



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Inducción de memoria central/efectora en linfocitos T CD8+ mediante
la inmunización con inmunógenos en base a epítomos variables de
VIH en ratones BALB/c**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

(B I Ó L O G O)

P R E S E N T A:

JAIRO ROSAS CARLIN



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. KAREN MANUCHARYAN AIRAPETIAN**

MEXICO, DF

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el instituto de investigaciones biomédicas, UNAM, con la asesoría del Dr. Cesar Pedroza Roldan y bajo la supervisión del Dr. Karen Manucharyan

<p>1. Datos del alumno</p> <p>Autor</p> <p>Nombre</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p> <p>Teléfono</p> <p>Universidad</p> <p>Facultad o escuela</p> <p>Carrera</p> <p>Número de cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno</p> <p>Jairo</p> <p>Rosas</p> <p>Carlin</p> <p>5532014696</p> <p>Universidad Nacional Autónoma de México</p> <p>Facultad de Ciencias</p> <p>Biología</p> <p>302249121</p>
<p>2. Datos del Tutor</p> <p>Grado</p> <p>Nombre</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p>	<p>Dr</p> <p>Karen</p> <p>Manucharyan</p> <p>Airapetian</p>
<p>3. Datos del sinodal 1</p> <p>Grado</p> <p>Nombre</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p>	<p>Dra</p> <p>Ana</p> <p>Flisser</p> <p>Steinbruch</p>
<p>4. Datos del sinodal 1</p> <p>Grado</p> <p>Nombre</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p>	<p>M en C</p> <p>Claudia Lisette</p> <p>Charles</p> <p>Niño</p>
<p>5. Datos del sinodal 1</p> <p>Grado</p> <p>Nombre</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p>	<p>M en C</p> <p>María Elena</p> <p>Munguía</p> <p>Zamudio</p>
<p>6. Datos del sinodal 1</p> <p>Grado</p> <p>Nombre</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p>	<p>M en C</p> <p>Erasmus</p> <p>Martínez</p> <p>Cordero</p>
<p>7. Datos de la tesis</p> <p>Título</p> <p>Numero de paginas</p> <p>Año</p>	<p>Inducción de memoria central/efectora en linfocitos T CD8+ mediante la inmunización con inmunógenos en base a epítomos variables de VIH en ratones BALB/c</p> <p>45</p> <p>2010</p>

Dedicatoria y agradecimientos:

“A Dios por haber puesto en mi camino a todas las personas que ayudaron a mi desarrollo como estudiante y como persona”

“A mi madre, por haber hecho de mi el hombre que soy”

“A mis amigos por haber sido también mis maestros”

“A los amigos que perdí en este camino, algunos por regresar a mi vida y algunos por no verlos más”

“A mi querida universidad por estos años de conocimiento y amistades fructíferas”

“A mis asesores y sinodales por darse el tiempo para darme sus opiniones y comentarios para el mejoramiento de mi trabajo”

“Al Dr. Karen Manucharyan por haberme dado la oportunidad de aprender nuevas cosas”

..... y sobre todo quiero agradecer a tres personas que fueron esenciales en los últimos años:

“Al Dr. Cesar Pedrosa Roldan, por ser un amigo incondicional y sobre todo el mejor maestro que he tenido”

“A la mujer de mi vida por ser ante todo mi amiga y por darme la bendición más grande en mi vida”

“A Carya Elena por ser el motor de mi ser, la luz que guía mi camino cada vez que caigo en la oscuridad y mi razón para mejorar cada día”

“Una vida no tiene sentido si no hay con quien compartirla”

Índice

Contenido	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Biología del VIH	4
3.2. Proteínas, Genes y Ciclo viral	4
3.3. Fases de la infección	7
3.4. Respuesta inmune	8
3.4.1. Respuesta inmune Humoral	8
3.4.2. Respuesta inmune Celular	9
3.4.2.1. Respuesta inmune de células T CD4+	9
3.4.2.2. Respuesta inmune de células T CD8+	11
3.5. Memoria inmunológica	13
3.5.1. Linfocitos B y memoria inmunológica	14
3.5.2. Linfocitos T y memoria inmunológica	15
3.5.3. La memoria inmunológica en el desarrollo de vacunas: ventajas y obstáculos	21
3.6. Anteriores avances del grupo de trabajo	24
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. HIPÓTESIS	26
6. OBJETIVO GENERAL	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
8. RESULTADOS	29
8.1 Proliferación celular	29
8.2 Medición de memoria inmunológica	35
9. DISCUSIÓN	36
9.1 La inmunización con antígenos variables es capaz de desarrollar respuestas específicas	36
9.2 La inmunización con BFL y VHBL es capaz de generar clonas de células específicas que reaccionan pasados 8 meses	37
9.3 La inmunización con BFL es capaz de generar células T CD8+ de memoria efectora	38
10. CONCLUSIÓN	40
11. PERSPECTIVAS	41
12. GLOSARIO Y ABREVIATURAS	42
REFERENCIAS	43

1. RESUMEN

Dentro del desarrollo científico y tecnológico, un punto importante ha sido el desarrollo de vacunas contra patógenos que afecten la salud del ser humano, obteniéndose grandes logros al desarrollar vacunas efectivas que han salvado la vida de muchas personas. Sin embargo, aún existe un sinnúmero de patógenos para los cuales no se han podido desarrollar vacunas efectivas. El principal problema en el desarrollo de vacunas contra patógenos como el VIH, Virus de la Hepatitis B, Virus de la influenza, *Tripanozoma cruzi*, entre muchos otros más, ha sido la capacidad que presentan estos patógenos para adaptarse y evitar las respuestas inmunes del hospedero.

Como es sabido, una vacuna efectiva, además de generar una respuesta inmune favorable, capaz de reconocer al patógeno, debe generar una memoria inmunológica, con el fin de que la respuesta inmune actúe de manera más rápida al encontrarse con el patógeno. Desde este contexto, la memoria inmunológica generada contra patógenos altamente variables como el VIH, puede ser afectada por la introducción de mutaciones en los antígenos del patógeno, que generan fenómenos inmunológicos como el pecado antigénico original (PAO). Desde este punto de vista, varios autores han propuesto que la inmunización simultánea con variantes de antígenos puede contrarrestar el PAO y estimular células de sistema inmune que sean específicas para los antígenos, incluso, influyendo en el desarrollo de células de memoria que generen respuestas inmunes contra las posibles mutaciones que presente un patógeno altamente adaptable en un futuro.

En este caso, se intentó demostrar si la administración de Bibliotecas de epítomos variables (BEV) de una proteína de VIH logra generar células específicas y si se logra desarrollar una memoria inmunológica que pudiera proteger a largo plazo. Los resultados obtenidos, demostraron que la administración de BEVs genera células específicas contra epítomos variables de VIH, así mismo, también se generaron células de memoria que respondieron a largo plazo, demostrándose que la administración de BEVs puede ser de gran utilidad en el desarrollo de vacunas contra patógenos variables para los que hasta ahora no se han desarrollado vacunas utilizando los métodos convencionales.

2. INTRODUCCIÓN

El VIH/SIDA (Virus de la Inmunodeficiencia Humana/Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida) es considerado como un problema en cuanto a salud pública se refiere a nivel mundial. Cada día existen aproximadamente 7 400 contagios, más de la mitad entre jóvenes menores de 25 años (ONUSIDA, 2008). De acuerdo con los datos de ONUSIDA, para 2008 vivían en el mundo 33.4 millones de personas infectadas por VIH. En México, hasta noviembre de 2005, se habían notificado 98 933 casos de SIDA y 180 000 personas vivían con VIH (Valdespino et al., 2007).

