toward disease, 3) infected cellular lines in contact with CTL cells, isolated from infected patients, reduce the viral replication.

The viral escape via mutations is the main hypothesis to explain the lack of protective immune response in most of the infected patients. It is argued that the antigens of variable nature (VIH-1) determine the behavior of the immune system (IS), but the IS is in contact with new variants of the antigen, clones of B and T memory cells are stimulated preferredly, principally whose cell surface receptors recognize original sequences of the antigen or do not recognize the new variants. The described phenomena could inhibit the capacity of the immune system to combat the infection.

Is well known that epitopes presented in the context of the MHC-I molecules are generally own as foreign intracellular proteins and the groove of binding peptides of 8-11 amino acids. Each haplotype of MHC-I has preference for certain epitope aminoacids in positions 1,2 and 8,9 called anchored aminoacids. It has been reported that a change in one of these amino acids, restricted to certain MHC-I, could not be bind to this specific haplotype, or could be bind to another one. Many studies have demonstrated that modifications in the anchored amino acids for a certain CTL-epitope increase the affinity peptide/MHC and could be raise its immunogenicity

A new strategy to develop a successful vaccine could be obtained through the construction of immunogens capable to induce a broad immune cellular response that recognizes the variants of CTL-epitopes additionally the immunogen could be presented to different haplotypes. This could be obtained using library variants for CTL-epitope, the variations are founds in the anchorage positions and in the center of epitope. The development of this new vaccine concept will allow us to attack the main and strong obstacles in the development of an efficient vaccine against VIH-1 virus, as well as to other pathogens with high levels of antigenic variability. **OBJECTIVE.** Construction of immunogens with the characteristics to induce a broad and diverse repertoire of CTLs cells against VIH-1. **MATERIAL AND METHODS.** CTL-epitopes/peptides restricted to mouse haplotype H2^d were: 1) ¹⁹⁷AMQMLKETI²⁰⁵ (it derives from p24), 2) ³¹⁸RGPGRAFVTI³²⁷ (it derives from V3 loop gp120), called Gag and L respectively. The library variants were obtained modifying the mentioned epitopes (where x represents anyone of the 20 amino acids): 1) Gag: AMXMLXXXI, AXQXLXETX (2 libraries were

generated) 2) L: , XGXXGXGXGXI. (only one library was generated). The construction of immunogens were done using specific oligonucleotides that codifies for the epitopes and the variants mentioned, additionally we used oligonucleotides for amplification and introduction of specific cloning restriction sites.

Gag, L epitopes and libraries was cloned in VHEXpress vector (DNA) and in the p8GSAET phagemid (fused to pVIII of phage M13). The necessary amount of DNA for the immunization it was obtained by the method of alkaline lysis. The recombinant phages were purified with a double PEG/NaCl (20% w/v) precipitation as described previously. Manual sequencing was made for 20 recombinant phages of each library using kit "Sequenase version 2.0 Quick-Denature sequencing kit" (Amersham Life Science) and dATP α - 35 S according to the instructions of the manufacturer. Female mice Balb/c AnN (4 to 6 weeks old) were immunized with different immunogens, each mice received 75 μ g of DNA dose by intrademic route, and 1×10^{11} UFC of recombinant phages by subcutaneous and intraperitoneal route every 7 days respectively. The immunized mice were sacrificed 5 days after the last immunization and the spleen extracted for its perfusion obtaining the splenocytes for the cellular proliferation assay. Cultures were made placing 1×10^4 cells each well and 1×10^{10} UFC of antigens (isolated and sequencing previously), the mix were incubated 72 hrs at 37°C and 5% CO₂. After that we added 0.5 μ Ci of 3 H-thymidine by well, after 16 hours the cells were harvest and put in sealed fiber glass membranes with scintillation fluid. The incorporation of thymidine was measure in a reader betaplate (accounts per minute, cpm).

RESULTS. We generated six libraries in the context of two CTL-epitopes, one derives from p24 (Gag antigen) and the other one derives from V3 loop gp120 (L antigen) in the form of plasmidic libraries as well as recombinant phages libraries. We obtained a very complex library (9000 to 19000 clones) in terms of composition. The antigen sequences were diverse, since 100% of the sequenced antigens were different in sequence (n=20). In the cellular proliferation assay made with splenocytes obtained from immunized mice with libraries (L or Gag). We observed a broad recognition (70-88%) of the variants, in contrast no recognition was observed in the cellular proliferation assay made with the splenocytes obtained from immunized mice with nominal epitope or negative control. with the splenocytes of immunized mice with nominal epitope or control. In this work we proved that is possible to induce a broad immune response that recognize several antigens. **CONCLUSION.** Since it has been described previously, one of the main causes of which until today does not exist a vaccine against the viral infection cause by VIH virus is the antigenic variability. In the present work we presented preliminary results that demonstrate that the use of CTL-epitope libraries could be used as an extraordinary tool to avoid the immune escape of pathogens that show antigenic variability.

III.- INTRODUCCIÓN

Existen actualmente 40 millones de personas infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1), y en este año han muerto más de 3 millones a causa de la enfermedad provocada por este agente etiológico: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)¹. Después de veinte años del descubrimiento del VIH-1, a pesar de los avances sin precedentes y la rápida generación de datos en el campo de la investigación, aún no existe una vacuna.

3.1 Virus de la inmunodeficiencia Humana

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana es miembro de la familia *Retroviridae*, del género *Lentivirus*. Según la homología de su secuencia el VIH ha sido clasificado en dos tipos; el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2 (VIH-2). En 1983 (Montagnier/Gallo) el VIH-1 fue identificado como el agente causal del SIDA. El primer caso de SIDA se reportó en 1981 en un paciente homosexual que presentaba infecciones oportunistas recurrentes. Se encontró que este virus podía infectar selectivamente y destruir linfocitos T CD4+; de ahí los síntomas de inmunodeficiencia que la enfermedad causaba. Desde la descripción del SIDA y el descubrimiento de que el VIH-1 era el agente causal de dicha patología, se ha buscado el origen de este virus, se ha estudiado extensamente la interacción del virus con el sistema inmune, la progresión de la infección a la enfermedad, mecanismos de defensa del sistema inmune así como mecanismos de evasión del sistema inmune por el virus. Todo esto con el objetivo de encontrar una vacuna eficaz que termine con la pandemia actual.

Un virus indistinguible del VIH-1 fue aislado de una subespecie de chimpancés *Pan troglodytes troglodytes*, por lo que se cree que la pandemia de SIDA resultó de la transmisión del virus de chimpancés hacia los humanos en el este ecuatorial de África. Se cree que este virus ha estado presente en los chimpancés desde hace poco más de 300 000 años sin causarles enfermedad. No fue sino hasta la introducción en un nuevo huésped

(humanos) que el virus comenzó a ser patógeno. No se sabe con exactitud cuando fue que esta transmisión ocurrió. En estudios retrospectivos con sueros congelados, se ha encontrado la presencia del VIH-1 en pacientes desde 1959. Por estudios computacionales en cambios evolucionarios del virus, se sugiere que los VIHs actuales derivaron de un ancestro común que data de entre 1915 y 1941, posiblemente cuando se dio la transmisión primate-humano⁽²⁾. El gran crecimiento de esta zoonosis hacia la pandemia actual quizá fue facilitada por la coincidencia de varios factores como la urbanización en África, viajes internacionales, uso de drogas intravenosas etc.

3.1.1 Subtipos del VIH-1

El VIH-1 ha sido clasificado en tres tipos o grupos; el grupo principal “M”, grupo “O”(outliers) y el grupo nuevo (descrito en Cameron en 1998) “N”. Dentro del grupo M se han descrito subtipos; A, B, C, D, F, G, H, J, K y formas recombinantes de éstos A/E, A/B, A/G/I; también llamados Formas Recombinantes Circulantes (CRFs). Cada uno de estos subtipos generalmente difieren 30% en su composición de aminoácidos del gen env y un 15% en los aminoácidos del gen gag (Fig 1).

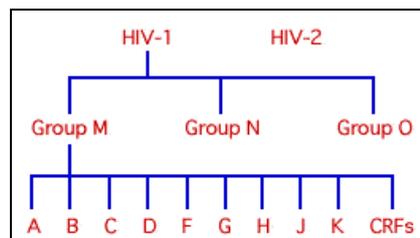


Fig. 1 Tipos y Subtipos de VIH

El grupo B es el más ampliamente distribuido, se ha encontrado en Europa, América, Japón y Australia. El grupo A se concentra en el oeste y centro de África. Se ha encontrado el grupo C en el Sur y oriente de África, India y Nepal. El grupo D está distribuido en el este y centro de África, mientras que el grupo F se ha encontrado solo en el centro de África y el Sur de América. El grupo K únicamente se ha descrito en la República Democrática del Congo y en Camerún. El grupo CRF A/E se ha encontrado en el sur, centro y este de África (Fig 2)^(2,3,4,5). Como se puede apreciar la mayoría de estos subtipos del virus se han descrito en el centro de África, lo que refuerza la idea de que el origen del VIH fue en este lugar.

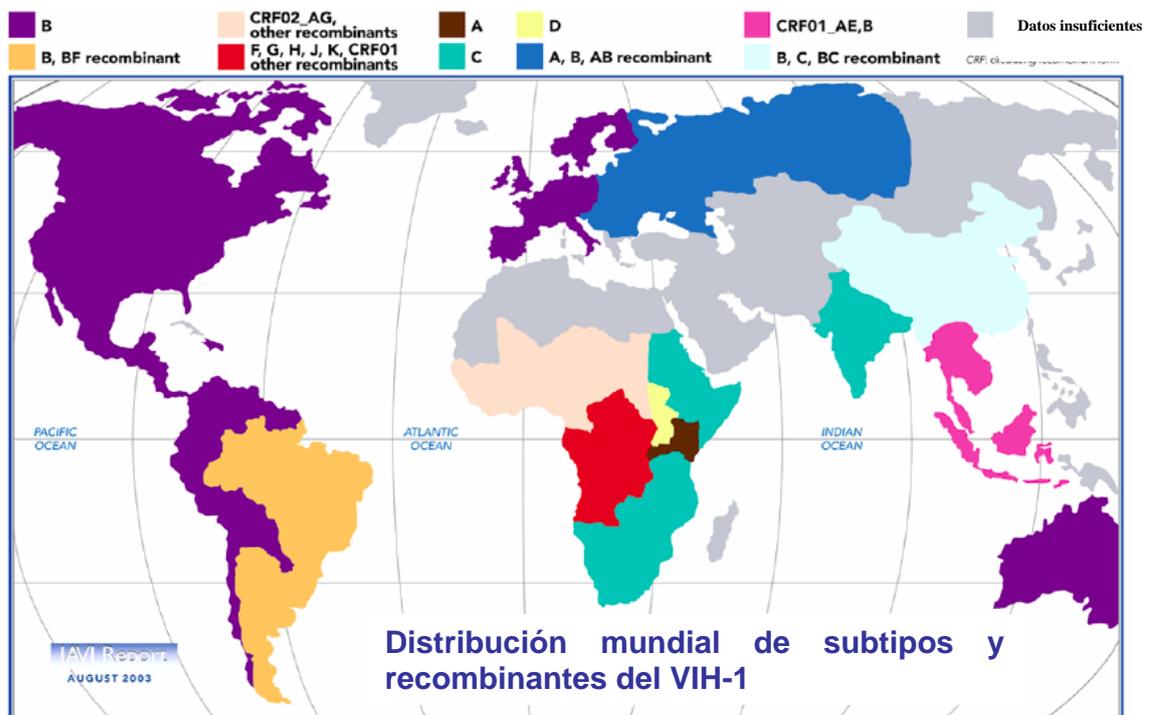


Fig. 2 Distribución mundial del VIH-1.

Toma de: IAVA Report 2003 (International AIDS Vaccine Initiative)

3.1.2 Genoma y Estructura

El VIH-1 tiene una forma icosaédrica de 100-120 nm de diámetro. La envoltura es una bicapa lipídica derivada de la célula huésped además de las glicoproteínas gp120 y gp41 unidas no covalentemente (trímero gp120- trímero gp41) formando alrededor de 72 espículas en toda la superficie. Ésta recubre la estructura del virión, el cual posee una matriz celular formada por la proteína p17. Esta matriz rodea la cápside, formada por la proteína p24. La cápside rodea el material genético del virus (2 copias idénticas de cadena sencilla-positiva de ARN genómico), que está cubierto por la proteína p7. Dentro de la cápside también se encuentran enzimas necesarias para la replicación viral (proteasa, integrasa y transcriptasa), y algunos factores celulares (Fig 3)⁽⁶⁾.

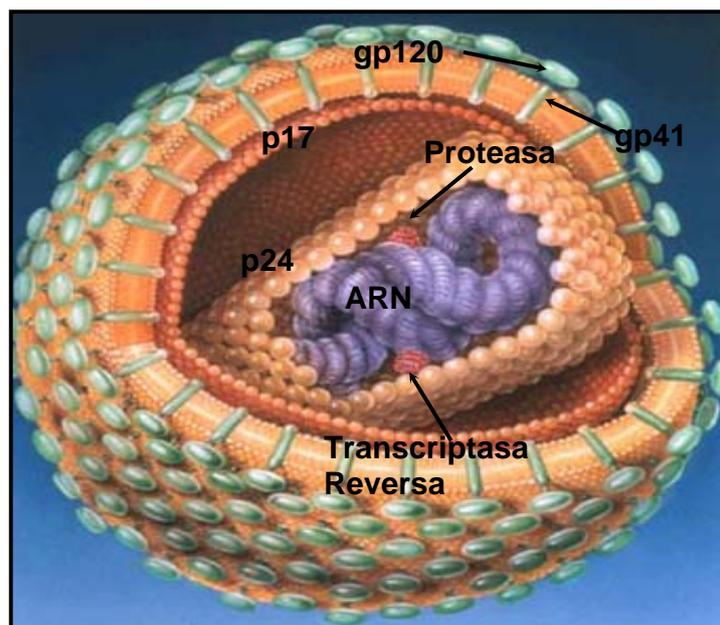


Fig. 3 Estructura del VIH-1.

Tomada de: Photo library /Medical Art Service, Munich.

Como la mayoría de los retrovirus, el ARN del VIH-1 (de 9.2 Kb) codifica para tres genes principales; 5'-gag-pol-env-3', cada uno de los cuales genera un precursor proteínico que es procesado por proteasas propias o del huésped hacia subunidades funcionales. El genoma del virus posee en los extremos 5' y 3' secuencias repetitivas largas (long terminal repeat, LTR) donde se encuentra el promotor de la transcripción

(Fig 4). El VIH-1 emplea una variedad de mecanismos para expresar varias proteínas a partir de un solo transcrito de ARN, uno de ellos es la regulación del splicing del transcrito primario en más de 30 especies diferentes de ARNm. La transcripción es iniciada por un promotor localizado en la region LTR⁽⁷⁾.

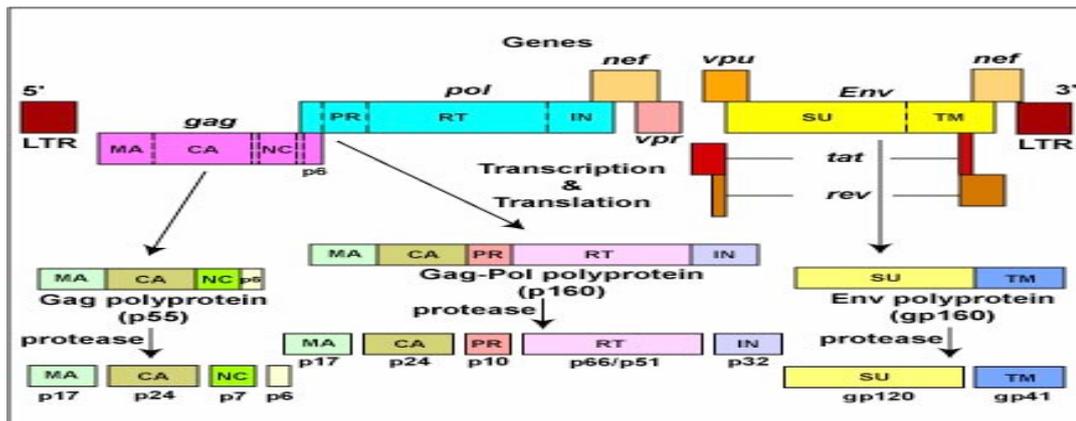


Fig. 4 Genoma del VIH-1

Tomada de: Microbiology course on-line / Collage of Baltimore, Dr. Kaiser.

Durante la traducción del gen *gag* ocurre un evento de cambio de marco de lectura que resulta en un poliproteína precursora larga Pr160^{Gag-Pol}, la cual por medio de la proteasa viral es procesada en el precursor proteínico del gen *gag*, Pr55^{gag} y en las proteínas funcionales del gen *pol*; transcriptasa reversa (RT/RNAsa H p66 RT p51), proteasa (PT p10) e integrasa (IN p32). El precursor del gen *gag* Pr55^{gag} sigue siendo procesado por la PT y da lugar a las proteínas funcionales de la cápside p24 (CA), núcleocapside p7(NC) y matriz celular p17(MA) y la proteína p6. Las proteínas de la envoltura son también sintetizadas a partir de un precursor codificado por el gen *env* llamado precursor gp160, pero éste a diferencia del precursor de Gag-Pol, es procesado por una proteasa celular durante el tráfico hacia la membrana celular. El procesamiento de gp160 da lugar a la glicoproteína de superficie gp120 (SU) y la glicoproteína de transmembrana gp41 (TM). Además de los productos de los genes *gag*, *pol* y *env*, se producen 6 proteínas adicionales conocidas como proteínas reguladoras (Tat y Rev) y proteínas accesorias (Nef, Vpu, Vif, Vpr), las cuales tienen funciones importantes durante las etapas tempranas del ciclo vital viral y son esenciales para una replicación eficiente del virus⁽⁸⁾.

3.1.3 Proteínas virales

Como se mencionó , el VIH-1 produce proteínas estructurales (MA, CA, NC, p6, SU, TM, PR, RT e IN), reguladoras (Tat y Rev), y accesorias (Nef, Vif, Vpu y Vpr). Cada una de ellas tiene una función específica y es indispensable en ciertas etapas del ciclo vital viral.

Proteína de la Matriz celular MA

Estructuralmente esta proteína se encuentra formando una capa de 7 nm justo por debajo de la envoltura viral. Se conocen algunas funciones de esta proteína durante el ciclo viral como lo es el señalamiento de los precursores poliproteínicos Gag y Gag-Pol hacia la membrana plasmática antes del ensamblaje viral debido a que es uno de los componentes N-terminal del Pr55^{gag}. También se ha encontrado una relación con la infectividad del VIH-1 en células que no se dividen, principalmente macrófagos, aunque este rol sigue siendo controversial⁽⁹⁾.

Antígeno de la Cápside CA

Esta proteína se encuentra formando el core o centro de la partícula viral que protege el material genético viral, una capa de 5nm compuesta por alrededor de 2000 moléculas por virión. Se ha relacionado esta proteína con funciones en el ensamblaje de la partícula viral, además de tener un papel importante en la infectividad viral en asociación con una chaperona celular, la ciclofilina A⁽¹⁰⁾.