Sin duda, la investigación en el ámbito de vacunas que protejan efectivamente de manera preventiva es necesaria. Sin embargo, el desarrollo de vacunas contra este virus resulta difícil, ya que este posee diversas estrategias para escapar de la respuesta inmune del hospedero y hacer ineficaces las estrategias de inmunización. Así mismo, una progresión de la infección con VIH hacia SIDA aumenta las probabilidades de morbilidad y mortalidad por la infección con otros patógenos. Por estas razones, es necesario el desarrollo de tratamientos efectivos contra el virus para evitar la progresión de la enfermedad, y el desarrollo de vacunas para evitar la infección.

Las diversas estrategias del virus para evadir la respuesta inmune hacen inútiles a largo plazo la mayoría de los tratamientos, causando daños prácticamente irreparables en el sistema inmune. La mayor estrategia de evasión inmune que tiene el virus es la enorme capacidad de mutar aunada a sus altas tasas de replicación y recombinación. Esta capacidad hace al virus imperceptible en muchos casos, ya que por selección, escapan aquellas variantes del virus que son resistentes a los tratamientos o a la respuesta inmune. Este escape está relacionado con una serie de fenómenos inmunológicos provocados por la mutación en los epítomos y el consecuente cambio o rearrreglo de los mismos que evitan que las células o los anticuerpos los reconozcan. Los fenómenos inmunológicos tales como el pecado antigénico original (PAO) y el antagonismo son generados cuando se introducen mutaciones en un epítomo original que deriva en variantes similares que pueden ó no ser reconocidas, suprimir la respuesta inmune o competir con otros epítomos mutantes siendo unos más afines que otros a un receptor de células del sistema inmune.

Todos estos fenómenos inmunológicos hacen una compleja red de interacciones entre sí, generando el escape inmunológico de los virus que poseen las mutaciones apropiadas en epítomos clave. El consecuente escape viral inhabilita la respuesta inmune tanto celular como humoral, gastando

en vano los recursos inmunológicos del hospedero y desviando las respuestas hacia blancos que no tendrán efecto directo sobre el virus.

Además de generar respuestas inmunes protectoras, una vacuna apropiada para prevenir la infección por el VIH debe generar una memoria inmunológica (Franchini, G., 2009), esto es la capacidad de que el sistema inmune pueda reconocer antígenos a los cuales estuvo expuesto previamente. En el caso de muchos de los epítomos de algunos virus, se sabe que pueden generar dicha memoria inmunológica, sin embargo, en el caso de epítomos variables como los del VIH no hay reportes previos de que se genere una memoria que pueda ser benéfica a largo plazo. En particular, el desarrollo de linfocitos T citotóxicos de memoria (que son los principales responsables de controlar el VIH) mediante la estimulación con antígenos variables sería una estrategia clave para anticiparse a las mutaciones generadas por el virus.

Sin embargo, todavía queda mucho por hacer en el ámbito de investigación básica, pues el cómo y el por qué de los fenómenos inmunológicos son cuestiones que no están del todo esclarecidas, cómo superar los fenómenos inmunológicos, establecer respuestas inmunológicas efectivas, una memoria apropiada que reconozca patógenos variables son cuestiones clave para el desarrollo de vacunas efectivas, que sólo pueden ser elucidadas del todo comprendiendo las bases de estos fenómenos.

3. ANTECEDENTES

3.1. Biología del VIH

El VIH es un miembro de la familia de los Lentivirus, que producen infecciones crónicas en el hospedero y gradualmente dañan el sistema inmune de este. Tres tipos de Lentivirus han sido caracterizados en primates: el Virus de Inmunodeficiencia en Simios (VIS), en humanos el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) que predomina en todo el mundo y el tipo 2 (VIH-2), primordialmente encontrado hacia el oeste de África e India. El VIH es transmitido por contacto sexual mediante fluidos corporales, contacto con sangre o productos sanguíneos y por transmisión perinatal de la madre al producto. Originalmente fue designado como Virus T Linfotrófico humano (VTLH)-III o Virus Linfadenopático Asociado (Hutchinson, 2001).

El SIDA es producido por el virus del VIH, sin embargo, este es específicamente referido como VIH/SIDA por que otros factores como hormonas como corticosteroides, quimioterapia por cáncer y agentes alquilantes pueden producir sintomatologías asociadas al SIDA. Sin terapia, el VIH puede agobiar al sistema inmune debido a la progresiva destrucción de células T CD4+ (su principal blanco) y de células presentadoras de antígeno, consecuentemente daña las actividades de células B y células T CD8+ (Brown et al., 2005); estos daños al sistema inmune del hospedero resultan en SIDA. La pérdida de células T CD4+ ocasiona el deterioro de las funciones inmunitarias, enfermedades constitutivas, infecciones oportunistas, complicaciones neurológicas, entre otros (Hutchinson, 2001).

3.2. Proteínas, Genes y Ciclo viral

El VIH es un virus esférico de aproximadamente 10 μ m. Posee una cubierta externa compuesta por una doble capa de lípidos con numerosas espículas o proyecciones. Cada espícula está formada por tres moléculas de la proteína gp120 y el mismo número de gp41 embebidas en la membrana. Bajo la membrana se encuentra una capa de matriz proteica alrededor de la cápside. La cápside, de forma cónica, está compuesta por otra proteína: p24. Dentro de la cápside se encuentra el material genético compuesto de dos cadenas de ARN de cerca de 9 200 nucleótidos, varias proteínas como integrasas, una proteasa, ribonucleasa, p6 y p7 se encuentran dentro de la cápside (Hutchinson, 2001; Frankel y Young 1998).

El genoma del VIH codifica 15 proteínas distintas en 9 marcos de lectura (Open Reading Framens). Tres de estos codifican las proteínas precursoras Gag, Pol y Env, las cuales presentan una maduración subsecuentemente en proteínas individuales. Cuatro proteínas de Gag: matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC), y p6; y dos proteínas Env: de superficie o gp120 (SU) y transmembranal o gp41 (TM), son componentes estructurales que forman el núcleo del virión y el exterior de la membrana envolvente respectivamente (Frankel y Young, 1998). El gen *env* es expresado durante la fase tardía de la transcripción viral como la proteína precursora gp160. Durante la formación del virus, gp160 es procesada proteolíticamente por serinoproteasas celulares para generar: el dominio que se acopla a la membrana gp41 y el dominio extracelular gp120. Env es altamente glicosilada durante su estancia en el aparato de Golgi. Tanto gp120 como gp41 están no covalentemente asociadas en la superficie viral formando las espículas triméricas que pueden unirse a las moléculas CD4+ en las células, que son los principales receptores para el VIH (Srivastava et al., 2005).

Las tres proteínas de Pol: proteasa (PR), retrotranscriptasa (RT), e integrasa (IN), proveen las funciones enzimáticas esenciales y son también encapsuladas en la partícula. El VIH codifica seis proteínas adicionales: Vif, Vpr, Nef, Tat y Rev, que proveen funciones de regulación genética, y una última proteína, Vpu, indirectamente asiste en el ensamblaje del virión (Frankel y Young, 1998).

La exposición al VIH es generalmente a través de mucosas, en las que se da como resultado la replicación local del virus dentro de células blanco del tejido mucoso. El establecimiento de la infección es dependiente de que las células blanco expresen la proteína de superficie CD4+ y un receptor de quimiocinas (CCR). Aunque una gran variedad de CCRs pueden servir como correceptor *in vitro*, CCR5 y CXCR4 son los más usados por el VIH *in vivo*, en particular CCR5 casi siempre es el correceptor blanco inicial en la transmisión natural del virus (Douek et al., 2003).

Después del establecimiento de la infección en mucosas, el virus es rápidamente diseminado durante las siguientes dos semanas, incrementando el número de células T CD4+ infectadas en tejidos linfoides locales y distantes incluyendo nódulos linfoides, timo, bazo, y tractos mucosos (Douek et al., 2003). Además de linfocitos T CD4+, otras células son blanco para la infección *in vivo*. Los monocitos y células dendríticas inmaduras son utilizadas para la replicación de cepas monocitotróficas de VIH *in vitro*, por lo que monocitos/macrófagos han sido propuestos como reservorios del virus *in vivo* (Severino et al., 2000).

Después del ataque del virus a la superficie celular (Figura 1), gp120 interactúa con el receptor de quimiocinas CCR5 o CXCR4. La interacción de Env con CD4 induce un cambio conformacional en gp120 y gp41, llevando a la fusión de las membranas celular y viral y liberando la cápside viral en el citoplasma de la célula (Srivastava et al., 2005). El núcleo del virión es entonces descubierto para exponer un complejo nucleoproteico viral, que contiene MA, RT, IN, Vpr, y el ARN. Este complejo es transportado al núcleo, donde el genoma de ARN es transcrito inversamente por la retrotranscriptasa en un ADN dúplex parcial lineal. La integrasa cataliza la integración del ADN viral en el cromosoma del hospedero (provirus) y el ADN es reparado, pudiendo permanecer el provirus latente por mucho tiempo (Frankel y Young, 1998). A partir del genoma viral integrado al genoma del hospedero, los transcritos virales son expresados a mediante la activación del promotor localizado en la secuencia larga repetitiva terminal del extremo 5' (LTR), con Tat reforzando mayormente la transcripción (Frankel y Young, 1998). Los genes no son expresados hasta que las copias de ARN son formadas por la maquinaria transcripcional del hospedero. Una vez hechas las copias complementarias de cadenas de ARN, algunas de las cadenas son procesadas por enzimas celulares llevando a cabo el splicing a lo largo de las cadenas de ARN apropiadas para la síntesis de proteínas. Estas cadenas de ARN sirven como mensajeros de ARN, produciendo las proteínas regulatorias necesarias para la producción del VIH. Las cadenas de ARN que no sufrieron splicing formaran las nuevas cadenas virales (genoma de ARN o genes estructurales) y migraran fuera del núcleo hacia el citoplasma. Hasta entonces, dos nuevas clases de ARN fueron producidas: las cadenas largas sin splicing de 9 749 bases que comprenden el genoma de ARN y los transcritos de longitud media (splicing simple) de cerca de 4 500 bases que codifica la estructura del VIH y enzimas (Hutchinson, 2001). Los ARNm virales son traducidos en el citoplasma, y las poliproteínas Gag y Gag-Pol empiezan a localizarse en la membrana celular. Las partículas del núcleo son ensambladas a partir de las poliproteínas gag y gag-pol, vif, vpr, nef y el ARN genómico, y un virión inmaduro está listo para gemar en la superficie celular. Para proporcionar las proteínas SU y TM al exterior de la membrana de cada nuevo virus, la proteína Env debe primero ser desprendida del complejo con CD4 de origen celular que es coexpresado con Env en el retículo endoplásmico. Vpu asiste este proceso promoviendo la degradación de la molécula CD4. Env es entonces transportado a la superficie celular, donde de nuevo debe ser prevenido de ligarse con CD4. Nef promueve la endocitosis y degradación de CD4 de la superficie. Después de gemar, el virión maduro esta ahora listo para infectar la siguiente célula.

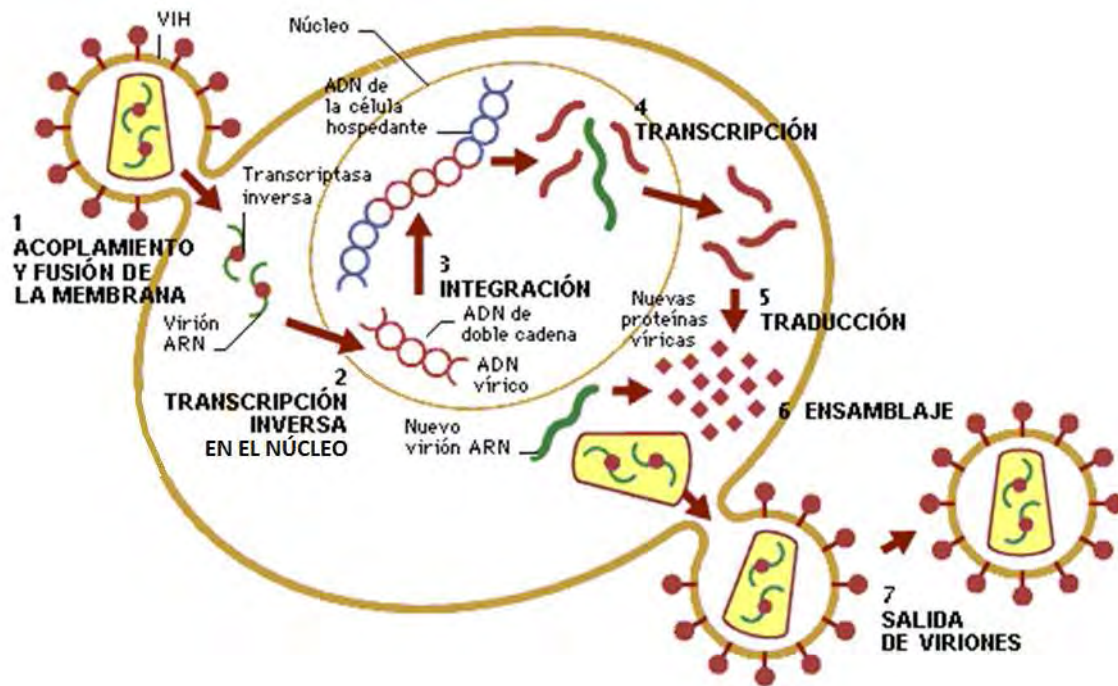


Figura 1– Ciclo viral del VIH. Después de la interacción entre las moléculas de superficie del virus y los receptores celulares, el virus entra y libera su material genético, transformándolo en ADNc e integrándolo al genoma celular. Subsecuentemente se transcribe y traduce formando las proteínas y el genoma viral de nuevos viriones que se ensamblan y geman fuera de la célula.

3.3. Fases de la infección

El VIH infecta linfocitos T CD4+ principalmente, resultando en su depleción. Debido a la destrucción de las células CD4+, la infección con el VIH ocasiona inmunodeficiencia e incapacidad del sistema inmune para contener el virus en la mayoría de los individuos (Gandhi y Walker, 2002). El curso clínico de la infección con el VIH incluye tres fases: infección primaria, latencia clínica, y la enfermedad definida como SIDA. La tasa de progresión de la enfermedad puede ser sustancialmente diferente entre individuos infectados con el VIH debido a diversos factores. Un fuerte estallido de la viremia (mayor a 10^7 copias de ARN viral por mililitro de plasma) y altos niveles de expresión viral y de copias de ADN viral en la periferia de células mononucleares son asociados con la infección primaria. Durante la infección primaria, el estallido de la viremia ocurre diseminando el virus a los órganos linfoides. Una potente respuesta inmune sucede sustancialmente, pero usualmente no por completo, haciendo breve la replicación del virus. Esta incapacidad del sistema inmune de eliminar completamente el virus permite el establecimiento crónico y la infección persistente que al final ocasiona una profunda inmunosupresión ocasionando el SIDA (Pantaleo y Fauci, 1995).

3.4. Respuesta Inmune

3.4.1. Respuesta Inmune Humoral

Una fuerte respuesta inmune humoral y celular específica contra el VIH es detectada muy temprano durante la infección primaria. Esta respuesta contribuye a la supresión del estallido inicial de replicación viral (Pantaleo y Fauci, 1995).

En las primeras etapas de la infección, anticuerpos anti-VIH son encontrados rara o nulamente; sin embargo, durante el periodo de seroconversión (periodo en el cual se empiezan a producir anticuerpos específicos contra algún antígeno), altos títulos de estos anticuerpos son encontrados coincidentes con el pico de viremia (Pantaleo y Fauci, 1995). No obstante, gran parte de los anticuerpos contra el virus puede ser dirigidos contra vestigios virales, pudiendo no ejercer un efecto antiviral fuerte (Gandhi y Walker, 2002).