Proteína de la Núcleo Cápside NC

El material genético del virus se encuentra recubierto por esta proteína dentro del *core*, protegiéndolo de nucleasas. Su función principal dentro del ciclo viral es reconocer

señales específicas de empaquetamiento y liberar RNAs virales completos dentro del virión ensamblado^(9,10).

Proteína Seis p6

La proteína 6 comprende la porción C-terminal del Pr55^{gag} y es un importante mediador en la interacción entre p55 y Vpr para la incorporación de Vpr dentro del virión que está siendo ensamblado^(9,10).

Glicoproteína de Superficie SU

Se encuentra localizada en la membrana celular formando espículas con la glicoproteína de transmembrana. Su función principal radica en la interacción con receptores específicos de la célula hospedero al momento de iniciarse la entrada del virus. El principal de estos receptores en la célula hospedero es una proteína tipo inmunoglobulina, CD4, la cuál es expresada en la superficie de células T cooperadoras y macrófagos. Esta interacción CD4/SU no es suficiente para la entrada del VIH-1, además es necesaria la interacción con un coreceptor, el cuál puede ser un miembro del grupo de receptores de quimiocina. Según el tipo de coreceptor que el VIH-1 utilice, debido a que son específicos de cierta población celular, el virus se ha clasificado en dos grupos: los virus macrofagotrópicos y los linfotrópicos (tropismo por células T). El principal coreceptor para los macrofagotrópicos es el CXCR4 y para los linfotrópicos es el CCR5⁽¹¹⁾.

Glicoproteína de transmembrana TM

Esta glicoproteína transmembranal se encuentra formando espículas en unión no covalente con SU. Su función principal es mediar la fusión entre la membrana viral y la celular después de la interacción con los receptores celulares. TM contienen un dominio de fusión (sitio altamente hidrofóbico) en su porción N-terminal. Existe un segundo sitio

hidrofóbico en medio de la proteína, el cual le sirve para anclarse a la bicapa lipídica de la envoltura viral⁽¹²⁾.

Transcriptasa Reversa RT

La transcriptasa reversa es una DNA polimerasa que utiliza como templado ya sea una cadena de ARN o de ADN. Esta enzima es la responsable de convertir el genoma viral de ARN a ADN para su posterior integración en el genoma de la célula infectada. La enzima es un heterodímero formado por un monómero completo de 66 kDa, el cual contiene el dominio RNasa H y un monómero de 51 kDa, solo RT, ya que el dominio RNasa H ha sido cortado. Se explicará más adelante cómo es que actúa en el proceso de generación de la doble cadena de ADN⁽⁹⁾.

Integrasa IN

La integrasa es una enzima producida por el virus que le permite integrar su material genético al de la célula hospedera que infectó. Es una proteína de 32 kDa producida de la porción C-terminal del producto del gen Pol. Contiene tres dominios; uno de unión a zinc (N-terminal), un dominio catalítico central y un dominio de unión a ADN (C-terminal). Debido a que esta proteína es esencial para la integración del genoma viral, es blanco de muchos antivirales. Uno de estos antivirales denominado K-0518 (laboratorios Merck) se encuentra en fase 2 de estudio por su potente actividad antiviral⁽⁹⁾.

Proteasa PT

La proteasa es una enzima necesaria para la fragmentación proteolítica de los precursores poliproteínicos virales para generar proteínas funcionales. Esta enzima es un homodímero (cada monómero de 99 aminoácidos e idéntico en conformación). La proteasa del VIH-1 es una aspartil proteasa codificada por la porción amino terminal del gen pol⁽¹³⁾.

Proteína Tat “transactivador de la transcripción“

Esta pequeña proteína de 86 aa estimula la formación de transcritos integrales del promotor del VIH-1 promoviendo una elongación eficiente de la transcripción. Induce la elongación de la transcripción reclutando co activadores transcripcionales como el Factor positivo de la elongación b (P-TEFb), ARN polimerasa II c-terminal cinasa e histonas-acetil transferasas. Además de esta función en la transcripción, se ha encontrado que puede contribuir a la patogénesis viral regulando la señal de transducción en células endoteliales, funcionando como un factor de crecimiento para sarcoma de kaposi y células endoteliales e induciendo apoptosis en células T ligándose a microtúbulos y desencadenando despolimerización de tubulina^(14,15).

Proteína Rev “regulador de la expresión de proteínas virales“

La proteína rev consiste de 116 aminoácidos y posee dos secuencias importantes para su función tales como la secuencia de localización nuclear (NLS) y la secuencia de exportación nuclear (NES). Su principal función es regular la expresión de las proteínas virales controlando el grado transporte de ARNm fuera del núcleo. Los ARNm primarios del VIH-1 son producidos ya sea sin splicing, por uno o dos splicings. Las proteínas producto del ARNm con doble splicing son sintetizados primero en el citoplasma debido a que este ARNm es más pequeño y es transportado más rápido fuera del núcleo; rev es un producto de este ARNm con doble splicing. Sin la presencia de la proteína rev, el transporte de los ARNm fuera del núcleo es muy lento. La secuencia NLS de la proteína rev puede ligarse al elemento respuesta de rev (RRE) presente en la secuencia de los ARNm primarios facilitando y agilizando así su transporte fuera del núcleo⁽¹⁶⁾.

Proteína Nef “factor negativo“

Originalmente esta proteína fue llamada como factor negativo debido a que en estudios *in vivo* se encontro que virus deficientes de nef replicaban ligeramente más rapido que los virus silvestres en líneas celulares CD4+, ademas de que se mostró que nef

podría regular negativamente la actividad del promotor. Aún así estos hallazgos fueron refutados tiempo más tarde por otros grupos. En la mayoría de los casos nef no tiene un efecto negativo en la replicación viral *in vitro* y tampoco inhibe la transcripción de LTR *in vivo*. Actualmente se sabe que la expresión de la proteína tat tiene un efecto positivo en la infección y replicación viral evitando la muerte de las células infectadas. Esto lo hace mediante la habilidad que posee para regular de manera negativa los niveles de expresión en la superficie celular de moléculas importantes en la sinapsis inmunológica (CMH I y CMH II en CPA; CD4 y CD8 en células Th)⁽¹⁷⁾.

Proteína Vif “factor de infectividad viral“

La función de las proteínas accesorias aún no es bien conocida aunque se sabe que la función de vif es actuar en etapas tardías del ciclo viral, como en el ensamblaje viral o en la liberación del virión, potenciando la infectividad de los viriones de 10 a 100 veces más. Se han realizado estudios en macacos infectados con SIV que poseen deleciones en el gen Vif y se ha encontrado que disminuye dramáticamente la replicación viral, por lo que se cree que Vif es requerida para la replicación viral *in vivo*.

Se ha encontrado una discrepancia en diferentes líneas celulares en la cual en algunas líneas celulares el virus precisa de vif para infectar y en otras la ausencia de vif impide la infección. Respecto a lo anterior, recientemente se ha encontrado una relación entre vif y una proteína celular llamada APOBEC3G, cuya función no se conoce bien, pero tal parece que es una proteína “protectora“ la cuál actúa alterando el genoma del virus de manera letal. La proteína Vif de alguna manera lleva a esta proteína a la vía del proteasoma para su degradación^(18,19).

Proteína Vpu “Proteína viral U“

Se ha encontrado que al igual que nef, la proteína Vpu es necesaria para la replicación del VIH-1 en cultivos celulares. Una de las funciones de Vpu involucra la regulación negativa de la expresión de la molécula CD4, Vpu interactúa con esta molécula en el retículo endoplásmico rugoso y provoca la retranslocación a través del

REr y la degradación posterior por vía del proteasoma. Vpu ha mostrado potenciar la liberación del virión de células infectadas por mecanismos aún desconocidos^(20,21).

Proteína Vpr “Proteína viral R“

Esta proteína realiza múltiples actividades, las cuales incluye la regulación negativa de CD4 en la superficie, el transporte nuclear del complejo de pre-integración viral (PIC) en los pasos muy tempranos del ciclo de infección, la inducción de permanecer en fase G en células T proliferativas y en la modulación de la apoptosis inducida por VIH-1. Recientemente se ha descrito una función para Vpr, implicando a esta proteína como un componente crítico en la expresión de ADN no integrado de VIH-1, lo cual puede significar un papel importante en la patogénesis viral⁽²²⁾.

3.1.4 Ciclo Viral

El ciclo de replicación del VIH consiste en siete pasos principales: entrada, síntesis de ADN, integración, transcripción, procesamiento de ARN y transporte, síntesis de proteínas y ensamblaje (Fig 5) ⁽²³⁾.

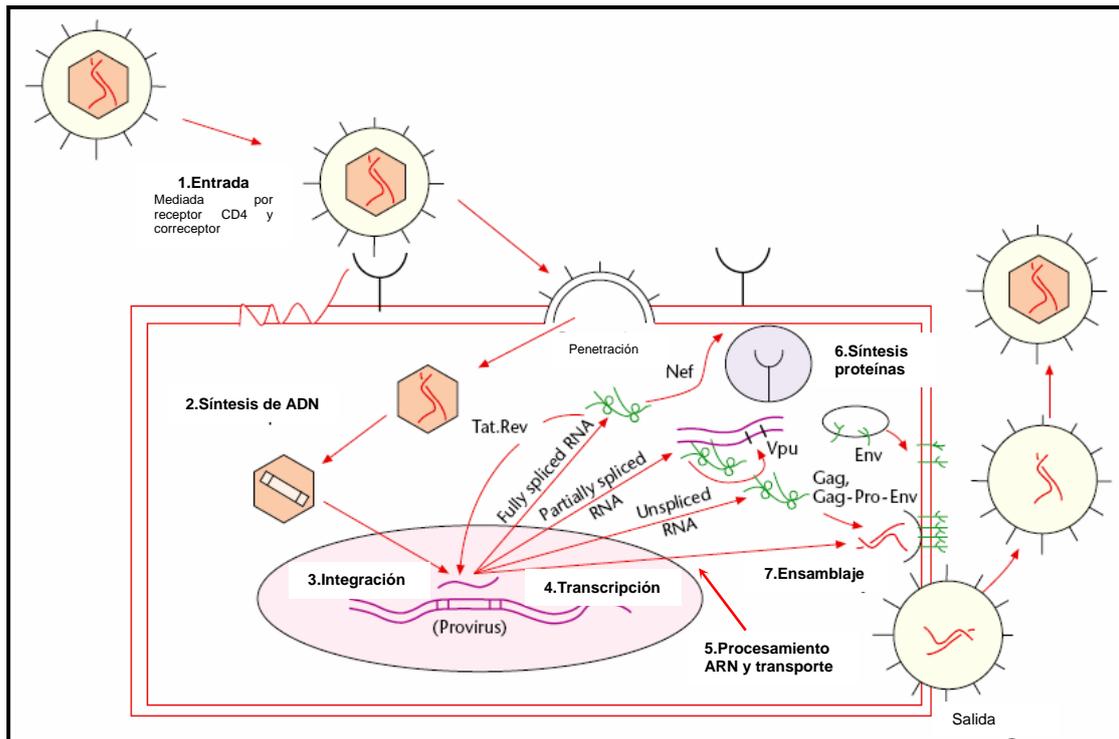


Fig. 5 Ciclo viral del VIH-1. Se muestran los 7 pasos principales: entrada, síntesis de ADN, integración, transcripción, procesamiento de ARN y transporte, síntesis de proteínas y ensamblaje.

Tomada de : Crandall K, 2001. Enciclopedia of Life Sciences. Nature Publishing group.

Entrada

La entrada del virus a la célula hospedera es el primer paso del ciclo de replicación viral, el cual consiste de una serie de pasos que culminan en la fusión de las membranas viral y celular. Generalmente el virus utiliza la fusión mediada por receptores de la membrana celular para entrar, sin embargo se ha visto que también puede entrar por una vía alternativa de endocitosis que hasta donde se sabe termina casi por lo general en inactivación o degradación en lisosomas. Como ya se había mencionado las proteínas de la envoltura, gp120 y gp41 tienen un papel muy importante en este paso del ciclo viral.

En 1984 se identificó el receptor principal para la entrada del virus, la molécula CD4 presente en células T y macrófagos, la cual es reconocida por gp120. Aún así, se han encontrado otros receptores por medio de los cuales el VIH-1 puede infectar, entre los cuales están la galactosilceramida en células de Schwann y oligodendrocitos, además de los receptores Fc de inmunoglobulinas en neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, plaquetas y linfocitos B. Los principales coreceptores como ya se había mencionado son CXCR4 para virus macrofagotrópicos y CCR5 para virus cel-T trópicos. Inicialmente existe un reconocimiento y unión específica entre CD4 y gp120, esto causa cambios conformacionales en gp120, el cual expone sitios de reconocimiento para el coreceptor y es entonces cuando se lleva a cabo la unión. Después de esta unión, existe una fusión entre las membranas viral y celular que permiten la entrada del core viral^(23,24).

Síntesis de ADN

Una de las características del VIH-1 es su habilidad para convertir su genoma ARN en ADN de doble cadena después de la infección. Esta reacción denominada retrotranscripción es llevada a cabo por la acción de sus enzimas RT y RNasa H. Para la síntesis de ADN de doble cadena son necesarios varios pasos que se describen abajo.

- La síntesis inicia con un RNAt celular específico de lisina que hibrida con la región complementaria en la secuencia del ARN del virus, la región llamada sitio de reconocimiento del cebador (PBS). Este RNAt es utilizado por la RT como cebador para poder iniciar la polimerización. Se inicia la polimerización hacia 5' formando un híbrido ADN/ARN.
- La porción de ARN de este híbrido es degradado por la acción de la RNasa H, generando el fragmento denominado cadena ADN negativa de paro (minus-strand strong DNA).
- Mediante el uso de pequeñas regiones de homología llamadas regiones R, esta cadena negativa de ADN "salta" de la región 5' a la región 3' del genoma. A esto se le conoce como transferencia de la primera cadena.

- La cadena negativa de ADN empieza a sintetizarse usando el extremo 3' de la cadena negativa de paro como cebador. La RNasa H degrada el ARN recién copiado, dejando solo un fragmento denominado tracto-purinas.
- La segunda cadena es sintetizada utilizando como cebador al fragmento tracto-purinas que se formó por acción de la RNasa H.
- El ARNt ligado al sitio PBS y el ARN tracto-purinas es removido por la RNasa H, permitiendo la transferencia de la segunda cadena.
- El ADN se circulariza, ya que los dos extremos del ADN son complementarios, formándose una asa de ADN.
- La RT finalmente termina completando la porción terminal repetida de cada extremo. En este último proceso el asa de ADN se rompe dejando una cadena doble de ADN con una porción terminal repetida en cada extremo^(23,24).

Integración

El proceso de integración es un paso esencial en el ciclo viral del VIH-1 debido a que la integración del ADN viral dentro del genoma celular le permite a éste tener acceso a la maquinaria celular para la expresión de sus genes. Este evento asegura que la célula y sus generaciones posteriores tendrán los genes virales, debido a que el ADN del virus es replicado como parte del genoma completo de la célula así como transmitido genéticamente. Este proceso permite el establecimiento de la infección crónica.

Inmediatamente después de generada la doble cadena de ADN viral, éste es asociado a 50 -100 moléculas de IN formando el llamado Complejo de pre-integración (PIC). La IN comienza con un proceso denominado procesamiento 3', que consiste en la remoción de 2 nucleótidos (GT) de cada extremo 3'OH del ADN viral. El PIC es transportado hacia el núcleo a través de los poros nucleares donde pierde compactación, y es aquí donde se lleva a cabo el "ensamblaje" del ADN proviral al ADN celular. Para esto, la IN realiza un corte cohesivo en el ADN celular donde es ligado a los extremos 3' del ADN viral procesado. Esta reacción es conocida como "transferencia de la cadena". Los extremos 3' del ADN celular permanecen sin ser ligados (2 nucleótidos), la integración es finalizada cuando enzimas reparadoras de la célula remueven estos

nucleótidos desapareados en los extremos 5' del ADN viral y se reparan los huecos entre el ADN viral integrado y el ADN celular^(25,26).

Transcripción, Procesamiento de RNA y Transporte

Después de la integración, el provirus puede permanecer inactivo durante años o iniciar la transcripción. El LTR funciona como sitio de iniciación de la transcripción y de reconocimiento para los elementos cis requeridos para la síntesis de RNA. La región U3 de LTR contiene elementos que dirigen el reconocimiento y la unión de la RNA polimerasa II al ADN proviral. Aun así la actividad basal transcripcional de LTR es muy baja, la cual es incrementada hasta 100 veces más cuando está presente la proteína Tat. Como se había mencionado, la transcripción genera una gran cantidad de RNAm (se han descrito más de 30 diferentes). Estos son clasificados en : 1) sin splicing, del cual se generan las proteínas precursoras Gag y Gag-Pol y son los RNA que son empacados en el ensamblaje viral, 2) con splicing parcial , del cual se generan las proteínas Env, Vif, Vpu y Vpr, 3) con múltiples splicing, (llamados RNA cortos) de los cuales se generan las proteínas Rev, Tat y Nef. La exportación fuera del núcleo se lleva a cabo , como ya se mencionó, gracias a la proteína Rev^(23,24).

Ensamblaje viral

Una vez que todas las proteínas son sintetizadas, se inicia el ensamblaje viral para la formación y salida de nuevas partículas virales. En este proceso de ensamblaje , la proteína Gag tiene una función sumamente importante, está implicada en el reclutamiento de las proteínas virales Pol y Env y algunas proteínas celulares involucradas en los procesos de ensamblaje y liberación de partículas virales. La proteína Gag también interactúa con el ARN geonómico formando complejos intermedios de ensamblaje y los transporta a la membrana celular para la encapsidación de partículas virales, muy probablemente a través de la interacción con el cito esqueleto de las células infectadas^(27,28).

3.1.5 Epidemiología

Según el reporte 2005 publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen actualmente 40.3 millones de personas infectadas con VIH-1, un total de 4.9 millones de nuevas infecciones y 3.1 millones de muertes a causa de SIDA⁽¹⁾. En México la Secretaría de Salud reportó para noviembre del 2005 un total de 98,933 casos acumulados de SIDA, siendo el Distrito Federal, Estado de México y Veracruz los estados más afectados⁽²⁹⁾.

El principal modo de transmisión del VIH-1 sigue siendo a través de contacto sexual y sanguíneo por el uso de drogas intravenosas, y en menor proporción la transfusión sanguínea o transmisión madre-hijo. Actualmente la proporción de individuos heterosexuales infectados es el mismo que en individuos homosexuales⁽³⁰⁾.

3.1.6 Patogénesis

Desde el momento de la infección por VIH-1 hasta las manifestaciones clínicas de la enfermedad del SIDA existe usualmente un período de 8 a 10 años (10% de los pacientes infectados progresan a SIDA en 2 o 3 años).

La infección por VIH-1 y la subsecuente progresión a SIDA es caracterizada por tres etapas. La primera **etapa de infección primaria** (infección aguda, síndrome agudo retroviral), es el período inmediatamente después de la infección, el cual puede ser clínicamente asintomático o tener síntomas parecidos a la influenza. Existen altos niveles de partículas virales en plasma (4-11 días después de la infección) y las células CD4+ empiezan a disminuir.