Los anticuerpos funcionales son conocidos como anticuerpos neutralizantes y son capaces de neutralizar los virus infecciosos previniendo o controlando la replicación viral (Srivastava et al., 2005). Los anticuerpos neutralizantes son definidos mecánicamente por su habilidad de bloquear la entrada viral en las células, ligarse al complemento o promover citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Ferrantelli y Ruprecht, 2002).

Se sabe que los anticuerpos participan de diferentes maneras en la prevención de la infección por el virus (Figura 2), como lo es la inhibición de la interacción de Env con los receptores y correceptores celulares. También se pueden prevenir otros eventos después del ataque viral como la formación de membranas de fusión entre el virus y la célula hospedera, desensamble del virus en el citoplasma, transcripción o ensamble del virus y gemado. Otro mecanismo de protección es la agregación de partículas virales mediada por anticuerpos que reduce el número de partículas virales infecciosas y hace al virus más susceptible a la fagocitosis y eliminación. La unión de anticuerpos puede ejercer funciones protectoras mediadas por Células Citotóxicas Dependientes de Anticuerpos (ADCC), como las células Asesinas Naturales (Natural Killer o NK). En este caso, los anticuerpos actúan como un puente entre el receptor Fc (FcR) en las células y otras células infectadas con el VIH o que pasivamente han absorbido proteínas Env en su superficie (Zolla-Pazner, 2004; Srivastava, et al., 2005).

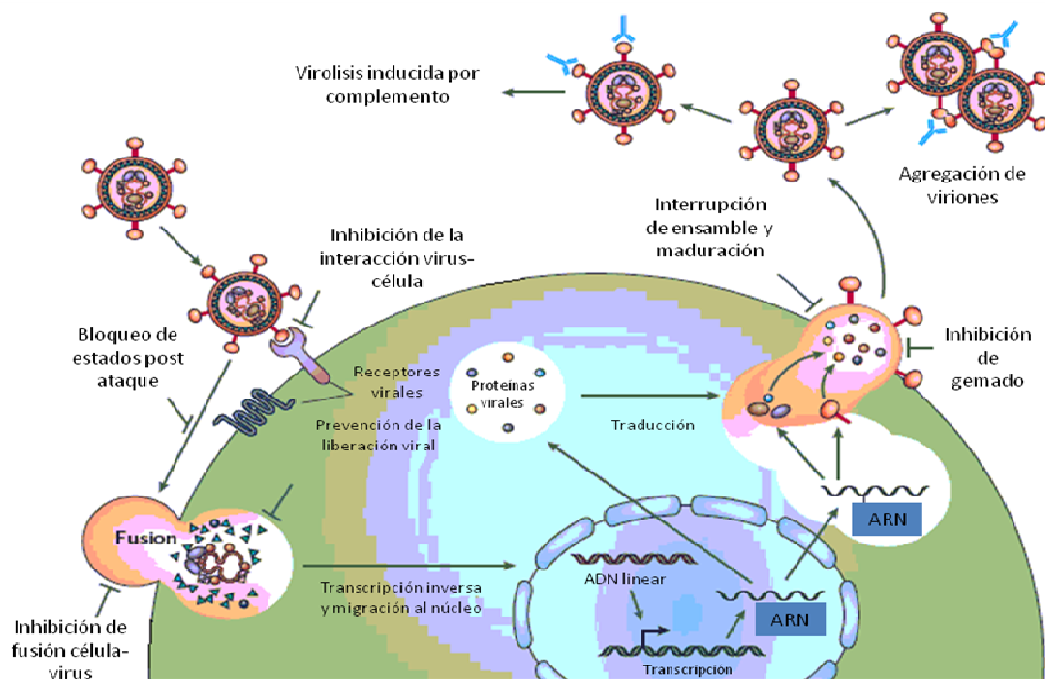


Figura 2– Papel de los anticuerpos neutralizantes en el ciclo del VIH. Los anticuerpos neutralizantes pueden influir negativamente en varios pasos del ciclo viral del VIH, por ejemplo la interacción del virus con sus receptores, la fusión de las membranas viral y celular y la maduración y gemación del virus (tomado de Zolla-pazner, 2004).

3.4.2. Respuesta Inmune celular

3.4.2.1. Respuesta de células T CD4+

La patogénesis por el VIH es probablemente el resultado de una compleja interacción entre el virus y el sistema inmune, particularmente el mecanismo responsable de la homeostasis y regeneración de células T (Douek et al., 2003). La característica de la infección por el VIH es la depleción progresiva de células T CD4+. Se conoce que al principio de la infección, células T CD4+ antígeno-específicas son depletadas y se pierden, sin embargo, algunos pacientes con progresión muy lenta de la infección retienen la actividad de células T CD4+ antígeno-específicas. En pacientes progresores, el deterioro de células T CD4+ cooperadoras contribuye a la pérdida de la función de células T CD8+, las cuales contribuyen en el control de la infección (McMichael et al., 2000). En la fase tardía (SIDA), esta depleción es también asociada con un declive en la actividad de linfocitos T citotóxicos (LTC). Sin embargo, incluso en los estados tempranos de la infección crónica, se presentan defectos en la función de las células T CD4+. De hecho, el efecto más adverso en muchas personas infectadas es la pérdida selectiva de células T cooperadoras (T helper). Diversos estudios en animales y humanos han sugerido que las respuestas de células cooperadoras son necesarias para mantener la actividad de LTC, es por

eso, que la pérdida de estas células en pacientes con infección crónica por VIH puede explicar porque el sistema inmune no puede controlar el virus a pesar de la presencia de LTC. Se ha observado que en pacientes con infección crónica hay una correlación entre el nivel de viremia y el nivel de respuesta en células CD4+. Pacientes con alta respuesta de células CD4+ (que están asociadas con fuertes respuestas de LTC) tienen niveles de viremia bajos, mientras que pacientes con baja respuesta de CD4+ tienen altos niveles de viremia. Así, las células CD4+ pueden coordinar la respuesta inmune contra el VIH, al menos en parte por el mantenimiento efectivo de las funciones de LTC. Por lo tanto, el control inmunológico de la viremia puede depender de una fuerte respuesta de CD4+ y LTC (Gandhi y Walker, 2002).

Se conoce pobremente como, *in vivo*, el virus destruye las células T CD4+ o si la pérdida celular es debida a la destrucción directa por el virus o por otros medios indirectos. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la depleción de las células T CD4+ mediada por el VIH. Así, las células T CD4+ totales en el cuerpo pueden ser depletadas debido a que son destruidas o a que su producción es dañada. En suma, la proporción de células circulantes puede decrecer si la infección viral se redistribuye fuera del espacio intravascular y en los confines de los órganos linfoides. Alternativamente, las respuestas fisiológicas a la infección por VIH pueden iniciar eventos que resultan en la destrucción de células no infectadas. En este caso la pérdida de células puede ser compensada por el incremento en la producción de nuevas células y la maduración de células T CD4+, sin embargo, también puede haber daño en la producción de nuevas células (McCune, 2001).

La pérdida progresiva de células T CD4+ no puede ser atribuida del todo a la infección con VIH, muchas células T CD4+ son perdidas al principio del ciclo de infección cuando estas células expresan proteínas virales que sirven como blanco para LTC. También puede ocurrir apoptosis en células no infectadas mediante la expresión de Fas-ligando que promueve la lisis. La expresión de Fas-ligando en células T puede ser inducida por las proteínas Tat y nef de VIH. Así mismo, la destrucción de linfocitos T CD4+ no infectados puede ser también el resultado de la activación parcial por gp120 libre (McMichael et al., 2000).

Algunas de las causas de destrucción de células T CD4+ maduras pueden ser por: la destrucción directa (apoptosis mediada por la envoltura, arresto y apoptosis por la influencia de vpr, ruptura de la membrana celular y formación de sincicios, y acumulación de ADN viral no integrado) o inducción indirecta de muerte celular en células no infectadas (Citólisis por células T citotóxicas VIH específicas o

por células asesinas naturales, reacciones autoinmunes de naturaleza humoral o celular, incorporación en sincitios por unión con células infectadas, refuerzo de la transmisión del VIH y/o apoptosis seguida de la interacción con células presentadoras de antígeno infectadas cercanas) (McCune, 2001).

3.4.2.2. Respuesta de células T CD8+

Los linfocitos T citotóxicos restringidos a el Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I (CPH-I) son un importante medio de defensa por parte del hospedero en contra de muchas infecciones virales. Esto es evidencia de que en el caso de infección con el VIH, los LTC son un elemento clave de la respuesta inmune del hospedero para el retardo de la progresión de la enfermedad, disminución de la viremia en la fase aguda de la infección, y control del virus en plasma. La cinética y las características generales de la respuesta de LTC en la infección por VIH son similares a otras infecciones virales persistentes en humanos (Yang et al., 1996; McMichael et al., 2000; Severino et al., 2000).

Las respuestas inmunes mediadas por células específicas para VIH son detectadas muy temprano durante la fase aguda y se caracterizan por un gran incremento en el número de linfocitos T CD8+ que pueden elevarse cerca de 20 veces del rango normal (200-600 células por μ l de sangre) (Pantaleo y Fauci, 1995). Durante la infección crónica es común encontrar entre 0.1% y 1% del total de células T CD8+ en sangre que son específicas para epítomos inmunodominantes del VIH (McMichael et al., 2000).

Los LTCs encontrados durante la infección por el virus se caracterizan por que expresan el antígeno de superficie CD8, poseen gránulos con proteínas líticas como perforinas y granzimas, están restringidos al CPH-I y reconocen una variedad de epítomos de proteínas reguladoras y estructurales de VIH (Walker, 1993). En pacientes infectados con VIH en etapa aguda se ha observado una expansión oligoclonal de células T CD8+. Algunas de las expansiones constituyen arriba del 50% de todas las células T CD8+. Muchas de las células en expansión mueren por apoptosis, sin embargo, una pequeña proporción de clonas sobrevive como células de memoria, aunque otras clonas que no se expandieron pueden contribuir al pool de células de memoria que subsecuentemente formaran la respuesta de LTC (McMichael y Phillips, 1997).

La actividad citotóxica de los LTCs virus específicos es correlacionada temporalmente con la disminución de la viremia durante la infección primaria. El declive de esta respuesta antiviral coincide

con la progresión de la enfermedad, se ha descrito que individuos seropositivos con progresión lenta presentan una vigorosa y amplia respuesta de LTC VIH específicos (Yang, 1997).

Los linfocitos T CD8+ pueden contribuir a la disminución de la viremia mediante la eliminación de células que expresan el virus (Pantaleo y Fauci, 1995). En el caso de los LTC se ha demostrado previamente que las clonas de LTC específicas para el VIH pueden mediar potentes efectos antivirales *in vitro*, suprimiendo la replicación viral a través de mecanismos citolíticos directos así como mediados por factores solubles. Esta actividad es dependiente de la activación específica del receptor de células T (Severino et al., 2000). Los LTC específicos pueden lisar células infectadas por el VIH mediante el reconocimiento de péptidos virales en la superficie celular en complejo con moléculas del CPH-I. Los LTC pueden eliminar células infectadas antes de que nuevos viriones sean producidos, demostrándose su actividad antiviral (Walker, 1993).

Adicionalmente, las células CD8+ incluyendo los LTC pueden inhibir la replicación del virus mediante la secreción de β -quimiocinas, factores solubles que se adhieren a los correceptores de VIH en la superficie de las células T CD4+ y bloquean la entrada del virus. Los factores inhibidores derivados de LTC incluyen MIP1- α , MIP1- β y RANTES. Estas β -quimiocinas se encuentran en algunos gránulos que contienen proteínas citolíticas, y son liberadas por los LTC antígeno-específicos cuando ocurre el encuentro del CPH con el antígeno apropiado. Las quimiocinas pueden también promover la actividad citolítica de los LTC (Gandhi y Walker, 2002; Yang et al., 1997). Las citocinas producidas por linfocitos CD8+ incluyen INF- γ , TNF- α , IL-4 y linfotóxina. Muchas de estas han mostrado la habilidad de suprimir la replicación del VIH en cultivos celulares (Walker, 1993). Se ha demostrado que la respuesta de citocinas durante la infección primaria es dominada por un claro pico en la expresión de INF- γ . La expresión de INF- γ y TNF- α resultan importantes por tener un efecto sobre la eliminación viral, como sucede en el caso del virus de la hepatitis B (Pantaleo y Fauci, 1995).

Los LTC también tienen gran importancia en el control de la viremia en las células que sirven como reservorio del virus o que son responsables del estallido inicial de la viremia. En la infección primaria con VIH, las células dendríticas en áreas periféricas (por ejemplo superficies mucosas) transfieren el VIH a células T CD4+ en los nódulos linfáticos regionales durante el proceso normal de migración y presentación de antígenos. Los sitios de encuentro de células dendríticas y células T son conocidos por ser sitios de alta replicación viral, por estas razones se piensa que las células dendríticas

podrían ser las responsables de la diseminación inicial del virus a las células T CD4+ y otros reservorios celulares. Por esto, la capacidad de los LTC de suprimir la replicación viral en células dendríticas y monocitos podría ser un importante prerrequisito para prevenir y controlar la infección *in vivo* (Severino et al., 2000).

3.5. Memoria inmunológica

La memoria inmunológica es, sin duda, uno de los avances evolutivos más efectivos en los vertebrados, pues combina la eficacia de las respuestas inmunes con la virtud de “recordar” elementos de un patógeno. Este proceso de “recordar” patógenos provee protección durante un reencuentro con el mismo patógeno, anticipando las respuestas y generándolas más rápido con el fin de eliminar al patógeno.

Muchos autores están de acuerdo que la memoria inmunológica es ilustrada por el hecho de que un hospedero una vez infectado, y que ha montado una respuesta inmune sobreviviendo a la infección, está protegido más eficientemente contra infecciones posteriores. De acuerdo con una mayor rapidez y mayor potencia de las respuestas exhibidas en el hospedero que ya se ha encontrado con algún antígeno en ocasiones anteriores, la memoria inmunológica es considerada como reflejo inmunológico ante el reencuentro con el mismo antígeno (Zinkernagel et al., 1996).

Algunas características no excluyentes, han sido utilizadas para definir la memoria. Por ejemplo, la memoria es el resultado del incremento de células T o B específicas que se encuentran en descanso después de una activación por el encuentro con un antígeno, manteniéndose, entonces, en un estado de antígeno independencia. También representa una cualidad especial de linfocitos específicos situados en el camino entre los linfocitos vírgenes y el estado efector. De acuerdo a esta propuesta tipo X-Y-Z, X son las células no inducibles o vírgenes, Y son las células de memoria semi-inducibles, y Z son las células efectoras totalmente diferenciadas, la vida neta de las respectivas variedades de células difiere, y las células Y viven considerablemente más que las células Z. La memoria, también representa elevadas frecuencias de activación de linfocitos específicos; las elevadas frecuencias son mantenidas por la activación de las células mediante las infecciones recurrentes que involucran persistencia de antígenos con reactividad cruzada, resultando en un nivel equilibrado de inducción de células efectoras específicas (Zinkernagel, R. M., et al., 1996).