Existe una respuesta inmune inmediata que genera la disminución de las partículas virales en plasma y el aumento de los CD4+. Esta etapa es caracterizada por una seronegatividad durante la cual una persona infectada puede no dar positivo a pruebas de Western Blot o ELISA aunque existan altos niveles del virus o síntomas, esto puede durar hasta 6 meses antes de la seroconversión.

Como resultado de la fuerte respuesta inmune el nivel de virus en el plasma es controlado, el paciente entra en la siguiente **etapa de latencia clínica**. En esta etapa existe una continua replicación viral y escape de la respuesta inmune. Aunque existe un título disminuído de partículas virales en plasma , éste puede ser detectado.

Se ha visto clínicamente que el período de latencia puede ser de más de 10 años cuando se presentan títulos < 1000 copias/mL, y puede disminuir si existen títulos > 100,000 copias/mL

Gradualmente y por la continua depleción de células CD4+, se presenta un deterioro del sistema inmune. Cuando las células CD4+ caen por debajo de 200/ μ l , los títulos del virus aumentan rápidamente y la actividad inmune es suprimida, es entonces cuando se presenta la **etapa clínica del SIDA**, la cual es caracterizada por la presencia de infecciones oportunistas (*Pneumocystis carinii*, *histoplasmosis* , *Mycobacterium tuberculosis*, *Coccidioidomycosis*, *toxoplasmosis* etc) debido al mal estado del sistema inmune^(8,31,32).

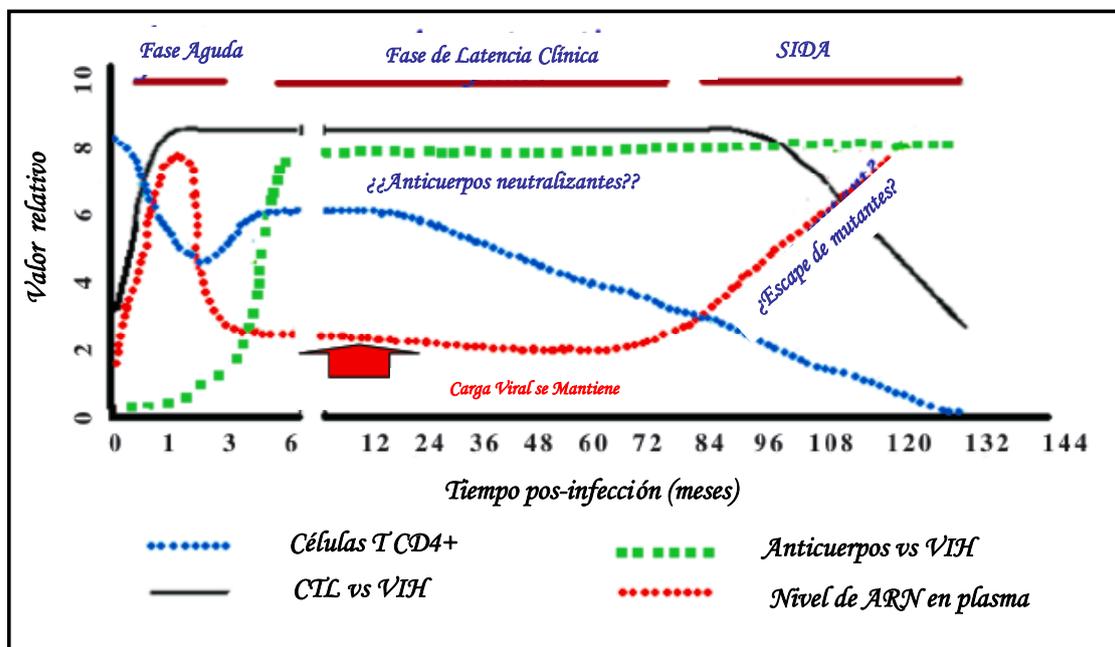


Fig. 6 Respuesta inmune generada en las tres etapas de la infección por VIH-1

Tomada de: Armes P, 2005, Indian J Med Res, 121:241.

3.1.7 Respuesta inmune contra la infección

La generación de una respuesta inmune amplia en la fase aguda de la infección es crucial en el establecimiento de la infección y progresión de la enfermedad. Se ha comprobado que la depleción de células CD4 por el virus en los primeros días de la infección es lo que disminuye potencialmente la generación de una respuesta inmune amplia y efectiva a lo largo de la infección.^(31,32,33,34,35)

Existe una amplia generación de anticuerpos a los 3 o 6 meses de la infección, sin embargo la mayoría de estos anticuerpos no son neutralizantes. La razón por la cual no se pueden generar anticuerpos neutralizantes es debido principalmente a la amplia variabilidad antigénica generada por la alta tasa de mutación del virus; que está dada por la baja fidelidad de su enzima retrotranscriptasa (10^{-5}), la frecuente recombinación que existe entre los diferentes subtipos y el enmascaramiento de las regiones epitópicas principales (gp120, gp41) por la glicosilación y oligomerización de las proteínas de la envoltura⁽³⁵⁾. A la fecha han sido identificados algunos anticuerpos neutralizantes que interactúan con gp120 y gp41, los cuales se investigan en ensayos de inmunización pasiva.⁽³⁷⁾

Actualmente se cree que una vacuna podría ser eficiente si es capaz de inducir respuestas inmunes fuertes, amplias y duraderas por parte de las células B y T^(33,38). Sin embargo hay evidencia que afirma que los individuos expuestos en varias ocasiones a VIH-1 pueden adquirir resistencia a la infección a través de la inducción de las células T citotóxicas CTL CD8+, de los linfocitos T cooperadores CD4+(Th) y de las actividades supresoras de la célula T^(33,38,39,40).

Existe evidencia de la correlación entre la contención viral y el aumento de CTLs específicos en la fase aguda de la infección.⁽⁴¹⁾ La implicación de los efectos de los CTL en el control de la infección ha sido aceptada por múltiples hallazgos encontrados en experimentos *in vivo*. Uno de ellos es la presencia de una amplia respuesta CTL específica, asociada a la disminución en la carga viral que se mantiene por años en

pacientes progresores lentos (LTNP del inglés Long Terminal Non-Progresors) en comparación con los que no lo son⁽⁴²⁾. Experimentos en animales han mostrado que la depleción de CTL aumenta drásticamente la carga viral y la progresión a la enfermedad.⁽⁴³⁾ También se ha reportado la inhibición en la replicación viral en líneas celulares infectadas al ponerlas en contacto con CTL aislados de pacientes infectados.⁽⁴⁴⁾ Esto indica que la respuesta inmune celular puede desempeñar un papel importante en la contención viral y progresión a SIDA.

A pesar de todas estas evidencias para entender la importancia de la respuesta inmune celular protectora, es claro que la mayoría de las personas infectadas no generan esta respuesta deseada. Se han propuesto algunos mecanismos para explicar la falta de CTL, pero la hipótesis principal es el escape a través de mutaciones en los epítomos virales. Respecto a esto se ha encontrado evidencia de que la fuerte respuesta inmunológica de los CTL que se produce en el inicio de la infección contra un epítomo viral, induce mutaciones en este, las cuales en etapas tempranas y tardías de la infección escapan al ataque inmunológico.^(45,46,47)

Se argumenta que los antígenos de naturaleza variable como es el caso de HIV-1 predeterminan el comportamiento del sistema inmune, de manera que al ponerse en contacto con nuevas variantes del antígeno, se estimulan preferentemente aquellas clonas de células B y T de memoria, cuyos receptores de superficie reconocen las secuencias originales del antígeno o no reconocen nuevas variantes. Esto pudiera inhibir la capacidad del sistema inmune para combatir la infección.^(48,49)

3.1.8 Vacunas

El desarrollo de vacunas para combatir la infección VIH-1 ha sido obstaculizado por múltiples factores, entre los que destacan la falta de una comprensión clara sobre la contribución de la respuesta inmune humoral y la mediada por células para la contención viral y progresión de la enfermedad. Otro obstáculo es la alta variabilidad antigénica de los epítomos virales que provoca un escape a la respuesta por parte del linfocito T citotóxico (CTL) y anticuerpos neutralizantes^(34,35).

Actualmente se han desarrollado solo dos estrategias para la construcción de vacunas que contrarresten los problemas de la alta variabilidad genética del HIV-1. Una de estas estrategias es el desarrollo de una vacuna basada en los aislados virales más frecuentes en determinada región geográfica. Otra estrategia es el desarrollo de una vacuna basada en la construcción de inmunógenos con secuencias consenso ancestrales de los principales subtipos encontrados en la población⁽⁵⁰⁾.

Dentro de los prototipos de vacunas que se han desarrollado y se están probando se encuentran las vacunas construídas en base de ADN plasmídico, virus vaccinia Ankara modificado, poxvirus de canario, poxvirus de pollo y vectores adenovirales, más recientemente se han incluido virus adeno-asociados, virus de encefalitis equina y lipopéptidos derivados de la proteína gp120. Entre estas se encuentran las realizadas con inmunizaciones iniciales con ADN que codifica para proteínas de SIV, seguidas de un refuerzo ya sea con virus vaccinia Ankara modificado o con vectores adenovirales. Después de retar con SIV a los macacos vacunados se encuentran respuestas inmunes amplias y específicas que permanecen de 6 meses a un año después de la infección y que se refleja en la disminución de la carga viral en plasma. La mejor vacuna hasta hoy es SIV atenuado que reduce hasta 3 log la carga viral⁽⁵¹⁾.

Hoy en día existen algunas posibles vacunas contra VIH-1 que se encuentran en distintas fases de desarrollo y pruebas clínicas, sin embargo el desarrollo hacia vacunas realmente eficientes es lento. Algunas de estas vacunas emplean vectores adenovirales

Ad5 (adenovirus serotipo 5) recombinantes ya sean solos o usados como refuerzo después de una inmunización inicial con ADN. El 60% de las vacunas basadas en Ad5 han resultado efectivas tanto en estudios con primates como en pruebas clínicas fase II. Sin embargo la presencia de respuesta inmune pre-existente contra estos vectores adenovirales representa una limitante importante. Actualmente una vacuna Ad5 trivalente que expresa Gag, Pol y Nef es probada en 3000 pacientes del norte y sur de África⁽⁵²⁾.

Se han obtenido resultados alentadores de las pruebas clínicas fase II de la vacuna desarrollada por el Instituto Nacional de Salud (NIH) en Estados Unidos. Esta vacuna comprende una inmunización inicial con ADN polivalente (codifica para los genes *gag*, *pol* y *nef* del subtipo B y el gen env de los subtipos A,B y C), seguida de un refuerzo con un Ad5 que expresa los tres diferentes Env, Gag y Pol de VIH-1. La respuesta inmune generada por los individuos vacunados en comparación con otras vacunas son sumamente alentadores y se espera que esta vacuna entre en fase IIb en principios del año 2007^(51,52,53).

Aun así se piensa que estas vacunas eficientes en estudios preclínicos, no progresarán al enfrentar el reto real en pacientes infectados con VIH-1, como ha sucedido con muchas otras.

3.2.- Procesamiento Antigénico

La restricción de las células T por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) es el hecho de que los linfocitos T (sean los CD4⁺ o los CD8⁺) solo pueden reconocer al antígeno cuando viene presentado en la membrana de una célula con MHC propio.

Se sabe que este antígeno debe ser procesado proteolíticamente, dentro de la célula presentadora de antígenos (CPA) y posteriormente presentado como péptido en base a moléculas del MHC. La presentación de antígenos puede llevarse a cabo por dos

moléculas: MHC clase I y MHC clase II. Los antígenos presentados por moléculas MHC I generalmente son endógenos y activan a los CTLs para lisar células infectadas, mientras que los antígenos presentados por MHC II son generalmente exógenos y activan a los linfocitos ayudadores (Th) para controlar la actividad humoral⁽⁵⁴⁾.

Una de las principales diferencias en estas vías de procesamiento es en que tipo de células pueden llevarse a cabo, debido a que las moléculas MHC I se encuentran en cualquier célula nucleada y la expresión de las moléculas MHC II se restringe solo a CPA especializadas como lo son macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Si bien la degradación antigénica es esencial en cualquiera de las dos vías, aun así los mecanismos de procesamiento son fundamentalmente diferentes.

3.2.1.- Procesamiento para la presentación por MHC I

Los epítomos presentados en moléculas MHC I son generalmente proteínas intracelulares, por lo que todas las proteínas citosólicas son fuente potencial para esta vía, además de las proteínas de microorganismos intracelulares que se encuentran también en el citosol debido a que utilizan la maquinaria celular para producirlas.

Un complejo citosólico proteolítico llamado proteasoma es el encargado de la generación de estos péptidos, el cual posee una subunidad que reconoce proteínas ubiquitinadas o mal plegadas. Los péptidos generados por el proteasoma son transportados hacia el retículo endoplasmico (RE) por el transportador asociado al procesamiento del antígeno TAP (es dependiente de adenosin-trifosfato). Esta proteína TAP forma parte del llamado complejo de carga del péptido. En este complejo están presentes la tapasina, calreticulina y la tlo oxido reductasa ERp57. En el RE el péptido es asociado con heterodímeros de la cadena pesada de MHC I y β 2microglobulina; el surco que alberga al péptido tiene un tamaño restringido para péptidos de 8 hasta 11 aminoácidos. Este complejo es entonces finalmente transportado a la membrana celular por el RE y la red del Golgi^(54,55,56) (Fig 7).

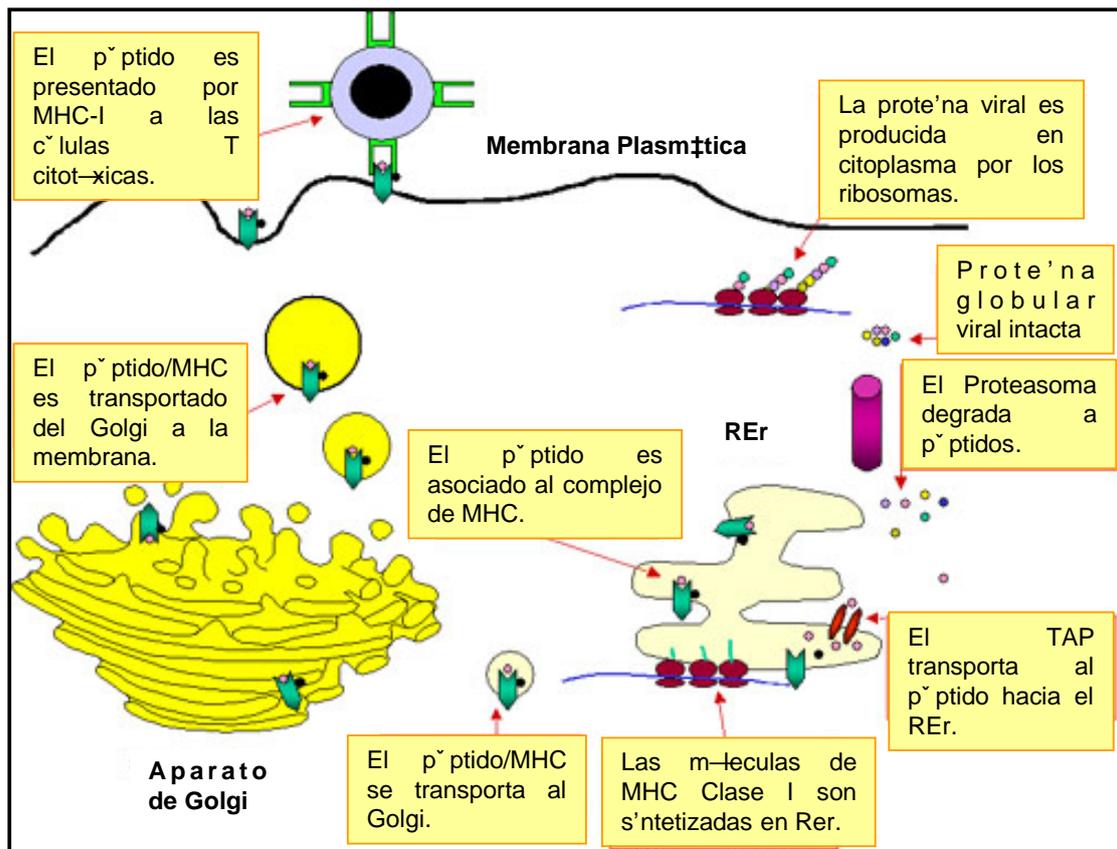


Fig. 7 Procesamiento de antígenos para la presentación por la molécula MHC I.

Tomado de: Dr. Richard Hunt, Microbiology and Immunology on-line, University of South Carolina, School of Medicine.

3.2.2.- Procesamiento para la presentación por MHC II

A diferencia de procesamiento vía MHC I, las moléculas MHC II presentan péptidos derivados del ambiente extracelular; proteínas microorganismos y material apoptótico. Estos materiales son internalizados y procesados por proteasas de la vía endocítica. Las moléculas MHC II recién sintetizadas son asociadas en el RE con la cadena invariante no polimorfica Ii, la cual actúa como chaperona para el plegamiento de MHC II y evita que algún péptido pueda ser cargado en el surco. La cadena Ii es degradada en los endosomas por acción de proteasas, y entonces se asocia al surco el péptido invariante asociado a clase II CLIP (por sus siglas en inglés). Estos heterodímeros MHC II-CLIP interactúan más tarde con un dímero no polimórfico de la familia MHC, el antígeno leucocitario humano HLA-DM, el cual cataliza la disociación entre CLIP y MHC II. Entonces ahora ya con el surco vacío, los péptidos procesados

provenientes de endocitosis o fagocitosis son cargados en el surco del MHC II. El heterodimero de MHC II puede ligar una variedad de proteínas parcialmente fragmentadas de diferentes tamaños. Mientras que el centro del epítipo ligado a MHC II es protegido de la degradación, los extremos que salen de ambos extremos del surco son recortados por proteasas para producir el epítipo final ^(54,55,56) (Fig. 8).