Las células de memoria, como cualquier otra célula específica se diferencian por la expresión de proteínas, en este caso proteínas de membrana, que son características de cada población. Sin embargo, sólo pocas moléculas pueden diferenciar células de memoria de células efectoras activadas. Parte del problema es la considerable heterogeneidad de las poblaciones de células de memoria y el hecho de que muchas células en el cuerpo son enmascaradas haciéndose pasar por células de memoria pero no han pasado a través de un programa de diferenciación de células de memoria. Por ejemplo, se conoce que CD44 es un marcador de memoria antigénica, diferenciado de otros marcadores que pueden estar relacionados con una pseudomemoria (Welsh, 2004).

3.5.1. Linfocitos B y memoria inmunológica

Durante la generación de células B de memoria, las células T cooperadoras regulan el desarrollo de las células B que culmina en la producción de células B antígeno específicas de memoria, por lo que el desarrollo de células B de memoria está fuertemente ligado al desarrollo de células T cooperadoras de memoria. El reconocimiento de un péptido presentado en CPH clase II por medio de una célula presentadora de antígeno activada es crítico para la efectiva selección de células T cooperadoras, expansión clonal y desarrollo de funciones efectoras de células T cooperadoras. Las interacciones entre células T cooperadoras efectoras y células B, entonces, promueve el desarrollo de células plasmáticas de vida corta o de centros germinales. Estos centros germinales se expanden, diversifican y seleccionan variantes de alta afinidad de células B antígeno específicas para la entrada dentro de compartimientos para células B de memoria de vida larga. Bajo un reencuentro antigénico, las células B de memoria rápidamente se expanden y se diferencian en células plasmáticas bajo el control de células T cooperadoras de memoria (McHeyzer-Williams y McHeyzer, 2005; Parslow et al., 2002).

Todos los eventos que ocurren durante el reencuentro antigénico transcurren en un lapso de tiempo relativamente corto en comparación con una respuesta inmune humoral primaria, pues ya existen células específicas para algún antígeno y no se gasta tiempo en la producción de células específicas para dicho antígeno, por lo tanto, esto se conoce como respuesta inmune humoral secundaria. En comparación, la respuesta inmune humoral primaria es más tardía, efectuándose la producción de anticuerpos alrededor de 5 a 10 días después de la infección, y siendo estos menos afines y más escasos. Contrastando con esto, la respuesta inmune secundaria se caracteriza por una mayor

rapidez en la respuesta, produciéndose de 2 a 5 días, y con una afinidad por el antígeno más intensa (Parslow et al., 2002).

3.5.2. Linfocitos T y memoria inmunológica

La generación de memoria de linfocitos T suele ser muy similar a la formación de memoria en linfocitos B. En particular, en linfocitos T CD8+, durante el transcurso de una infección se generan clonas de estas células que son específicas para algún antígeno perteneciente al patógeno, pasado el proceso de infección primaria, las clonas de células específicas que sobrevivieron pueden formar lo que será parte de la memoria central. Dicha memoria central se caracteriza por ser un reservorio de células específicas para algún antígeno que ante una reinfección tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse en células de memoria efectora. Estas células de memoria efectora cuentan con las mismas características de especificidad antigénica, más sin embargo, también pueden contar con funciones efectoras y actividad citotóxica (Duton et al., 1997; Stemberger et al., 2007).

Dentro de las poblaciones de células T CD8+ la respuesta de LTC en infecciones agudas puede ser dividida en tres fases (Figura 3). Durante la fase efectora o de expansión, los precursores de LTC específicos para cualquier antígeno en particular cubren un rango de 1 en 100 000 células, estos precursores cuando son expuestos a un antígeno, sufren una expansión súbita dividiéndose como mínimo entre 15-20 veces e incrementando su número por arriba de 50 000 veces, adquieren funciones efectoras, viajan a los sitios de la infección y median la eliminación de los patógenos intracelulares por la eliminación de células infectadas. Durante la fase de contracción, muchos LTC efectores mueren por apoptosis, sobreviviendo sólo de 5 a 10% de las células generadas durante el encuentro antigénico original como células de memoria de vida larga o de memoria central. Durante la fase de mantenimiento de la memoria, los LTC de memoria central son mantenidos en niveles estables a lo largo de la vida en ratones y durante muchos años en humanos. Los LTC proveen protección contra la reexposición al mismo patógeno que los activo ya que tienen la habilidad de controlar una exposición secundaria a un antígeno debido a su incremento en frecuencia, la rápida adquisición de funciones efectoras y la localización en sitios periféricos al sitio de infección. Después de una re exposición y pasado el encuentro antigénico, las células T CD8+ de memoria central sufren un periodo de proliferación y expansión. La repetida estimulación de células T CD8+ con un antígeno puede inducir rondas sucesivas de división. Bajo este escenario, la continua diferenciación y expansión de células T CD8+ es

dependiente de encuentros secuenciales con el antígeno. Por otro lado, un encuentro relativamente corto con el antígeno puede dirigir a las células T CD8+ a un programa de proliferación y diferenciación en células T_{ME} sin la continua necesidad de un estímulo antigénico. Dentro de estas condiciones, la calidad y el contexto de la señal original puede impactar a largo término el destino de las poblaciones de LTC subsecuentes (Williams y Bevan, 2007).

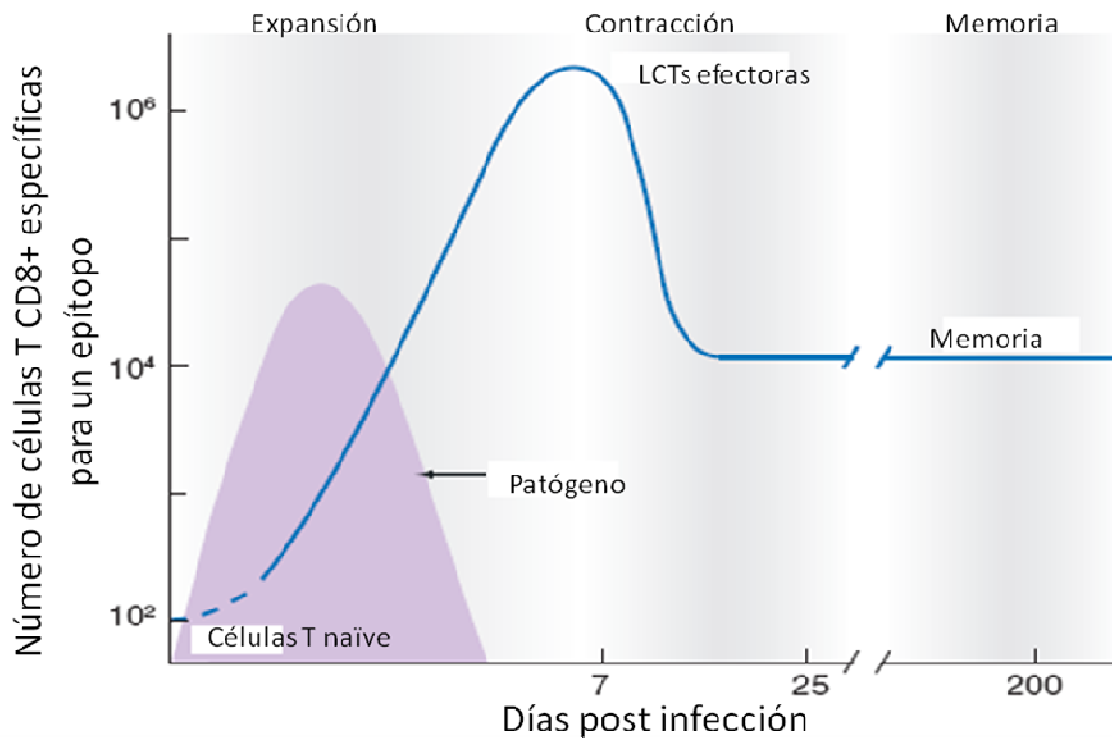


Figura 3– Generación de LTC de memoria. Se distinguen tres fases características en la generación de LTC de memoria, la expansión, contracción y memoria. (tomado de Williams y Bevan, 2007)

En el caso de las células T CD4+, bajo estimulación antigénica, las células T “naïve” precursoras pueden entrar en un programa de diferenciación Th1 o Th2, que involucra la expresión coordinada de genes que controlan la adhesión y migración hacia ciertos tejidos, y las funciones efectoras. Las señales emitidas por el receptor de células T (RCT) y por los receptores de IL-4 o IL-12 actúan en sinergia para inducir factores de transcripción específicos que median eventos de remodelamiento de la cromatina en genes blanco. En particular en la diferenciación de las células Th1 y Th2, T-bet y GATA-3 inducen modificaciones en histonas y metilación del ADN en los genes de INF- γ e IL-4, respectivamente, incrementando la accesibilidad de la maquinaria transcripcional. Otros genes característicos de células T_{ME}, como los receptores para quimiocinas inflamatorias o perforina, parecen ser controlados por eventos similares de remodelamiento de la cromatina. Las acetilaciones de histonas en un locus pueden ser heredadas por medio de la mitosis y pueden contribuir al mantenimiento de estados específicos de actividad de genes de una generación a la siguiente. Las células circundantes T_{ME} CCR5+ y CRTh2+ muestran modelos y niveles de acetilación de histonas en genes de citocinas característicos en cultivos *in vitro* de células Th1 y Th2, mientras las células T_{MC} tienen un estado de acetilación similar a las células T naïve (Sallusto et al., 2004).

Debido a que la estimulación del RCT y los receptores de citocinas son eventos estocásticos, no todas las células T en proliferación reciben las señales con la misma fuerza. Consecuentemente, las células T expuestas por primera vez a un antígeno desarrollan una variedad de estados de diferenciación que contienen células efectoras así como células que han sido arrestadas en niveles intermedios de diferenciación. Estos niveles intermedios retienen receptores de adhesión y migración a nódulos linfáticos e inician, pero no completan, eventos de remodelamiento de genes involucrados en funciones efectoras. Este espectro de estados intermedios de diferenciación puede ser resuelto en dos distintas subpoblaciones de células T_{MC} y T_{ME} que sobreviven después de la eliminación del estímulo antigénico. Sumada al papel que juegan las citocinas, la fortaleza de la señal enviada por el RCT es el mayor factor que determina la diferenciación de las células T (Figura 4). La fuerza de la señal que reciben las células T puede variar en magnitud dependiendo no sólo de la concentración del antígeno y de las moléculas coestimuladoras (determinantes para la tasa de activación del RCT y la amplificación de las señales), sino también de la duración de la interacción entre las células T y las células presentadoras de antígenos (CPA) (determinan la duración de la señal) (Sallusto, F., et al., 2004).

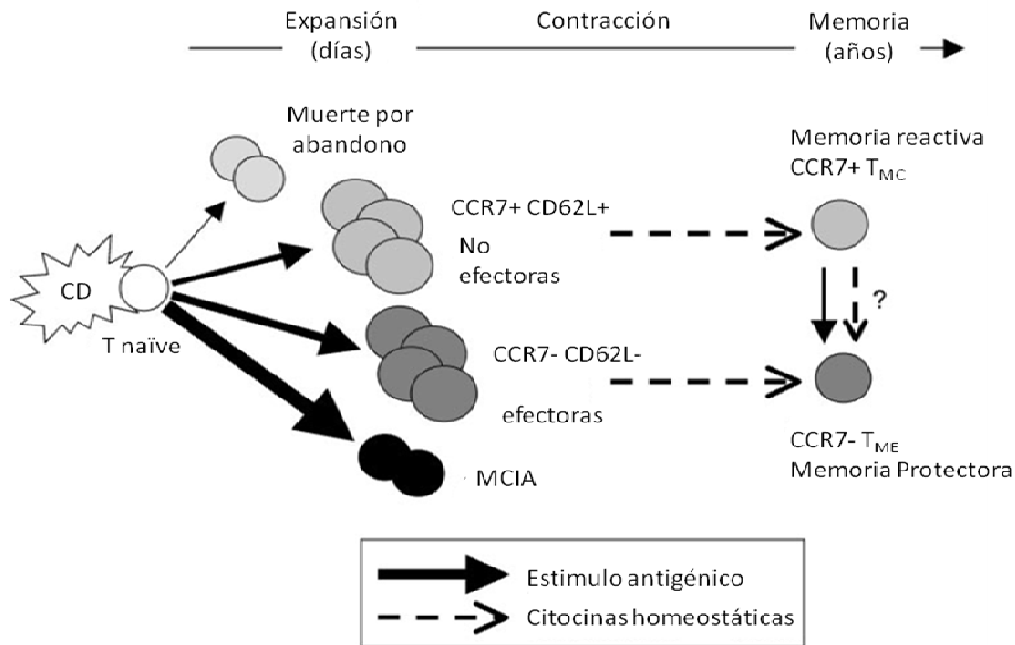


Figura 4– Papel de la fortaleza de la señal en la interacción RCT-CPH para la generación de memoria en LTC. Un factor que puede determinar el tipo de memoria es la fortaleza de la señal que se mantiene entre el RCT y el CPH clase I en las células T naíve, siendo que si la señal es muy débil, las clonas pueden morir por abandono y si es muy fuerte puede haber muerte celular inducida por activación, estableciéndose la generación de memoria en niveles de fortaleza de señalización intermedia (Tomado de Sallusto, 2004).

Las subpoblaciones de células T_{MC} y T_{ME} con programas funcionales distinguibles pueden ser definidas de acuerdo a la expresión de sus moléculas de superficie (Figura 5). Es de notar que algunos marcadores son rápidamente modulados bajo activación celular. Las moléculas coestimuladoras han sido los primeros marcadores usados para distinguir la heterogeneidad de las células T de memoria. CD27 y CD28, que son expresados en las células T naíve, son expresados también en algunas células T de memoria pero son ausentes en una subpoblación de células T CD8+ de memoria caracterizada por la amplia función efectora y la expresión de CD45RA. Existe amplia evidencia de esta heterogeneidad en la expresión de receptores de quimiocinas, de receptores de adhesión y moléculas de coestimulación en las subpoblaciones de células T_{MC} y T_{ME}. En ratones también ha sido documentada la presencia de células T de memoria con diferente capacidad migratoria y funciones efectoras. Se han encontrado poblaciones de células T CD4+ diferenciadas en ratones inmunizados; algunas producen IL-2 en nódulos linfáticos, mientras otras producen INF- γ en tejidos no linfoides. De manera similar, dos poblaciones de células T CD8+ de memoria antígeno específicas exhiben actividad lítica en tejidos no linfoides, mientras en bazo no (Sallusto et al., 2004).

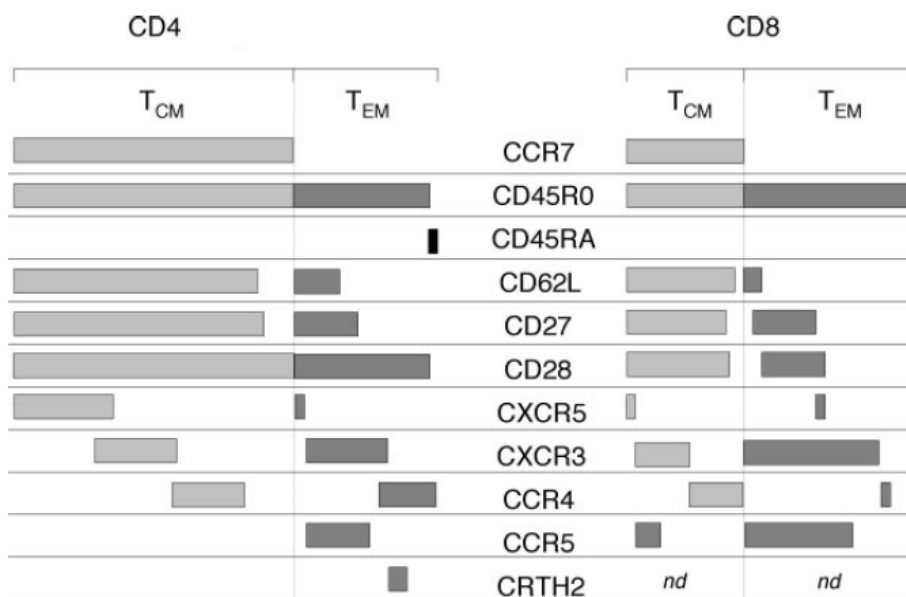


Figura 5– Niveles de expresión de moléculas características en células de memoria en humanos. Los diferentes marcadores de superficie y genes característicos tienen diferente nivel de expresión en células de memoria central y efectora tanto en células T CD4+ como CD8+, lo que permite usar algunos marcadores como CCR7+ o CD62L+ para distinguir dichas subpoblaciones.(tomado de Sallusto, 2004)