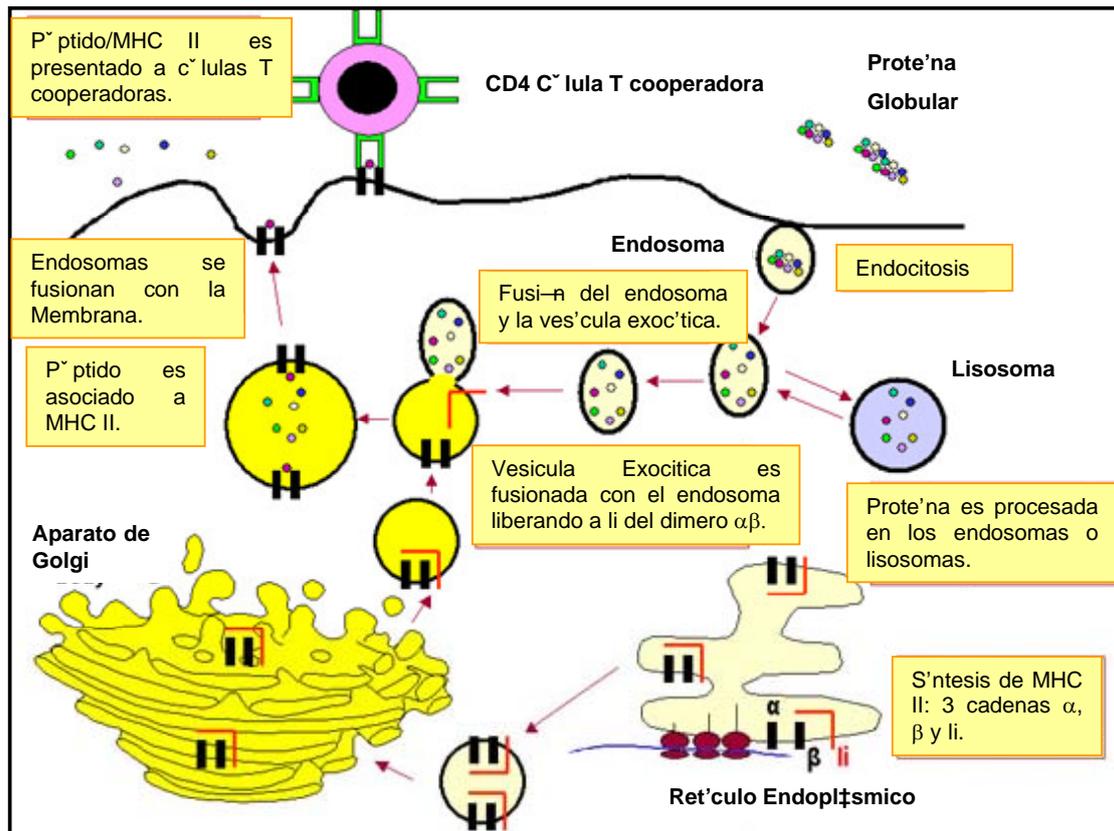


Fig. 8 Procesamiento de antígenos para la presentación por moléculas MHC II.

Tomada de: Dr. Richard Hunt, Microbiology and Immunology on-line, University of South Carolina, School of Medicine.

3.2.3 Aminoácidos de anclaje en MHC I

El surco o hendidura del MHC I es el sitio destinado a albergar el péptido procesado y tiene una capacidad para péptidos entre 8 y 11 aminoácidos. ^(57,58) La mayoría de los péptidos que se han aislado tras separarlos de moléculas de MHC I a los que estaban unidos son nonámeros u octámeros, pero también se pueden unir péptidos de 7

aminoácidos o de 10 aminoácidos, si bien lo hacen con 100 o 1.000 veces menor eficiencia.^(59,60,61,62)

Cada versión alélica de MHC I tiende a reconocer ciertos aminoácidos conservados en determinadas posiciones. Ambos extremos de la hendidura del MHC I poseen aminoácidos conservados que interaccionan con los aminoácidos en posiciones 1,2 y 8, 9 respectivamente del péptido y que se denominan como aminoácidos de anclaje^(57,58,60) (Fig. 9) .

Los aminoácidos variables entre las distintas versiones alélicas se localizan en la hendidura que sirve para unirse al péptido. Esto parece sugerir que son precisamente estas diferencias alélicas las responsables de las diferencias observadas en la capacidad de diversas versiones de moléculas MHC de responder a determinados péptidos y no a otros.

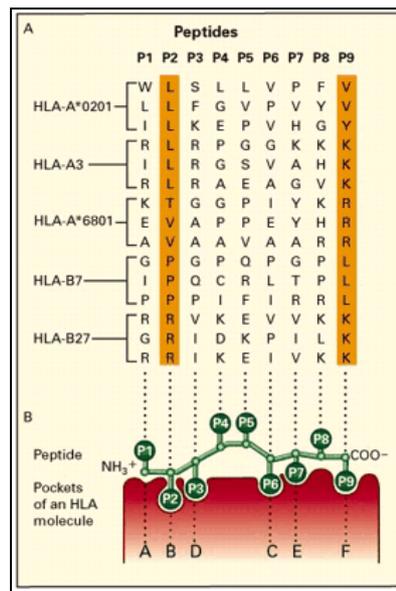


Fig. 9 Aminoácidos de anclaje preferentes para la molécula HLA I. Se muestra la preferencia para distintos haplotipos.

Tomada de: Dr. Richar Hunt, Microbiology and Immunology on-line.

3.2.4 Importancia de la diversidad de HLA y la infección

Respecto a los aminoácidos de anclaje, se ha reportado que un simple cambio en uno de estos aminoácidos en un epítomo restringido por HLA I , puede escapar al reconocimiento por este tipo específico de HLA I , pero también puede ser reconocido

por otro HLA I siempre y cuando este cambio sea por un aminoácido de anclaje preferencial para este haplotipo.

Experimentos muestran que la generación de mutaciones en epítomos virales en aminoácidos de anclaje preferentes de cierto haplotipo de HLA tipo I presente en el paciente, genera que el complejo péptido/MHC I no se forme o sea una interacción sumamente deficiente, generando escape por CTL⁽⁶³⁾. Existe evidencia de que las mutaciones en un determinado epítomo alteran o facilitan su procesamiento y destrucción por proteasomas lo que da como resultado que no sea presentado por moléculas MHC I⁽⁶⁴⁾.

Se ha analizado extensamente la interacción péptido/MHC. Además de los aminoácidos de anclaje, se sabe que la estabilidad de este complejo también se debe a un orden determinado de aminoácidos que generan un determinado ambiente en el surco del MHC y esto da una cierta afinidad hacia el péptido. Esta afinidad da la estabilidad y alarga la vida media del complejo, además de escapar al fenómeno de tolerancia. Se ha reportado que al hacer cambios en aminoácidos de anclaje con el objetivo de mejorar la afinidad péptido/MHC, sin tener en cuenta el ambiente hidrofóbico que pueda alterarse en los aminoácidos centrales de la curva (P5-P7) pueden generarse cambios en la hidrofobicidad, de tal manera que la interacción se hace más débil en lugar de optimizarse^(65,66,67).

Muchos estudios han demostrado que modificaciones en los aminoácidos de anclaje en un determinado epítomo CTL con el objetivo de incrementar la afinidad péptido/MHC puede potenciar su inmunogenicidad.

Trabajos con antígenos de tumores, donde el principal problema es precisamente la baja afinidad péptido/MHC generando tolerancia, se ha probado que péptidos modificados en los aminoácidos de anclaje (APL, altered peptide ligands) son 100 veces más efectivos activando células T naive que el péptido silvestre. Se ha demostrado con ensayos de reconocimiento por CTLs específicos de pacientes con tumores, porcentaje de disociación del complejo péptido/MHC, porcentaje de lisis en cultivos celulares, etc que estos péptidos modificados son mejores que los péptidos silvestres⁽⁶⁸⁾.

Recientemente se han realizado trabajos en los cuales se parte de una biblioteca de péptidos modificados, que provienen de un péptido silvestre con diferentes aminoácidos en las posiciones de anclaje según las preferencias del HLA implicado, en los cuales se hace una selección paso a paso de los mejores péptidos fijando el aminoácido de anclaje óptimo en cada posición. Esta selección se hace con el fin de encontrar los mejores péptidos que sean inmunogénicos para un determinado % de la población afectada con un determinado tumor. Se propone que la vacunación con estas bibliotecas pueda generar una población de CTLs protectoras contra un determinado tumor ^(69,70).

También se ha trabajado con esta estrategia de modificación de péptidos en las posiciones de anclaje con macacos resus. Se han obtenido péptidos derivados de antígenos de SIV que ligan con mayor afinidad a Mamu-A*11, además se demostró que estos mismos péptidos tenían reactividad cruzada interespecie (ensayos de ELISPOT tras la inmunización de ratones H-2K^K con estos péptidos)⁽⁷¹⁾.

3.3 Inmunización génica

La inmunización génica o basada en ADN consiste en la administración de un plasmido de ADN (que codifica para un determinado antígeno) en un organismo, donde el antígeno es expresado *in situ*, lo que desencadena una respuesta inmune antígeno-específica⁽⁷²⁾.

Este método de inmunización ofrece diferentes ventajas, entre las cuales tenemos la facilidad de producir grandes cantidades de ADN, amplia aplicabilidad a diferentes patógenos, la habilidad de inducir respuesta celular a través de la presentación por MHC I y la oportunidad de manipular la respuesta inmune a través de la co-expresión de genes que codifican moléculas inmunológicamente relevantes^(72,73).

La eficiencia de la respuesta inmune protectora que desencadenan las vacunas de ADN ha sido observada en una amplia variedad de virus, bacterias y parásitos de importancia clínica. Se ha obtenido una respuesta inmune protectora en modelos animales del virus de la Influenza, *Micobacterium tuberculosis*, virus del anthrax, etc cuando estos son sometidos a la infección. Actualmente se encuentran vacunas de ADN en fase de ensayos clínicos entre las cuales están algunas vacunas contra virus VIH-1, Virus de la Hepatitis B (VHB), Dengue, Influenza y Malaria. Además existen actualmente dos vacunas de ADN aprobadas y en uso, una contra el Virus del Nilo en caballos y otra contra el Virus de necrosis hematopoyética infecciosa en salmón⁽⁷⁴⁾.

Una interesante variante de inmunización génica contra patógenos es la inmunización somática transgénica (STI *somatic transgenic immunization*) reportada inicialmente por Zanetti y colaboradores, que está basada en el concepto de “anticuerpos antigenizados” (*antigenized antibodies*). Esto consiste en la inmunización con un plásmido que codifica para un anticuerpo, donde se ha cambiado alguna de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la cadena pesada variable (V_H) por secuencias que codifican para antígenos^(75,76).

Las ventajas que ofrece esta variante de inmunización son las siguientes: 1) son altamente inmunogénicos y permiten no solo la presentación de epítopos de células B, sino también una carga eficiente de epítopos CTL dentro del MHC después del procesamiento antigénico por parte de las CPA, 2) las asas de los dominios de las Ig están formados por secuencias de aminoácidos con variación natural que pueden ser acomodadas por la región framework, 3) en contraste con los péptidos libres, los cuales tienen una vida media muy corta *in vivo*, los péptidos insertados en la Ig compartirán la vida media de este acarreador, las cuales son más estables y de vida media más larga, 4) las asas dentro de los dominios de la Ig, y por tanto los péptidos mismos son protegidos contra las proteasas⁽⁷⁷⁾.

Esta metodología se ha empleado con éxito desde sus inicios para generar una respuesta inmune celular y/o humoral protectora. Un trabajo reciente de Lunde E y colaboradores comprueba una alta eficiencia en la presentación a células T con tres antígenos diferentes (HA hemaglutinina, OVA ovoalbumina y HEL lisosina de huevo de gallina)⁽⁷⁷⁾. En otro trabajo se genera un anticuerpo con antígenos que se sabe confieren protección contra encefalomiелitis alérgica experimental EAE (modelo experimental de enfermedad autoinmune) en los CDR 2 y 3 de la V_H; al inmunizar esta construcción en ratones se observa un alto nivel de resistencia de los mismos hacia la EAE⁽⁷⁸⁾.

Por todo lo antes mencionado es que se utilizó esta metodología, además de la ventaja de que en nuestro grupo de trabajo ya se han publicado trabajos exitosos utilizando dicha metodología^(90,91). Para nuestro trabajo se utilizó un vector de expresión en mamíferos que codifica para la V_H completa de una Ig humana, el vector VHEXpress⁽⁷⁹⁾.

3.4 Despliegue en fagos filamentosos (Phage Display)

La tecnología de despliegue en fagos es una técnica de expresión de moléculas en bacteriofagos y bioselección *in vitro* en la cuál un péptido o proteína es fusionada genéticamente a una de las proteínas de superficie de un bacteriófago o fago filamentosos, desplegando el péptido/proteína en cuestión en la superficie del fago. La manipulación *in vitro* de los fagos es sencilla, rápida y de bajo costo por lo que permite la generación de una gran cantidad de la proteína deseada⁽⁸⁰⁾.

El fago M13 es el más comunmente utilizado en esta tecnología. Este mide aproximadamente 6.5 nm de diámetro y 930 nm de longitud, su masa total esta constituida en un 87% por proteína, posee un genoma de ADN cadena sencilla (ADNcs) empaquetado en un cilindro flexible de proteínas: 1) pVIII: principal proteína de la cápside (2,700 copias/fago aproximadamente), 2) pVII y pXI : expresadas en uno de los extremo del fago (4-5 copias/fago), 3) pIII y pVI : expresadas en el otro extremo del fago (4-5 copias/fago). Los fagos filamentosos necesitan de bacterias que expresen pili para realizar el proceso de infección y a diferencia de los fago líticos estos no lisan a sus hospederos dando gran ventaja al proceso de obtención y purificación de las partículas virales. Generalmente puede llegarse a tener títulos de hasta 10^{12} partículas por mililitro^(80,81).

Esta tecnología ha sido empleada en el estudio de VIH/SIDA para el mapeo de anticuerpos monoclonales anti-VIH, evaluaciones inmunogénicas de gp120, así como en la búsqueda de mimótopos reconocidos por sueros humanos^(82,83).

Las justificaciones del porque se utilizó esta técnica además de las que ya se comentaron son las siguientes:

- Obtención rápida, sencilla y de bajo costo de bibliotecas de péptidos.

- Fusionado a la proteína VIII, como se hizo en este trabajo, permite la obtención de una gran cantidad de péptido expresado en la superficie del fago M13.
- Facilidad de secuenciar únicamente por la extracción del ADNcs del fago recombinante.
- Se ha comprobado que el fago por si mismo es un potente inmunogeno por lo que no es necesario el uso de adyuvantes al inmunizar^(85,86).
- El despliegue de los epítomos/péptidos nos permite utilizar los fagos recombinantes como antígenos en los ensayos de proliferación celular.

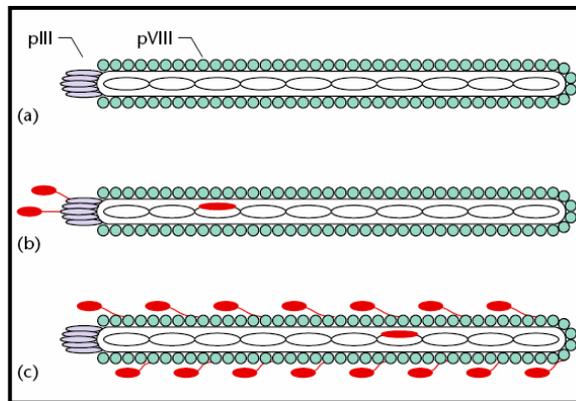


Fig 10. Esquema representativo que muestra: a) Fago filamentosos silvestre, b) despliegue de proteína fusionada a pIII, c) despliegue de proteína fusionada a pVIII.

Tomada de : Stricker N, 2001, Enciclopedia of life sciences.

IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Creemos que una nueva estrategia para el desarrollo de una vacuna exitosa puede ser la construcción de inmunógenos capaces de inducir la respuesta celular contra un epítomo CTL reconocido por diferentes MHC y podría lograrse al usar distintos aminoácidos en las posiciones de anclaje que permitirá cubrir la mayoría de los HLA I en la población humana. Además estos inmunógenos pueden servir para inducir respuesta inmune contra epítomos que escapan del reconocimiento por CTL al introducir mutaciones dentro del mismo. El desarrollo de este nuevo concepto de vacuna nos permitirá atacar los principales y más fuertes obstáculos que se presentan al elaborar una vacuna contra VIH-1, así como otros patógenos con altos niveles de variabilidad antigénica.

V.- HIPÓTESIS

Inmunógenos construidos con múltiples mutaciones dentro del epítomo CTL inducirán respuesta inmune más amplia contra ellos. La construcción de inmunógenos usando distintos aminoácidos en las posiciones de anclaje para MHC, permitirá inducir respuesta CTL al inmunizar con este inmunógeno ratones con distintos haplotipos de H2.

VI.- OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de este proyecto es la construcción de inmunógenos con las características necesarias para inducir un diverso y mayor repertorio de CTLs contra VIH-1.

VII.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construcción de dos inmunógenos que contienen un epítomo CTL de VIH-1, con distintos aminoácidos de anclaje para MHC I de ratón y bancos de variantes de este epítomo en un vector que permite inmunización génica (VHExpress) y en fago M13.
2. Inmunización de ratones Balb/c con ADN y evaluación de la respuesta inmune celular de estos ratones utilizando los fagos recombinantes como antígenos.

VIII.- METODOLOGIA

8.1.-Construcción de los inmunógenos y antígenos

Los epítomos/péptidos CTL restringidos al haplotipo de ratón H2^d que se trabajaron fueron: 1) ¹⁹⁷AMQMLKETI²⁰⁵ (deriva de la proteína p24), 2) ³¹⁸RGPGRAFVTI³²⁷ (deriva del loop V3 de la proteína gp 120) denominados Gag y L respectivamente.

8.1.1.-Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos con la secuencia del fragmento de ADN que codifica para el epítomo/péptido definido de VIH-1 rodeado con las regiones FR3 y FR4 de la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina (V_H) humana que permitirían la construcción de los epítomos/péptidos dentro de la región determinante de complementariedad 3 de la cadena pesada de una inmunoglobulina (HCDR3). (Tabla 2)

Epítomo Gag

El oligonucleótido tiene la secuencia que codifica para el epítomo/péptido en el centro (9 aa) y se añadieron 2 aminoácidos más de la secuencia natural de VIH-1 a los extremos del epítomo/péptido. Como se mencionó, en el extremo 5' del oligonucleótido se tiene una secuencia que traslapa con el FR3 de la V_H (6 aa) y en el extremo 3' traslapa con el FR4 (5aa). (Tabla 2)

Con estas características se diseñó el oligonucleótido con la secuencia silvestre del epítomo/péptido, y 2 oligonucleótidos con modificaciones en la secuencia del epítomo/péptido; 1) Oligonucleótido "a" : los aminoácidos de anclaje correspondientes a el haplotipo de ratón Balb/c (posiciones 2 y 9) y 2 aminoácidos mas del epítomo/péptido (posiciones 4 y 6) fueron reemplazados por aminoácidos al azar 2) Oligonucleótido "b" : el aminoácido de anclaje N-terminal (posición 3) correspondiente al haplotipo de ratón C57BL/6 y 3 aminoácidos más del epítomo/péptido (posiciones 6, 7 y 8) fueron

reemplazados por aminoácidos al azar (la preferencia de aa en la posición de anclaje C-terminal para este haplotipo es isoleucina (I) en la posición 9, la cual coincide con la secuencia silvestre del epítopo/péptido por lo que no fue reemplazado como en el primer caso) (Fig 10).

Epítopo L

El oligonucleótido tiene la secuencia que codifica para el epítopo/péptido (10 aa), en el extremo 5' se tiene una secuencia que traslapa con el FR3 de la V_H (6 aa) y en el extremo 3' traslapa con el FR4 (5aa). (Tabla 2)

Con estas características se diseñó el oligonucleótido con la secuencia silvestre del epítopo/péptido, y 2 oligonucleótidos con modificaciones en la secuencia del epítopo/péptido; 1)Oligonucleotido “1” : donde cinco aminoácidos del epítopo/péptido (posiciones 5,7,8,9 y10) fueron reemplazados por aminoácidos al azar 2)Oligonucleótido “2” : donde otros cinco aminoácidos del epítopo/péptido (posiciones 1,3,5,7 y9) fueron reemplazados por aminoácidos al azar (Fig 11).

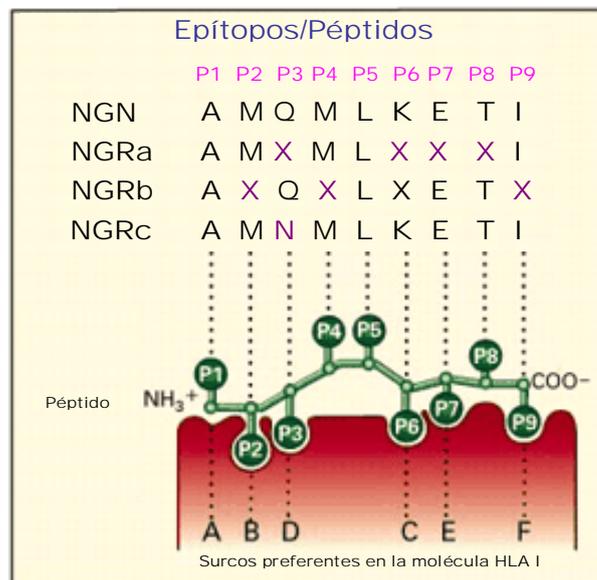


Figura 11. Secuencia de aminoácidos del epítopo/péptido silvestre y modificaciones en aminoácidos de anclaje.

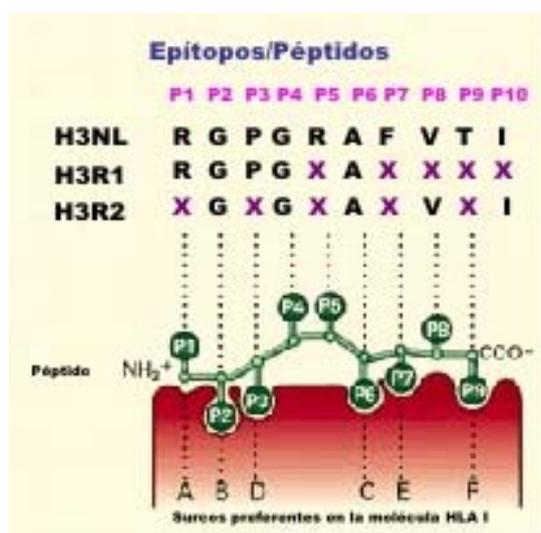


Figura 12. Secuencia de aminoácidos del epítomo/péptido silvestre y modificaciones en aminoácidos centrales.

8.1.2.-Ensamblaje de la cadena pesada de una inmunoglobulina

Se realizó el ensamblaje del fragmento de ADN que codifica para la cadena pesada de inmunoglobulina humana V_H , haciendo uso de 8 oligonucleótidos traslapados. El oligonucleótido que codifica para la región CDR3 se reemplazó por los oligonucleótidos que codifican para los epítomos/péptidos de VIH-1 silvestres y los bancos de variantes de los mismos⁽²⁸⁾ (Tabla 2 y Fig 12). Para obtener un control, también se realizó el ensamblaje con los 8 oligonucleótidos para obtener la V_H humana con CDR3 de la línea germinal de la inmunoglobulina, a este ensamblaje se le denominó VVH.

Inmunización Génica con Epítomos Variables de VIH-1

Tabla 1. Reacción de ensamblaje

Reactivo	Cantidad
Mezcla de oligonucleótidos (B1,B2,B3,B5,B6,B8) 3.6 pmol/ μ l	6 μ l
Oligonucleótido B4 38 pmol/ μ l	0.6 μ l
Oligonucleótido “a”/ “b”/ “1” /“2”/B7 20 pmol/ μ l	1 μ l
Buffer 10X	2.5 μ l
Mg 50Mm	0.75 μ l
DNTP's 10Mm	0.5 μ l
Taq Polimerasa 5U/ μ l	pendiente
H ₂ O	13.4 μ l

Condiciones de Reacción (Alineamiento de Oligonucleótidos)	
Temperatura	Tiempo
94°C	30 s
84°C	1 m
74°C	1 m
64°C	1 m
54°C	1 m
T°Ambiente	5 m
Hielo	
Se añade la enzima (0.25 μ l)	
94°C	7 m
94°C	1.5 m
57°C	2 m
72°C	2m
72°C	2 m

7 ciclos

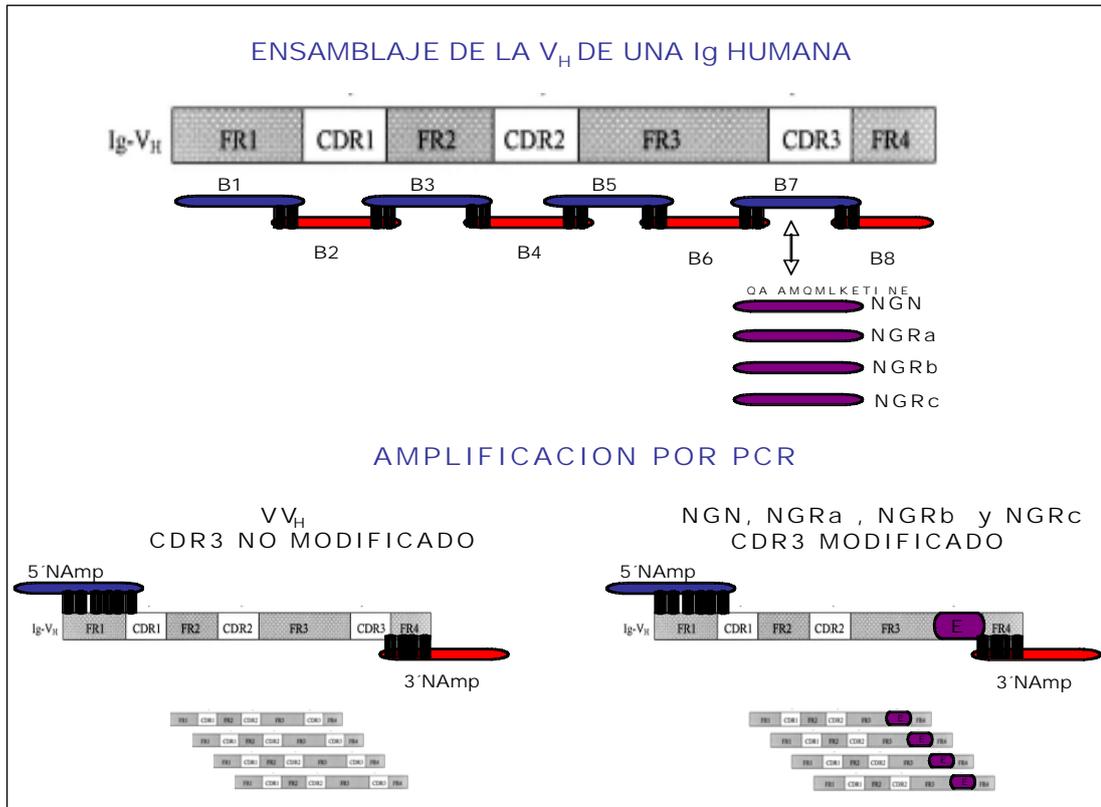


Figura 13. Ensamblaje del fragmento de ADN que codifica para la Ig V_H mediante el uso de 8 oligonucleótidos traslapados. Sustitución de la región CDR3 por el epítipo/péptido p24¹⁹⁷⁻²⁰⁵.

Inmunización Génica con Epítomos Variables de VIH-1

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en el ensamblaje de la V_H, los que codifican para los epítomos y sus variantes, y los necesarios para la clonación en los diferentes vectores.

Construcción de Inmunógenos		
Péptidos/Inmunogenos	Oligonucleótidos	Vectores de Clonación
Framework 1	B1 5'GAGGTGCAGCTGTTGGAG TCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCA3'	<p>Vector de Expresión en Eucariontes VHExpress</p> <p>Construcción de un fragmento de ADN que codifica para la V_H natural. Ésta será expresada dentro del contexto de cadena pesada de una Ig.</p>
CDR1	B2 5'CCCTGGAGCCTGGCGGAC CCAGCTCATGGCATAGCTGC TAAAGGTGAATCCAGAGGC TGCACAGGAGAGTCTCAGG GA3'	
Framework 2	B3 5'TGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCA3	
CDR2	B4 5'GAACCGGCCCTTCACGGA GTCTGCGTAGTATGTGCTAC CACCCTACTACTAATAGCT GAGACCCACTCCAGCCCCTT 3'	
Framework 3	B5 5'GACTCCGTGAAGGGCCGG TTCACCATCTCCAGAGACAA TTCCAAGAACACGCTGTATC TGCAAATGAAC3'	
Framework 3/CDR3	B6 5'CGCACAGTAATATACGGC CGTGTCCCTCGGCTCTCAGGC TGTTCAATTTGCAGATACAGC GT3'	
CDR3	B7 5'GCCGTATATTACTGTGCGA AAGGTAGTACTTTGACTAC TGGGGCCAGGGAACCCCTGG TC3'	
Framework 4	B8 5'TGAGGAGACGGTGACC AGGGTTCCTGGCCCCA3'	
Iniciadores para la amplificación por PCR	5NAmp 5'ATTCTAGCCATGGTGAATT CCTGCAGGAGGTGCAGCTGT TGGAGTCT3'	
	3NAmp 5'CATGTACGTATGGATCCAT TGAGGAGACGGTGACCAGG GT 3'	

Tabla 2 Continuación.

<p><i>Epítomo Gag</i> Oligo Gag nominal GVYYCA QA AMQMLKETI NE WGQGT Bibliotecas de Gag : Oligo a GVYYCA QA AMXMLXXXI NE WGQG Oligo b GVYYCA QA AXQLXETX NE WGQGT</p>	<p>Oligo Gag 5'GTA TAT TAC TGT GCG CAG GCT GCT ATG CAG ATG CTT AAG GAG ACT ATT AAC GAG TGG GGC CAG GGA ACC 3'</p> <p>Oligo a 5'GTA TAT TAC TGT GCG CAG GCT GCT ATG NNK ATG CTT NNK NNK NNK ATT AAC GAG TGG GGC CAG GGA ACC 3'</p> <p>Oligo b 5'GTA TAT TAC TGT GCG CAG GCTGCT NNK CAG NNK CTT NNK GAG ACT NNK AAC GAG TGG GGC CAG GGA ACC 3'</p>	<p>VHExpress Nominales y bibliotecas expresadas en contexto de CDR3 de la V_H.</p> <p>pG8SAET Nominales y bibliotecas expresadas en fago M13 recombinante como epítomo flaqueado por 6 aa del FR3 y 5 aa del FR4 y fusionado a la proteína VIII del fago.</p>
<p><i>Epítomo L</i> Oligo L nominal GVYYCA RGPGRFVTI WGQGT Bibliotecas de L : Oligo 1 GVYYCA XGXGXAXVXI WGQG Oligo 2 GVYYCA RPPGXAXXXX WGQGT</p>	<p>Oligo L 5'GCC GTA TAT TAC TGT GCG CGT GGT CTT GGT CGT GCT TTT GTT ACT ATT TGG GGC CAG GGA ACC CTG 3'</p> <p>Oligo 1 5'GTA TAT TAC TGT GCG NNK GGT NNK GGT NNK GCT NNK GTT NNK ATT TGG GGC CAG GGA ACC 3'</p> <p>Oligo 2 5'GTA TAT TAC TGT GCG CGT GGT CTT GGT NNK GCT NNK NNK NNK NNK TGG GGC CAG GGA ACC CTG 3'</p>	
<p>Iniciadores para la amplificación por PCR</p>	<p>5DAmp 5'TGATATTCGTACTCGAGCC ATGGTGTATATTACTGTGCG 3'</p> <p>3DAmp 5'ATGATTGACAAAGCTTGG ATCCCTAGGTTCCCTGGCCC CA 3'</p> <p>Iniciadores 3NAmp y 5NAmp</p>	

7.1.3 Amplificación por PCR

Inmunógenos

El ADN de este ensamblaje fue amplificado por PCR con el uso de iniciadores (5'Namp y 3'Namp) que flanquean en el extremo 5' y 3' de la V_H y que además introducen sitios de restricción Pst I/Bst EII, necesarios para clonar en el vector VHEXpress (Tabla 2). Este fragmento de ADN que codifica para la región V_H tiene un tamaño de 373 pb.

Tabla 3. Reacción de amplificación. En esta tabla se muestra los reactivos y cantidades necesarias para la amplificación por PCR del ensamblaje para la clonación en VHEXpress.

Reactivo	Cantidad
Producto del Ensamblaje	0.5 µl
Mezcla de iniciadores Namp 5pm/µl	3 µl
Buffer 10X	5.0 µl
Mg 50Mm	1.0 µl
DNTP's 10Mm	1.0 µl
Taq Polimerasa 5U/µl	0.25 µl
H ₂ O	39.25 µl

Tabla 4. Condiciones de reacción. En esta tabla se describen las temperaturas y tiempos necesarios para amplificar por PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 m	1
94°C	1 m	
57°C	1 m	30
72°C	1 m	
72°C	3 m	1

Antígenos

Para la construcción de los antígenos que se utilizaron en la proliferación celular, se diseñaron iniciadores complementarios (5'DAmp y 3'DAmp) a las regiones FR3 y FR4 que flanquean el epítopo/péptido diseñado para el ensamblaje anteriormente descrito y que además introducen sitios de restricción Nco I/Bam HI, necesarios para clonar en el vector pG8SAET (Tabla 1). Con el uso de estos iniciadores y los oligonucleótidos anteriormente descritos como templado, se obtuvo un producto de amplificación de 109 pb en el PCR.

Tabla 5. Reacción de amplificación. En esta tabla se muestra los reactivos y cantidades necesarias para la amplificación por PCR del ensamblaje para la clonación en pG8SAET.

Reactivo	Cantidad
Oligonucleótidos "a"/ "b"/ "1"/ "2" 0.25pm/μl	1.0 μl
Mezcla de iniciadores DAmp 5pm/μl	3 μl
Buffer 10X	5.0 μl
Mg 50Mm	1.0 μl
DNTP's 10Mm	1.0 μl
Taq Polimerasa 5U/μl	0.25 μl
H ₂ O	38.75 μl

Tabla 6. Condiciones de reacción. En esta tabla se describen las temperaturas y tiempos necesarios para amplificar por PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	2 m	1
94°C	30 s	
56°C	40 s	30
72°C	30 s	
72°C	2 m	1

8.1.4 Clonación de inmunógenos y antígenos

Estas construcciones se clonaron en el vector de expresión VHexpress para células eucariotas que permitirá tener el inmunógeno como ADN para inmunización génica. Además, se clonó en un fagémido (pG8SAET) que permitió expresar el péptido (sin contexto VH) fusionado a la proteína VIII en la superficie de fagos M13, esto para poder tener antígeno para ensayos de proliferación celular.

El vector de expresión VHEXpress codifica para la cadena pesada completa de una inmunoglobulina humana. La región VH natural del vector fue reemplazada por cada uno de los inmunógenos construidos; el epítipo silvestre, los bancos de variantes y el control que codifica solo la región V_H de inmunoglobulina sin el péptido insertado VVH.

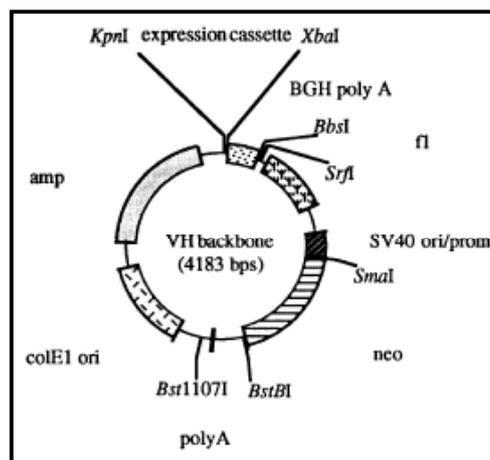


Figura 14. Vector de expresión VHEXpress

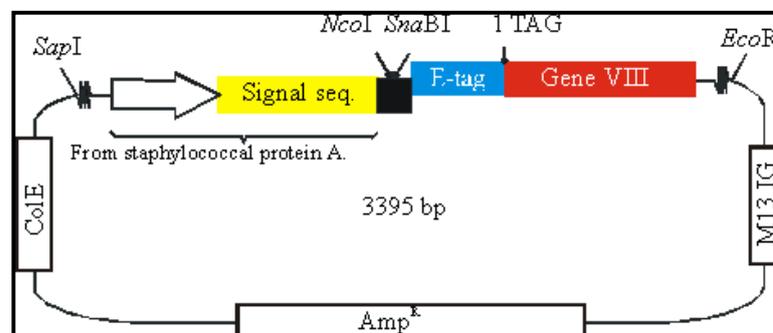


Figura 15. Vector fagémido p8GSAET

Inmunógenos

Para clonar en VHEXpress los productos de PCR y el DNA del vector fueron digeridos con 20 U de enzima Pst I por 3hrs a 37°C, después fue añadida 20 U de enzima Bst EII e incubado a 60°C por 3hrs más. A cada reacción fue añadido \approx 2-3 μ g de producto de PCR purificado por el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Después de una electroforesis en gel de agarosa (1.5% para los productos de PCR y 0.8% para el vector) la banda correspondiente al peso estimado fue cortada y purificada por el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Después de varias pruebas se encontró una relación óptima para la reacción de ligación. La ligación se llevó a cabo con 50 ng de vector con 80 y 100 ng de inserto (relación 1:11.5 molar) en reacciones de 20 μ l con 10 U de T4 Ligasa (New England Biolabs).

Se realizaron de 1 a 40 electroporaciones (dependiendo de la biblioteca o clonación sencilla) con el 10% de la ligación (2 μ l). Cada una en 45 μ l de células electrocompetentes en celdas de electroporación BIORAD. Las células fueron recuperadas en un volumen determinado de medio SOC (extracto de levadura 0.5%, tryptone 2%, NaCl 10mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 20mM, Glucosa 20mM) 1 hr a 37°C y 250 rpm. De este volumen total se plaqueó 50 y 100 μ l en agar LB (extracto de levadura 0.5%, bactotryptone 1% , NaCl 1%, agar 1.5%) + Carbinicilina (50 μ g/ μ l) , y el control de células sin electroporar. Las cajas de petri se incubaron toda la noche a 37°C. Las células restantes fueron incubadas 2 horas más en las mismas condiciones descritas. Después se centrifugaron por 5 minutos a 6 000 rpm y el paquete celular fue resuspendido en YT 2X (16 g/L Bacto-tryptone, 10 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl) +Glicerol 30% para su conservación a -70°C. Al día siguiente se contaron las colonias que crecieron en las cajas y se calculó el número total de clonas obtenidas. Se picaron 10 colonias al azar y se les realizó PCR con los iniciadores Namp para confirmar si contenían el inserto clonado (fragmento de 437pb), tomando esto como base para denominar a cada clona

como positiva/negativa, entonces de acuerdo al número de clonas positivas se calculó la complejidad de las bibliotecas.

Antígenos

Para clonar en p8GSAET, los fragmentos amplificados por PCR (purificados) al igual que el vector fueron digeridos con 20 U de las enzimas Nco I/Bam HI por 6 hrs. a 37°C en reacciones con $\approx 1-2$ μg de ADN. Después de una electroforesis en gel de agarosa (1.5% para los productos de PCR y 0.8% para el vector) la banda correspondiente al peso estimado fue cortada y purificada por el kit Rapid Gel Extraction System de Marlingen.

Después de varias pruebas, se obtuvo una reacción de ligación óptima con las siguientes características. La ligación se llevó a cabo con 55ng de vector en relación 1:2 molar (11.2ng) con el inserto en reacciones de 15 μl con 10 U de T4 Ligasa (New England Biolabs).

La electroporación y el cálculo de la complejidad se realizó con las mismas condiciones ya descritas. El fragmento amplificado para la confirmación por PCR es de 109 pb y se utilizaron los iniciadores DAmP.

8.1.5 Obtención de fagos recombinantes

De las clonas positivas por PCR obtenidas de las clonaciones de las bibliotecas, se seleccionaron 20 de cada una para obtener fagos recombinantes y extraer ADN de cadena sencilla, como se describe a continuación.

A partir de una colonia aislada se inocularon 3ml de YT 2X + Carbinicilina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (YT 2X/cb). Se dejó crecer a 250 rpm y 37°C hasta una densidad óptica (D.O.) aproximada de 0.6 (250 rpm, 37°C). Se tomó 1.5 mL del inóculo y se añadió 15 μl de fago helper KO7 (Invitrogen) incubando 30 min sin agitación a 37°C seguidos de otros 30 min. de incubación a la misma temperatura pero con agitación de 250 rpm. Se transfirió a matraces de 250 ml y se añadió YT 2X/cb/kn (kanamicina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) hasta 50 mL. Se dejó

incubando a 30°C toda la noche (máximo 16 horas) a 250 rpm. Al día siguiente se centrifugó 20 minutos a 8 000 rpm 4°C y se pasó el sobrenadante a tubos de policarbonato. Se añadió 1/5 parte de PEG/NaCl (Polietilenglicol-8000 20%, NaCl 5M) y se dejó incubando 2 hr en hielo. Después, se centrifugó 15 min. a 10 000 rpm 4°C y el precipitado se resuspendió en 1000µl de TBS (Tris-HCl 50Mm, NaCl 150mM pH 7.5) y se transfirió a un tubo Eppendorf de 2mL. Se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm 4°C y el sobrenadante se pasó a tubos Eppendorf nuevos. Se añadió 200 µl de PEG/NaCl y se dejó incubando 1 hr en hielo. Después de la incubación se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm 4°C, se resuspendió en 400 µl de TBS y nuevamente se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm 4°C pasando finalmente a tubos Eppendorf nuevos de 1.5ml. El fago se tituló con *E. coli* TG1 (ver anexos) para poder ser utilizados como antígenos.

8.1.6 Purificación de ADN de cadena sencilla

A partir de una colonia aislada se inocularon 3ml de YT 2X/Cb. Se dejó crecer hasta una densidad óptica (D.O.) aproximada de 0.6 (250 rpm, 37°C) y se pasaron 500 µl de este cultivo a un tubo Eppendorf de 2 mL. Se añadió 5 µl de fago helper KO7 (Invitrogen) y se incubó 30 min. sin agitación a 37°C seguidos de otros 30 min. de incubación a la misma temperatura pero con agitación de 250 rpm. El resto del inóculo se centrifugó 1 min. a 9 000 rpm y las células fueron resuspendidas en medio YT 2X + Glicerol 30% para conservarlas a -70°C. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió YT 2X/cb/kn hasta un volumen de 5 mL en un tubo falcon de 50 mL y se dejó incubando a 30°C toda la noche a 250 rpm. Al día siguiente se centrifugó 20 minutos a 5 000 rpm 4°C y se pasó el sobrenadante a tubos Eppendorf de 2 mL. Se centrifugó nuevamente por 10 min. a 14 000 rpm 4°C para eliminar completamente las células. Se pasó 1.7 mL del sobrenadante a tubos nuevos y se añadió 300 µl de PEG/NaCl e incubando 1 hr en hielo. Después se centrifugó 10 min. a 14 000 rpm 4°C y el precipitado de ambos tubos se resuspendió en 600µl de TBS (Tris-HCl 50Mm, NaCl 150mM pH 7.5). Se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm 4°C y el sobrenadante se pasó a tubos Eppendorf nuevos de 1.5 mL. Se añadió 120 µl de PEG/NaCl y se dejó incubando 1 hr en hielo. Después de la incubación se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm 4°C, se retiró completamente el

sobrenadante aspirando con vacío. El precipitado se resuspendió en 100 μ l de NaI (NaI 4M, Tris-Base 10mM pH8.0 , EDTA 1M) y 250 μ l de EtOH. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente (T[°]A). Inmediatamente después se centrifugó 10 minutos a velocidad máxima a T[°]A . Se aspiró el sobrenadante con vacío y el precipitado se lavó con 250 μ l de EtOH 70% frío. El ADN se resuspendió en 25 μ l de H₂O estéril. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0.8% cargando 2 μ l de ADN.

8.1.7 Secuenciación de clonas

La secuenciación del ADNcs de los fagos recombinantes obtenidos se realizó mediante el uso del kit “Sequenase Quick-Denature Plasmad Sequencing“ (Amersham) y dATP α -S³⁵ que está basado en el método de Sanger modificado (ver anexos) .

8.1.8 Extracción de ADN plasmídico

En el caso de las bibliotecas clonadas en el vector VHexpress , se extrajo ADN plasmídico de las bibliotecas y de los controles para las inmunizaciones. La extracción de ADN se hizo mediante el método de lisis alcalina seguida de una purificación fenol/cloroformo.

A partir de una colonia aislada se inocularon 200 mL de medio YT 2X/Cb y se dejó crecer toda la noche a 37°C 250 rpm. Al siguiente día se centrifugó 15 minutos a 5 000 rpm 4°C. El precipitado se resuspendió en 10 ml de solución I (Glucosa 50mM, Tris-HCl 25 mM pH8.0, EDTA 10 mM pH 8.0). Después se añadió 10 mL de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS 10%) y se mezcló suavemente por inversión. Se incubó por 5 minutos a T[°]A. Inmediatamente después se añadió 10 mL de la solución III (Acetato de Potasio 5M pH 4.8) y se mezcló suavemente por inversión. Se incubó en hielo por 15 minutos y se centrifugó 30 minutos a 14 000 rpm 4°C. Al sobrenadante se le añadieron 1.5 volúmenes de isopropanol y se centrifugó 30 minutos a 14 000 rpm 4°C. El precipitado se resuspendió en 600 μ l de H₂O estéril. Se añadió 1 volumen de fenol/cloroformo y se agitó en vortex por 1 minuto. Se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm 4°C y se separó la

fase acuosa. Se añadieron 2 volúmenes de etanol 100% y se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm 4°C. El precipitado se lavó dos veces con 1.5 mL de etanol 70%. El ADN se resuspendió en 400 ml de H₂O/RNAsa (20µg/mL). Se realizó la cuantificación visual del ADN, por medio de electroforesis en gel de agarosa 0.8% con un marcador de peso molecular estándar.

8.2.- Inmunización

Grupos de ratones hembras Balb/c de 4-6 semanas fueron inmunizados intradérmicamente por primera vez con 75 µg de ADN de cada construcción o 1×10^{11} UFC de fagos recombinantes por vía subcutánea e intraperitoneal. Se realizó un refuerzo con las mismas dosis a los 7 días. Cinco días después del refuerzo los ratones fueron sacrificados para el ensayo de proliferación. (Tabla 7).

Tabla 7. Protocolo de Inmunización y ensayo de proliferación celular.		
Día 0	Día 7	Día 12
*Primera inmunización	*Refuerzo	*Ensayo de proliferación de linfocitos T.
*Dosis: 75 µg	*Dosis: 75 µg	
*Intradérmica/Subcutánea	*Intradérmica/Intraperitoneal	

8.3.- Ensayo de Proliferación Celular

Los ratones inmunizados con los diferentes inmunógenos fueron sacrificados 5 días después del refuerzo y sus bazos extraídos para la obtención de esplenocitos como se describe a continuación: los bazos fueron extraídos del ratón mediante cirugía, éstos fueron perfundidos para obtener las células con 5 ml de RPMI y colocados en tubos de 15 ml, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm por 10 min. Al paquete celular se le agregó 1.5 ml de solución de lisis de eritrocitos y se incubó por 5 minutos agitando suavemente, después se agregó 10 ml de RPMI y se centrifugó nuevamente. El paquete se resuspendió en 5 ml de RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de

aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio, 1% de β -mercaptoetanol y 1% de penicilina-estreptomicina, posteriormente se realizó el conteo de células viables (utilizando azul tripano) en un hemocitómetro.

Los cultivos se realizaron colocando 1×10^5 células por pozo y 1×10^{10} UFC de los fagos aislados y secuenciados previamente en un volumen final de 200 μ l. Los cultivos se incubaron por 72 hrs en un incubadora humidificada a 37°C y 5% de CO₂. 16 hrs antes de la cosecha se agregó 0.5 μ Ci de ³H-timidina por pozo. Posteriormente se realizó la cosecha de las placas en membranas de fibra de vidrio y selladas con 10 ml de líquido de centelleo. Se realizó la lectura de la incorporación de timidina en un lector betaplate presentando cuentas por minuto (cpm). Los índices de estimulación se determinaron utilizando la siguiente formula: cpm de células estimuladas con fago/ cpm de células sin estimular.

IX. RESULTADOS

9.1.-Obtención de los inmunógenos y antígenos

Selección de epítomos

Se seleccionaron los epítomos/péptidos ¹⁹⁷AMQMLKETI²⁰⁵ y ³¹⁸RGPGRAFVTI³²⁷ por ser epítomos restringidos a CTL y al haplotipo de ratón H2^d según la base de datos de Inmunología Molecular de VIH del Laboratorio Nacional Los Almos. También se seleccionaron debido a que sus secuencias son iguales en humano y ratón, lo que permitiría una mejor correlación en perspectiva.

Clonación

Para obtener los inmunógenos se clonaron en el vector de expresión VHEXpress para células eucariontes 2 bibliotecas del epítomo Gag (denominadas NGRa y NGRb), 1 biblioteca del epítomo L (denominada VHBL), los epítomos silvestres (denominados NGN y VHP respectivamente) y el vector sin epítomo (denominado VVH). Al ADN extraído de estas clonas se les realizó un PCR para confirmar que presentaran el inserto. Se amplificó con los iniciadores que flanquean toda la región V_H de la cadena pesada. El fragmento es de 327 pb (Fig 15). Una vez confirmadas se extrajo el ADN plasmídico para utilizarlo en las inmunizaciones. Las complejidades obtenidas de las bibliotecas NGRa, NGRb y VHBL fueron de 16000, 9000 y 10 000 respectivamente.

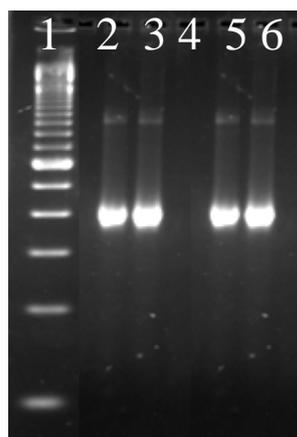


Fig16. Confirmación de clonas positivas de la biblioteca NGRa. En el gel de agarosa se muestra el 10% del producto de PCR , el cual tiene un tamaño de 373 pb. En los carriles 1-5 se muestran las clonas 1-5 y marcador de peso molecular (100pb) en el carril 1.

Se clonaron los fragmentos de ADN que contienen la secuencia que codifica para los epítomos en el fagémido pG8SAET que permitió expresar los péptidos (sin contexto VH) fusionados a la proteína VIII de la superficie de fagos M13 para ser utilizados como antígenos en los ensayos de proliferación celular. En el PCR de confirmación se utilizaron los iniciadores F8 (5´GAGAATGACAACAACCATCGCCACGCATA3´) que se alinea con el vector cerca del sitio de clonación y con el iniciador 5Damp que alinea con el inicio del inserto clonado. En este caso se les denominó Ea y Eb a las bibliotecas Gag y Elv a la biblioteca L, los epítomos silvestres se les denominó Eln y Egn respectivamente. El fragmento esperado es de 204 pb (Fig 16). Se extrajo ADN de cadena sencilla para su secuenciación (Fig 17).

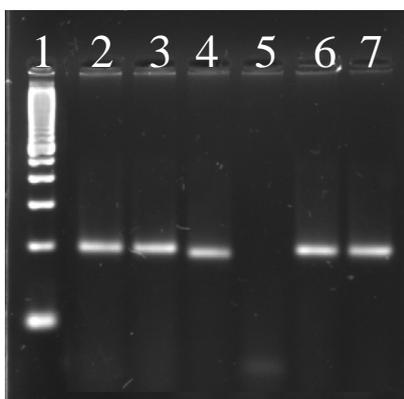


Fig 17. Confirmación de clonas positivas de la biblioteca Ea. En el gel de agarosa se muestra el 10% del producto de PCR , el cual tiene un tamaño de 204 pb. En los carriles 2-7 se muestran las clonas 1-6 y el marcador de peso molecular (100pb) en el carril 1.

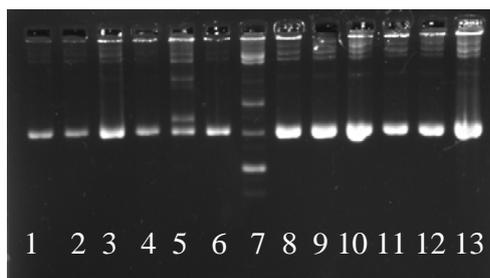


Fig 18. DNA de cadena sencilla. En el gel de agarosa se muestran 2mL del DNAss obtenido de 13 clonas.

9.2.- Secuenciación

Se obtuvieron secuencias de 24 antígenos derivados de las bibliotecas Ea/Eb y 20 antígenos de la biblioteca Elv, además de los controles EgN y Eln. Una vez secuenciados se amplificaron y titularon los fagos recombinantes para ser utilizados en los ensayos de proliferación celular. Los antígenos fueron seleccionados al azar de las bibliotecas de epítomos en fagos antes de la amplificación/rescate de bibliotecas y de esta manera los antígenos fueron excluidos de las bibliotecas usadas para la inmunización de los ratones.

De los antígenos secuenciados de cada biblioteca se obtuvo un 100% de variabilidad (Elv 20/20, Eb 16/16 y Ea 8/8), una característica muy importante y necesaria para los experimentos posteriores.

Al analizar las secuencias de los antígenos aislados al azar de la biblioteca del antígeno L, se observa que el 90% de las mutaciones se encuentran distribuidas a lo largo del epítopo, y en menor proporción (10%) se encuentran clonas con la porción N-terminal mutada (esto debido al uso de los 2 diferentes oligonucleótidos para generar las mutaciones XGXGXAXVXI, RGPGXAXXXX).

Respecto al antígeno Gag se contruyeron dos bibliotecas independientes, se secuenciaron en total 24 antígenos, sin embargo se trabajaron los primeros 20 antígenos aislados, esto es 40% de los antígenos que se utilizaron para estimular los ERI fueron de Ea y el 60% de los antígenos fueron aislados de la biblioteca Eb.

Analizando a grosso modo las secuencias de la biblioteca de L (BFL) se encuentra que el 72% de los antígenos aislados con mutaciones distribuidas a lo largo del epítopo (n=18) presentan aminoácidos hidrofóbicos o sin carga en dichas posiciones.

Con respecto a las secuencias de los antígenos aislados de la biblioteca Eb de Gag (n=15), donde las posiciones 2,4,6 y 9 del epítopo son aminoácidos al azar, se observa que el 80% de las clonas presentan aminoácidos hidrofóbicos o sin carga en las posiciones de anclaje (P2 y P9). En la biblioteca Ea de Gag, donde las posiciones 3, 6, 7 y 8 son aminoácidos al azar, se observa que el 87.5% (n=8) de los antígenos aislados presentan aminoácidos hidrofóbicos o sin carga en dichas posiciones.

Tabla 8. Secuencia en aminoácidos de los antígenos secuenciados.

Antígeno	Secuencia de aminoácidos	Antígeno	Secuencia de aminoácidos
Egn	QAAMQMLKETINE	Eln	RGPGRAFVTI
Eb1.	QAASQFLELETQNE	Elv2.	RGPGGASVLE
Eb2.	QAAFQFLFETFNE	Elv4.	TGIGAAPVCI
Eb3.	QAAFQCLFETANE	Elv6.	DGIGSAGVGI
Eb6.	QAALQILFETINE	Elv7.	RGPGRARLSV
Eb8.	QAAVQLLYETRNE	Elv13.	LGPGSAWVLI
Eb9.	QAAFQLLRETLNE	Elv14.	TGTGTACVSI
Eb10.	QAAAQLLVETINE	Elv15.	FGDGTAGVFI
Eb11.	QAALQTLVETGNE	Elv16.	GGFGGAVVII
Eb12.	QAAYQFLFETVNE	Elv19.	RGLGVAVVVI
Eb14.	QAACQILAETSNE	Elv21.	RCCGSAGVRI
Eb15.	QAACQLLETSNE	Elv22.	YNGWAAVVI
Eb17.	QAAVQFLNETRNE	Elv25.	RGGGGAPVGI
Eb18.	QAASQFLRETFNE	Elv26.	SGECSAGVLI
Eb19.	QAAWQFLFETDNE	Elv27.	DGRGCAAVRI
Eb22.	QAALQRLFETCNE	Elv32.	EGIGCAGVRI
Eb31.	QAAVQLLYETWNE	Elv34.	AGKGGALVQI
Ea10.	QAAMGMLVCVINE	Elv35.	SGGGGAGVGI
Ea6.	QAAMVMLGFVINE	Elv36.	IGGGVAMVMI
Ea11.	QAAMVMLFVFINE	Elv37.	FGDGIAGVFI
Ea7.	QAAMCMLDLVINE	Elv38.	FGDGTAAVFI
Ea8.	QAAMFMLGLGINE		
Ea2.	QAAMLMLQCSINE		
Ea9.	QAAMQMLIVVINE		
Ea5.	QAAMLMLGLQINE		

En los ensayos de proliferación celular se ensayaron diferentes parámetros: 1) número de inmunizaciones, 2) utilización de diferentes inmunógenos (en forma de ADN plasmídico o biblioteca en fago), 3) días de estimulación con el antígeno, 4) número de antígenos no relacionados. Los ensayos se realizaron con el fin de obtener las mejores condiciones para comprobar la hipótesis propuesta.

Con respecto al número de inmunizaciones encontramos que el uso de 1 sola inmunización ya sea con ADN o fagos recombinantes, era el parámetro óptimo, debido a que con dos inmunizaciones el fondo del vector sin epítomo era muy alto.

El tiempo de estimulación con los antígenos fue óptimo a los 3 días debido a que a los 5 días el fondo aumentaba de tal manera que no permitía discernir una amplitud de reconocimiento por parte de los esplenocitos de los ratones inmunizados (ERI) hacia los antígenos.

9.3.- Inmunización

Grupos de ratones hembras Balb/c de 4-6 semanas fueron inmunizados intradérmicamente con 75 µg de ADN de cada construcción (Tabla 9). La inmunización se probó tanto en dosis única como con refuerzo a los 7 días. También fueron utilizados como inmunógenos las bibliotecas de fagos recombinantes que expresan el epítomo/péptido fusionado a la proteína VIII. Esto debido a que en nuestro grupo de trabajo se han realizado inmunizaciones con fagos recombinantes propiciando buenas respuestas tanto humorales como celulares además de prescindir del uso de adyuvantes debido a que los fagos son excelentes inmunógenos. De estos inmunógenos se utilizó una dosis de 1×10^{10} UFC/mL administrada subcutánea e intraperitoneal. También el número de inmunizaciones se probó con este inmunógeno. Los inmunógenos utilizados se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Grupos e inmunogenos utilizados.				
Grupo	Inmunógeno	Epítipo/Péptido	Dosis	Vía
NGRa	ADN	AMXMLXXI	75 µg	Intradérmica
NGRb		AXQXLXETX		
NGN		AMQMLKETI		
VHBL		RGPGXAXXXX, XGXGXAXGXI		
VHP		RGPGRAFVTI		
VVH		s/epítipo		
Ea	Fago recombinante	AMXMLXXI	1x10 ¹⁰ UFC/mL	Intraperitoneal y Subcutánea (alternado)
Eb		AXQXLXETX		
EgN		AMQMLKETI		
Elv		RGPGXAXXXX, XGXGXAXGXI		
Eln		RGPGRAFVTI		
GK1		Epítipo no relacionado GYYYPSPDNTFYAPPYSA		

9.4.- Ensayos de Proliferación celular

Los ratones inmunizados con los diferentes inmunógenos fueron sacrificados 5 días después de la última inmunización y sus bazo extraídos para la obtención de esplenocitos.

La estimulación de los esplenocitos de los ratones inmunizados con los antígenos aislados y secuenciados previamente fue de 3 a 5 días.

Epítipo L

Los esplenocitos de los ratones inmunizados (ERI) una sola vez con la biblioteca L en forma de ADN (VHB-L) y estimulados por 5 días con los antígenos generaron los siguientes resultados : las células muestran un reconocimiento amplio (88% , n=17) contra variantes del epítipo nominal utilizadas como antígenos, además de que no existe reconocimiento contra el control negativo (PNRF), sin embargo el 12% restante mostró

un nivel casi nulo de reconocimiento. Además se encontró un fondo alto de reconocimiento de las variantes por parte de los ERI con el vector sin epítomo (VVH). Los ensayos de proliferación celular de los ratones inmunizados en dos ocasiones mostraron que el nivel de reconocimiento de las variantes aumentó (n=20), y el nivel de reconocimiento de los controles negativos fue menor, pero una vez más se encontró un fondo alto de reconocimiento del vector sin epítomo (información no mostrada).

Se obtuvieron mejores resultados cuando el tiempo de estimulación fue cambiado de 5 días a únicamente 3 días manteniendo las dos inmunizaciones. Este experimento arrojó mejores resultados tales como; el 55% de reconocimiento de las variantes (n=20) por parte de los ERI con biblioteca (VHB-L) y el fondo de reconocimiento por parte de los ERI con vector sin epítomo (VVH) desapareció. Cabe destacar que el reconocimiento de variantes por parte de los ERI con péptido nominal (VHP-L) fue menor (40%) y la intensidad de reconocimiento, aun de estos, fue significativamente menor (Fig.17).

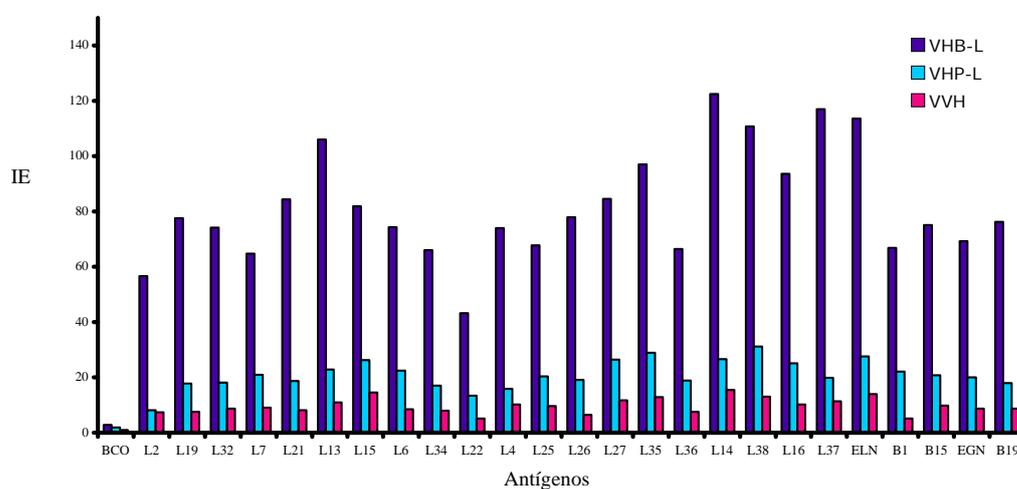


Fig 19. Indices de Estimulación del ensayo de proliferación realizado a los ERI con las diferentes construcciones del epítomo L en forma de DNA. Ratones Balb/c fueron inmunizados (i.d) con dosis de 75mg de ADN en dos ocasiones y sacrificados 5 días después. Los esplenocitos obtenidos (10^5) fueron estimulados por 3 días con los antígenos (fagos recombinantes 10^{10} UFC).

Por otro lado los ERI una sola vez con la biblioteca L en forma de fagos recombinantes (BFL) y con estimulación de 5 días nos muestran un reconocimiento amplio (88% n=17) hacia variantes de epítopo nominal utilizadas como antígenos. Este experimento muestra una estimulación distinta entre los diferentes antígenos variantes: menor en el caso del antígeno L14 y alta en el caso del antígeno L35. Los antígenos variantes no presentan un reconocimiento amplio por los ERI con el epítopo nominal (ELN) y fago no relacionado (PNRF). En este experimento no se encontró reconocimiento de los antígenos utilizados como controles negativos (PNRF, Eb1 y Eb2) (Fig.18).

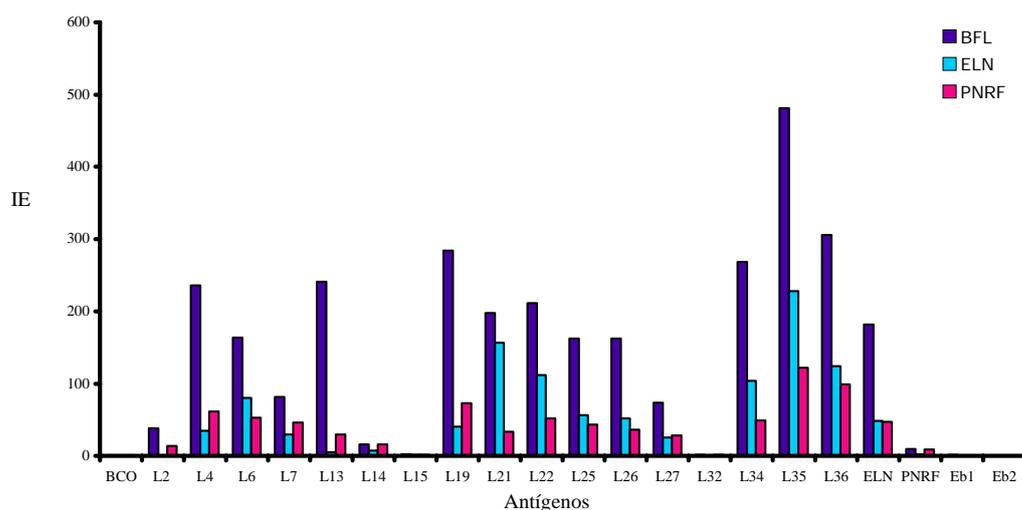


Fig 20. Indices de Estimación del ensayo de proliferación realizado a los ERI con las diferentes construcciones del epítopo L en forma de fagos recombinantes. Ratones Balb/c fueron inmunizados (i.p) con dosis única de 10^{11} UFC/mL y sacrificados 5 días después. Los esplenocitos obtenidos (10^5) fueron estimulados por 5 días con los antígenos (fagos recombinantes 10^{10} UFC).

Los ensayos de proliferación celular realizados a los ERI en dos ocasiones (primer-boost) con los inmunógenos en forma de fagos recombinantes mostró los siguientes resultados: se incrementó el reconocimiento de los antígenos así como se presentó el reconocimiento por parte de algunos que no lo presentaban en el experimento

anterior. Como se puede observar en la Figura 20, todos los antígenos variantes que fueron utilizados presentan un nivel mayor de reconocimiento hacia los ERI con biblioteca (BFL) en comparación a los ERI con el epítipo nominal (ELN) y el péptido no relacionado (GK1). En este experimento se encontró un amplio reconocimiento (65% n=20) de los antígenos variantes por parte de los ERI con biblioteca (BF-L).

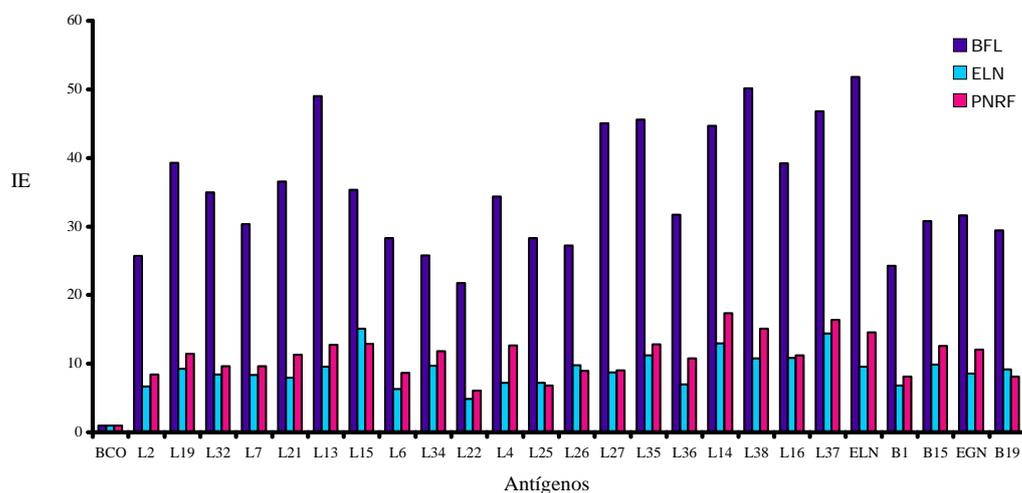


Fig 21. Índices de Estimación del ensayo de proliferación realizado a los ERI con las diferentes construcciones del epítipo L en forma de fagos recombinantes. Ratones Balb/c fueron inmunizados (i.p-s.c) con dosis de 10^{11} UFC/mL en dos ocasiones y sacrificados 5 días después. Los esplenocitos obtenidos (10^5) fueron estimulados por 3 días con los antígenos (fagos recombinantes 10^{10} UFC).

Epítipo Gag

Tomando en cuenta algunos resultados obtenidos previamente con el antígeno L se realizaron experimentos más específicos con el antígeno Gag, con el fin de obtener los mejores resultados. Como se puede observar en el Figura 21 la administración de dos inmunizaciones permite un reconocimiento amplio de las variantes utilizadas por parte de

los ERI con bibliotecas en forma de ADN, ya sea con NGRa (77%) o con NGRb (61%), a su vez también existe un nivel de reconocimiento no específico de los controles negativos aunque en menor proporción en comparación al nivel obtenido por las variantes derivadas de las bibliotecas.

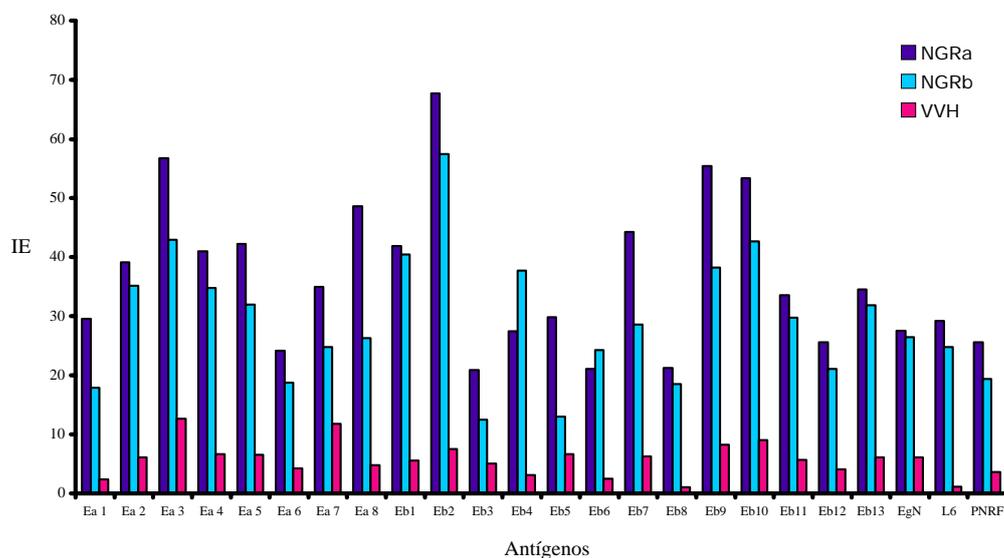


Fig 22. Índices de Estimulación del ensayo de proliferación realizado a los ERI con las diferentes construcciones del epítomo Gag en forma de ADN. Ratones Balb/c fueron inmunizados (i.d) con dosis de 75µg y sacrificados 5 días después. Los esplenocitos obtenidos (10^5) fueron estimulados por 3 días con los antígenos (fagos recombinantes 10^{10} UFC).

X.- DISCUSIÓN

Como se mencionó antes, respecto a vacunas contra VIH se han desarrollado estrategias basadas en los aislados virales más frecuentes en determinada región geográfica y en la construcción de inmunógenos con secuencias consenso o ancestrales de los principales subtipos encontrados en la población⁽⁵⁰⁾. Sin embargo estas estrategias son rebasadas por la alta variabilidad del virus y después del fracaso de vacunas de este tipo, se empieza a discutir que quizá la mejor estrategia para la construcción de una vacuna que contrarreste exitosamente las mutaciones del virus, son aquellas basadas en secuencias variables. Y cabe mencionar que a la fecha no existen datos experimentales sobre este punto.

La oportunidad de escape del virus disminuye si son necesarias múltiples mutaciones para contrarrestar la respuesta inmune, debido a que esto le genera un impacto negativo en su tasa de replicación (*fitness cost*). Por lo que en la generación de una vacuna sería muy útil asegurarse de que la respuesta CTL sea amplia (en contra de varios epítomos), pero además debe tener variabilidad de células T, esto es, evitar la inmunodominancia que es lo que generalmente ejerce la presión selectiva de mutantes y escape del virus. La avidéz del receptor de la célula T (TCR) por el complejo epítomo/HLA puede también tener este efecto (estrechar la respuesta), la competencia entre clonas puede ser un factor determinante en la selección de clonas de CTL, así algunas vacunas enfocadas en generar una respuesta CTL fuerte por cierto epítomo terminan estrechando la respuesta CTL y generando presión selectiva de mutantes⁽⁸⁷⁾.

El trabajo que más se acerca a este concepto es el reportado por Torres y col (1999), en el cual se construye una biblioteca de 10^4 variantes del epítomo gp130 de SIV (equivalente a gp120 VIH) y estas secuencias fueron seleccionadas de un consenso de las secuencias reportadas. El objetivo era producir una respuesta amplia y la posibilidad de que esta biblioteca de péptidos pudiera ser presentada por diferentes moléculas de MHC (se utilizaron cuatro diferentes haplotipos de ratón). En ensayos de proliferación celular se observó que los esplenocitos de ratones de tres de los cuatro diferentes haplotipos inmunizados con la biblioteca de variantes reconocían a la biblioteca y al péptido

nominal, aunque en menor proporción (IE 12-20 y 2-10 respectivamente). Se concluyó que las bibliotecas de variantes pueden ser componentes efectivos en vacunas para ayudar a generar respuesta en aquellos organismos donde no se presenta tal respuesta como resultado de la presentación antigénica restringida por el MHC⁽⁸⁹⁾. Sin embargo en este trabajo no se prueba el reconocimiento de variantes aisladas por los ERI con la biblioteca, únicamente con la biblioteca completa, y el reconocimiento por el antígeno silvestre fue muy débil. Además, esta biblioteca no sería útil en una vacuna contra VIH-1 debido a que se generó únicamente con las secuencias ya reportadas y no cubre todas las posibilidades. Lo que es necesario, es dar un paso adelante y enfrentar la capacidad de mutación del virus, inmunizando con variantes de un epítomo que el virus aún no ha desarrollado y que en un futuro podrían generarse, y que en dado caso serían rápidamente atacadas por el sistema inmune gracias a la inmunización previa con dichas variantes. En este trabajo se desarrolló este concepto al crear un inmunógeno basado en una mezcla de 10^4 diferentes secuencias de un epítomo generadas al azar y no solo las secuencias ya reportadas.

Sin embargo un punto interesante que se consideró es que si bien el uso de diferentes secuencias de varios antígenos puede ampliar la respuesta CTL evitando la presión selectiva de mutantes, también podría generarse antagonismo, y si las variantes son administradas secuencialmente probablemente la respuesta hacia la primera contrarrestará la respuesta hacia las variantes subsiguientes (pecado antigénico original, OAS, *original antigenic sin*)⁽⁸⁸⁾. Esto ha sido comprobado por McMichael y colaboradores (2007) donde se observó que la inmunización con vacunas basadas en mezclas de diferentes epítomos de un solo subtipo de HIV-1 induce una limitada reacción inmune cruzada hacia los otros subtipos de VIH-1, y la inmunización de combinación de estas vacunas, es decir una vacuna multi-subtipos provoca el fenómeno de pecado antigénico original (cuando son inmunizadas secuencialmente), lo que reduce la respuesta inmune contra variantes⁽⁹²⁾.

Un trabajo interesante sobre el efecto del pecado antigénico en la inmunización génica fue el publicado por Barry y colaboradores (2002) en donde se demuestra que al

inmunizar secuencialmente con péptido agonista y antagonista el efecto del OAS en las células T CD8+ se lleva a cabo, pero este efecto no es visto al inmunizar simultáneamente ambos péptidos (agonista/antagonista). Estos datos son consistentes con los resultados que este trabajo generó⁽⁴⁸⁾.

Nuestro trabajo abarca todos estos puntos importantes para desencadenar una respuesta inmune efectiva. La construcción de nuestros inmunógenos se basó en epítomos de VIH-1 restringidos a CTL y a el haplotipo de ratón H2^d (¹⁹⁷AMQMLKETI²⁰⁵ y ³¹⁸RGPGRAFVTI³²⁷).

Con el objetivo de inducir una respuesta inmune amplia al inmunizar con inmunógenos con mutaciones al azar, además de este nuevo concepto también nos apoyamos en el uso de dos metodologías muy útiles, la inmunización génica y la inmunización con fagos recombinantes, teniendo así la comprobación de las ventajas de dos metodologías diferentes de inmunización.

Respecto a la inmunización génica, resultó como se esperaba, una respuesta inmune CTL fuerte contra el epítomo y añadiendo el concepto de mutantes al azar del mismo, también se comprobó que no solo la respuesta es fuerte, también es amplia; diversa en contra de variantes del epítomo silvestre. Sabemos que los resultados obtenidos son muy preliminares y existe la necesidad inmediata de corroborarlos de manera que sean estadísticamente válidos y comprobar que la respuesta esta polarizada hacia Th1 con el uso de diferentes técnicas como la medición de citocinas.

La inmunización con fagos recombinantes fue como se esperaba (sin el uso de adyuvantes), una respuesta inmune fuerte, teniendo los más altos índices de estimulación en los experimentos (incluso comparandolos con otros trabajos realizados en nuestro grupo de trabajo^(90,91)); sin embargo en nuestros experimentos la estimulación de los ERI fue realizada con fagos recombinantes y esto antes no se habia reportado.

El reconocimiento amplio (hasta un 90%) de la ERI con biblioteca por las

variantes aisladas es sumamente alentador, debido a que éstas variantes del antígeno no estaban presentes en la biblioteca con la que se inmunizaron los ratones, por lo que la respuesta CTL generada es amplia. Este resultado nos lleva a pensar que la inmunización de esta mezcla de variantes evitó el antagonismo, el pecado antigénico original y la inmunodominancia hacia el epítopo silvestre, ya que se reconocen múltiples variantes del epítopo.

La utilización de los antígenos no relacionados para corroborar que los ERI con bibliotecas de uno u otro antígeno (L o Gag) reconocen únicamente a los antígenos relacionados con la biblioteca con la cual se inmunizaron los ratones, se fue ampliando, desde la utilización de una hasta 20 (datos no mostrados). En todos estos ensayos, se comprobó que el reconocimiento además de amplio, es específico hacia los antígenos que provienen de la biblioteca inmunizada, y no así con los de otra biblioteca.

Al utilizar ambos inmunógenos se observan resultados muy similares, por lo que podemos decir que nuestra hipótesis, el cual consistía en que el uso de inmunógenos contruídos con múltiples mutaciones generaría una respuesta más amplia y específica contra el epítopo silvestre y variantes del mismo, fue comprobado con 2 inmunógenos diferentes (Gag y L) y en diferentes formas de inmunógenos (base de ADN y fagos).

Una de las observaciones mas discutidas sobre este trabajo es que la inmunización de esta cantidad de variantes podría inducir una respuesta autoinmune. Aunque ninguno de los ratones inmunizados murió en el transcurso de los experimentos, no podemos decir que no se generó una respuesta autoinmune. Respecto a esto hemos considerado experimentar reduciendo el número de variantes y el número de mutaciones dentro del epítopo hasta el punto en donde encontremos los mismos resultados, disminuyendo así el riesgo de generar una respuesta autoinmune.

XI.- CONCLUSIÓN

En este trabajo se construyeron inmunógenos con base de epítomos CTL de VIH-1 con el objetivo de inducir una respuesta inmune amplia con reactividad cruzada. Teniendo en cuenta esto se construyeron 6 bibliotecas en base de dos epítomos CTL, uno derivado del loop V3 de la proteína gp120 (antígeno L) y otro derivado de la proteína p24 Gag de VIH-1 (antígeno Gag).

Estas bibliotecas fueron construidas tanto en el vector plasmídico VHEXpress que nos permitió expresar los epítomos/péptidos en la región CDR3 de una cadena variable pesada de Ig humana (HCDR3-IgV_H), como en el vector pG8SAET fusionadas a la proteína cpVIII del fago M13.

Las complejidades de las bibliotecas fueron desde las 9,000 hasta las 19,000 clonas y las secuencias de los antígenos secuenciados fueron diversas, ya que el 100% de los antígenos seleccionados al azar de cada biblioteca fueron diferentes en secuencia (n=20).

En los ensayos de proliferación celular con los ERI tanto con bibliotecas de L como de Gag, se observó un reconocimiento amplio (70-88%) hacia variantes en comparación con los ERI con epítomo silvestre o vector como control.

El reconocimiento fue específico hacia los antígenos que provienen de la biblioteca inmunizada, y no así con los de otra biblioteca.

Se comprobó que la respuesta generada fue lo bastante amplia como para reconocer diversos antígenos (reactividad cruzada), al enfatizar que los antígenos que se reconocieron no estaban presentes en la biblioteca con la cual fueron inmunizados los ratones.

El concepto, el cual consistía en que el uso de inmunógenos contruídos con

múltiples mutaciones generaría una respuesta más amplia y específica contra el epítomo silvestre y variantes del mismo, fue comprobado con 2 inmunógenos diferentes (Gag y L) y en diferentes formas de inmunógenos (base de ADN y fagos).

Por todos los datos anteriores se concluye que la inmunización con bibliotecas de variantes de epítomos CTL permite aumentar y ampliar la diversidad de células T que reconocen variantes en comparación con la inmunización con construcciones que expresan epítomos nominales. Este acercamiento es de gran importancia para la generación de una respuesta amplia que reconozca variantes que se generan durante el curso de infección natural por algunos patógenos con alta variabilidad antigénica y para la construcción de vacunas.

XII.- PERSPECTIVAS

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo son apenas iniciales y se requieren desde el aumento de animales inmunizados de tal manera que estadísticamente sean significativos, hasta demostrar que estas bibliotecas, las cuales provienen de epítomos restringidos a H2 de Balb/c, pueden inmunizarse en ratones C57 y obtener resultados similares.

Estos resultados deben comprobarse también con ensayos de citometría de flujo para la medición de IFN- γ y citocinas, lo que aseguraría en mayor medida una respuesta polarizada hacia Th1 de los ratones inmunizados con estas bibliotecas.

Todos estos experimentos se realizan al momento que se escribe esta tesis , por que estamos seguros que estos resultados son solo “la punta de un iceberg” y que se alcanzarán resultados mucho más concluyentes y definitivos para demostrar, más que un prototipo de vacuna para VIH-1, un nuevo concepto de construcción de inmunógenos como componentes de vacunas, que alcanzará resolver diferentes problemas de variabilidad antigénica de patógenos y en cáncer.

XIII.- BIBLIOGRAFÍA

1. AIDS Epidemic Update: December 2005.
2. Siliciano RF, 2001. Acquired Immune Deficiency Síndrome (AIDS). Enciclopedia of Life Sciences/Nature Publishing Group.
3. Crandall KA. 2001. Human Immunodeficiency Viruses (HIV). Enciclopedia of Life Sciences/Nature Publishing Group.
4. Holmes E. 2004. The phylogeography of human viruses. *Molecular Ecology*. 13:745-756.
5. McCutchan F. 1998. The Global Spread Of Subtypes and Inter-Subtype Recombinant HIV1. Conference on the Laboratory Science of HIV.
6. Pedersen FS, Mogens D. 2001. Retrovirus Replication. Enciclopedia of Life Sciences/Nature Publishing Group.
7. Wang W, Chen MY, et al. 2000. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *Microbiol Immunol Infect* 33: 131-140.
8. Schwartz S and Nair M. 1999. Current Concepts in Human Immunodeficiency Virus Infection and AIDS. *Clin Diag Lab Immunol*. 6 (3):295-305.
9. Frankel AD, et al. 1998. HIV: Fifteen proteins and RNA. *Annu Rev Biochem*. 67:1-25.
10. Freed EO. 1998. HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251:1-15.
11. Galanakis P, Spyroiliias G, Rizos A, Samolis P. 2005. Conformational Properties of HIV-1 gp 120/V3 Immunogenic Domains. *Current Medicinal Chemistry*. 12 (13): 1551-1568.
12. Zwick M, Saphire E, Burton D. 2004. gp41: HIV's shy protein. *Nature Medicine*. 10 (2): 133-134.
13. Dunn B, Goodenow MM, et al. 2002. Retroviral proteases. *Genome Biology*. 3(4): 3006.1-3006.7
14. Karn J. 1999. Tackling Tat. *J Mol Biol* 293 :235-254

15. Liu Y, Kim BO, Pace BS. 2002. HIV-A Tat protein-mediated transactivation of the HIV-1 long Terminal repeat promoter is potentiated by a novel nuclear Tat-interacting protein of 110kDa, Tip 110. *J Biol Chem.* 277: 23854-23863
16. Pollard V, Malim M. 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbio.* 52:491-532
17. Ranjan S, Jameel S. 2005. Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res.* 121: 315-332.
18. Zhang H, Pomerantz R, Dornadula G. 2000. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Is an Integral Component of an mRNP Complex of Viral RNA and Could Be Involved in the Viral RNA Folding and Packaging Process. *J Virol.* 74 (18): 8252-8261
19. Borman AM, Quillent C, Charneau P, Dauguet C and Clavel F. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vif2 mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J. Virol.* 69: 2058–2067.
20. Montal M. 2003. Structure-function correlatos of Vpu, a membrana protein of HIV-1. *FEBS Letters* 552:47-53.
21. Singh D, Pacyniak E, et al. 2003. The Vpu Protein and its Role in HIV-1 Pathogenesis. *Current Genomics.* 4(4):365-377.
22. Lichterfeld M, Addo MM, Altfeld M. 2005. Regulatory and Accessory HIV-1 Proteins: Potencial Targets for HIV-1 Vaccines?. *Current Medicinal Chemistry* 12 (6):741-747.
23. Freed EO. 2001. HIV-1 Replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics.* 26 (1/6): 13-33
24. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* 34: 233–244
25. Asante-Appiah E, Skalka AM. 1997. Molecular mechanism in retrovirus DNA integration. *Antiviral Research* 36: 139-156.
26. Pluymers W, De Clercq E, Debysers Z. 2001. HIV-1 Integration as a Target for Antiretroviral Therapy: A Review. *Curr Drug Targ-Infect Dis.* 1(2):133-149.
27. Bukrinskaya AG. 2004. HIV-1 assembly and maturation. *Arch Virol* 149:1067-1082.

28. Kaplan A. 2002. Assembly of the HIV-1 Core Particle. *AIDS Rev.* 4:104-111.
29. INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. 2005.
30. El SIDA en cifras, 2006. Secretaría de Salud.
31. Levy J. 1993. Patogénesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiol Reviews.* 57 (1):183-289.
32. Fauci AS and Pantaleo G. 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol.* 50:825-54.
33. McMichael, A.J. 2003. VIH vaccines 1983-2003. *Nat Medicine* 7:874-80.
34. Johnson, R.P, et al.1998.Cellular immune responses to HIV-1. *AIDS* 12: S113-20.
35. Walker B, et al.2002. Immunologic control of HIV-1. *Annu.Rev.Med.*53:149-72
36. Mattapallil, et al. 2005. Massive infection and lost of memori CD4+ T cells in multiples tissues during acute SIV infection *Nature.* 434: 1093-7
37. Montefiori D. 2005. Neutralizing antibodies take a swipe at HIV in vivo. *Nat.Med.* 11(6): 593-4
38. Letvin N y Walker B. 2003. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat. Med.* 7: 861-65.
39. Furci L, Beretta A, et al. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120-specific T lymphocytes provide intermolecular help for anti-CD4 autoantibody production in exposed uninfected subjects.*AIDS Res Hum Retroviruses* 13: 1461-69.
40. Rowland-Jones SL, Dong T, et el. 1998. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J.Clin. Invest.* 102: 1758-65
41. BorrowP, et al. 1994. Virus-specific CD8+ Citotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* Vol. 68: 6103-10
42. Pantaleo et al. 1994. Major expansion of CD8+ Tcells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 370(6489): 463-7
43. Jin X, et al. 1999. Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med.* 189 : 991-98

44. Yang O, et al. 1997. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J. Virol.* 71(4): 3120-8
45. Yang O. 2004. CTL ontogeny and viral escape: implications for HIV-1 vaccine design. *Trends Immunol.* 25(3): 138-42
46. Yokomaku, et al. 2004. Impaired processing and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 78(3): 1324-32
47. Leslie AJ, Pfafferoth KJ, Chetty P, Draenert R, et al. 2004. HIV evolution : CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med.* 10(3): 282-9.
48. Singh RA, Rodgers J, Barry M. 2002. The role of T cell antagonism and original antigenic sin in genetic immunization. *J of Immunol.* 169: 6779-86
49. Yang O, Ali A, Harlow D, et al. 2003. Determinant of HIV-1 mutational escape from cytotoxic T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 197(10): 1365-75
50. Thomson S, et al. 2005. Development of a synthetic consensus sequence scrambled antigen HIV-1 vaccine designed for global use. *Vaccine.* 23(38):4647-57.
51. Koff WC, et al. 2006. HIV vaccine design: insights from live attenuated SIV vaccines. *Nature Immunol.* 7(1): 19-22.
52. Shiver JW y Emini EA. 2004. Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. *Annu Rev Med.* 55:355-72.
53. McMichael AJ. 2006. HIV Vaccines. *Annu Rev Immunol.* 24:227-55
54. Unanue E. 2002. Perspectiva on antigen processing and presentation. *Immunological Reviews.* 185: 86-102.
55. Cresswell. 2005. Antigen processing and presentation. *Immunological Reviews.* 207: 5-7.
56. Elliott T. 2005 The optimization of peptide cargo bound to MHC class I molecules by the peptide-loading complex. *Immunological Reviews.* 207: 89-99.

57. York I and Rock K. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex *Annu. Rev. Immunol.* 14:369-96
58. Pamer E and Cresswell P. 1998. Mechanisms of major histocompatibility complex Class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 323-58
59. Van Endert PM, Tampe R. 1994. A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity.* 1(6):491-500
60. Momburg F, Roelse J, et al. 1994. Peptide size selection by the major histocompatibility complex encoded peptide transporter. *J. Exp. Med.* 1;179(5):1613-23
61. Rammensee HG, Falk K, et al. 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11:213-44
62. Rajagopal D, et al. 2004. Diversity & Overlap in the mechanisms of processing protein antigens for presentation to T cells. *Indian J Med Res.* 120: 75-85
63. Marcus A, Todd M, et al. 2005. The majority of currently circulating Human Immunodeficiency Virus Type I Clade B Viruses Fail to prime cytotoxic T-Lymphocyte Responses against an otherwise Immunodominant HLA-A2 Restricted epitope: Implications for vaccine design. *J. Virol.* 79 (8): 5000-5
64. Kimura Y, Walker C., et al. 2005. Escape mutations alter proteasome processing of MHC Class I-Restricted epitopes in persistent hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 79 (8): 4870-76
65. Jankovic V, Remus K, et al. 2002. T Cell Recognition of an Engineered MHC Class I Molecule Implications for Peptide-Independent Alloreactivity. *J Immunol.* 169 :1887-1892.
66. Sharma A, Kuhns J, et al. 2001. Class I Major Histocompatibility Complex Anchor Substitutions Alter the Conformation of T Cell Receptor Contacts. *J Biol Chem.* 276 (24): 21443-21449.
67. Kersh G, Miles M, Nelson C, et al. 2001. Structural and Functional Consequences of Altering a Peptide MHC Anchor Residue. *J Immunol.* 166: 3345-3354.

68. Vertuani S, Sette A, Sydney J, et al. 2004. Improved Immunogenicity of an Immunodominant Epitope of the Her-2/neu Protooncogene by Alterations of MHC Contact Residues. *J Immunol.* 172: 3501-35
69. Lustgarten J, Domínguez A y Pinilla C. 2006. Identification of Cross-Reactive Peptides Using Combinatorial Libraries Circumvents Tolerante against Her-2/neu-Immunodominant Epitope. *J Immunol.* 176: 1796-1805.
70. Gad M, Jensen T, et al. 2003. MUC1-derived glycopeptide libraries with improved MHC anchors are strong antigens and prime Mouse T cells for proliferative responses to lysates of human breast cancer tissue. *Eur J Immunol.* 33: 1624-1632.
71. Sette A, Sidney J, et al. 2005. Characterization of the peptide-binding specificity of Mamu-A*11 results in the identification of SIV-derived epitopes and interspecies cross-reactivity. *Immunogenetics.* 57: 53-68.
72. Liljeqvist S y Sthal S. 1999. Production of recombinant subunit vaccines: proteina immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnology* 73:1-33.
73. Hasan U, et al. 1999. Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines. *J Immunol. Methods* 229: 1-22.
74. Ulmer J, Wahren B et al. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *TRENDS Mol. Med.* 125: 216-222
75. Zannetti M, Rossi P, et al. 1992. Theoretical and practical aspects of antigenized antibodies. *Immunol. Rev.* 130: 125-150.
76. Xiong S, Gerloni M y Zannetti M. 1997. Engineering vaccines with heterologous B and T cell epitopes using immunoglobulin genes. *Nat Biotechnol.* 15: 882-886.
77. Lunde E, Sandlie I, et al. 2001. Troy-bodies: antibodies as vector proteins for T cell epitopes. *Biomolecular Engineering* 18: 109-116.
78. Musselli C, Zanetti M, et al. 2004. Antigenized antibodies expressing Vb8.2TCR peptides immunize against rat experimental allergic encephalomyelitis. *J Immune Based Therapies and Vaccines* 2(9): 1-12.

79. Lidija P, Roberts A, et al. 1997. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *GENE* 187: 9-18.
80. Santamaria H. 2003. Phage display y su aplicación en el diagnóstico clínico. *Revista de Investigación Clínica* 55(6): 711-718.
81. Smith G y Petrenko V. 1997. Phage Display. *Chemical Reviews* 97(2): 391-410.
82. Keller P, et al. 1993. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *J Virology* 193: 709-716.
83. Veronese F, Willis A, et al. 1994. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *J Mol Biol* 269: 167-172.
84. Scala G, Chen X, et al. 1999. Selection of HIV-Specific immunogenic epitopes by screening random peptides libraries with HIV-positive sera. *J Immunology* 162:6155-6161.
85. Greenwood J, Willis E, et al. 1991. Multiple display of foreigning peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumporozoite protein as antigens. *J Mol Biol* 220: 821-827.
86. Meola A, Delmastro P, et al. Derivation of vaccine from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimitopes displayed on filamentous phage. *J Immunology* 154: 3162-3172.
87. McMichael A. 2006 . HIV Vaccines. *Annu Rev Immunol* 24: 227-255.
88. Klenerman P y Zinkernangel R. 1998. Original antigenic sin imparirs citotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature* 394: 482-485.
89. Torres JV y Meyer D. 1999. Hypervariable epitope construct: a syntetic immunogen that overcomes MHC restriction of antigen presentation. *Mol Immunol* 36(10): 631-637.
90. Manoutcharian K, Terrazas L, et al. 1999. Phage-displayed T-Cell Epitope Grafet into immunoglobulin Heavy-Chain Complemetarity-Determining Regions: an Effective Vaccine Desing Test in Muribe Cysticercosis. *Infection and Immunity* 67(9): 4764-4770.

91. Cano A, Fragoso G, et al. 2001. Intraspleen DNA Inoculation Elicits Protective Cellular Immune Responses. *DNA and Cell Biology* 20(4): 215-221.
92. McMichael A, Larke N, et al. 2007. Combined single-clade candidate HIV-1 vaccines induce T cell responses limited by multiple forms of in vivo immune interference. *Eur J Immunol* 37: 566-577.