Se sabe que en el caso de algunos marcadores como CD62L se presentan niveles de expresión distintos según el contexto de la infección, donde se ha visto que las células en división y bajo condiciones de no reinfección son CD62L_{hi}, en contraste con situaciones de infección aguda, donde las células en división son principalmente CD62L_{low}. Subsecuentemente, se ha observado que CD62L se co-localiza en células T en nódulos linfáticos junto al receptor de quimiocinas CCR7, por lo que las condiciones de memoria central y memoria efectora han sido usadas para distinguir las poblaciones de células T CD62L_{hi} CCR7_{hi} de CD62L_{low} CCR7_{low}, respectivamente, en humanos y ratones (Welsh y Szomolanyi-Tsuda, 2004).

Los marcadores más usados para distinguir a las subpoblaciones de células T de memoria central y efectora *in vitro* son usualmente CD62L y CCR7. Dichos marcadores son un reflejo de la situación de las células ante un periodo donde hay o no un encuentro antigénico, en el caso de CD62L, al ser una molécula de adhesión y tener un ligando de expresión en órganos linfoides es utilizado para diferenciar estas subpoblaciones, ya que en estados de infección es regulado negativamente, permitiendo que las células de memoria central específicas para un antígeno sean liberadas de los órganos linfoides para trasladarse a tejidos periféricos y puedan ejercer acciones efectoras. Por otra parte, en periodos donde no hay estímulo antigénico se regula positivamente la expresión de CD62L

para mantener a las células específicas en los órganos linfoides, donde son preservadas dichas células bajo condiciones que son favorables para su larga supervivencia, asegurando siempre, el tener un reservorio de estas células por si se da una nueva reinfección (Sallusto et al, 2004).

En cuanto a la naturaleza del origen de las células de memoria, se discute que las células T_{MC} son células arrestadas en estados intermedios de diferenciación precedentes a las células T_{ME} y se sugiere que las células T_{MC} son generadas por un estímulo sostenido (Sallusto et al., 2004). Las células de memoria central y memoria efectora son probablemente mejor definidas por su estatus de activación más que por sus marcadores fenotípicos: las células efectoras son células T con experiencia antigénica que actúan en respuesta a una carga antigénica durante una infección primaria, infección secundaria o reactivación viral, mientras las células de memoria central son células T con experiencia antigénica en descanso en ausencia de un estímulo antigénico (Welsh y Szomolanyi-Tsuda, 2004).

En el caso de las células T CD8+ de memoria efectora, desarrollan gránulos diferenciados que contienen moléculas citotóxicas como perforinas y granzimas. Estas células T regulan negativamente la producción de CD62L, saliendo del vaso y nódulos linfáticos, y migrando a tejidos periféricos para encontrarse con su antígeno correspondiente (Welsh y Szomolanyi-Tsuda, 2004). También se caracterizan por la rapidez en las funciones efectoras, así mismo, tanto en poblaciones de células T CD4+ y CD8+ se produce INF- γ , IL-4 e IL-5 dentro de las horas seguidas a la estimulación antigénica. Las proporciones relativas de T_{MC} y T_{ME} en sangre varían en las células T CD4+ y CD8+; las células T_{MC} son predominantemente células CD4+ y las T_{ME} son mayoritariamente CD8+. Dentro de los tejidos, sin embargo, las células T_{MC} y T_{ME} muestran modelos de distribución característicos. Las células T_{MC} son enriquecidas en nódulos linfáticos y amígdalas, mientras en pulmón hígado e intestino contienen en gran proporción células T_{ME} (Sallusto, F., et al., 2004).

3.5.3 La memoria inmunológica en el desarrollo de vacunas: ventajas y obstáculos

De entre las muchas ventajas que presenta la memoria inmunológica, se puede destacar la prontitud de la respuesta ante un antígeno que previamente invadió a un individuo, debido a la asombrosa capacidad que tiene el sistema inmune para “recordar” la exposición a algún antígeno en una segunda exposición o durante infecciones persistentes. Tomando este aspecto en cuenta, las posibles aplicaciones y utilidades de la memoria inmunológica resultan amplias para el desarrollo de vacunas contra diversos patógenos. Es así, que la utilización de diversos antígenos de varios tipos de patógenos pueden generar la mencionada memoria inmunológica en individuos inmunizados sin necesidad de que el individuo se exponga a los patógenos y evitando que sufra enfermedades causadas por dichos agentes. Estas capacidades tienen gran potencial en patógenos cuyos antígenos son altamente inmunogénicos y presentan tasas de mutación bajas. Sin embargo, el establecimiento de memoria inmunológica de células T o B queda pobremente entendido en patógenos cuyas tasas de mutación son altas y presentan gran variabilidad en sus epítomos.

Algunos de los problemas para el establecimiento de una memoria inmunológica eficiente en patógenos con variabilidad antigénica están relacionados a fenómenos inmunológicos en constante interacción. Dentro de estos fenómenos inmunológicos destacan el pecado antigénico original (PAO) y el antagonismo, los cuales están presentes en la infección con VIH, virus de la influenza, e incluso cáncer (McMichael et al., 2000).

El PAO (Figura 6), que fue descubierto por primera vez en la biología de células B, indica que cuando un individuo se expone a un antígeno original se generan células específicas que reconocen a este. Sin embargo, cuando se presentan mutaciones en dicho antígeno las células que reconocen al antígeno original pueden reconocer al antígeno mutado como si fuera el original, dirigiendo las respuestas contra este en vez de dirigir las contra el antígeno mutado (Klenerman y Zinkernagel, 1998; Anderson et al., 2001; Singh et al., 2002).

Singh y colaboradores en el 2002 afirmaron que no es claro si la estimulación del sistema inmune con múltiples epítomos mutantes puede generar la respuesta inmune multivalente deseada o si esta puede ser limitada por interferencia inmune entre antígenos altamente relacionados en el caso de la inmunidad celular. Basándose en sus resultados, ellos describieron el PAO como un fenómeno en donde, después de la generación de células de memoria específicas para un epítomo original (Figura 6),

una débil reactividad cruzada contra un segundo epítipo que es mutante del original reactiva el gran número de LTC de memoria específicos para el epítipo original más efectivamente que la activación de células T naïve específicas para el epítipo mutado (que son más escasas en comparación con las células de memoria). También se sugiere que el PAO es debido a la eliminación o desactivación de las células de memoria específicas para el epítipo original que son presentadas contra el epítipo mutado y que reaccionan cruzadamente con este. Estas células de memoria responden a la experiencia de un epítipo variable mediante “una forma de antagonismo de célula T” donde las clonas de LTC pueden reaccionar subóptimamente al epítipo variable y volverse parcialmente activas, llevándolas a la anergia o inactivación, algo similar a lo que ocurre durante la selección clonal de LTC, donde si el epítipo no es lo suficientemente bueno para activar la célula esta puede morir por no tener la afinidad suficiente hacia el epítipo y no desencadenar una cascada de señales lo suficientemente fuerte para diferenciarse.

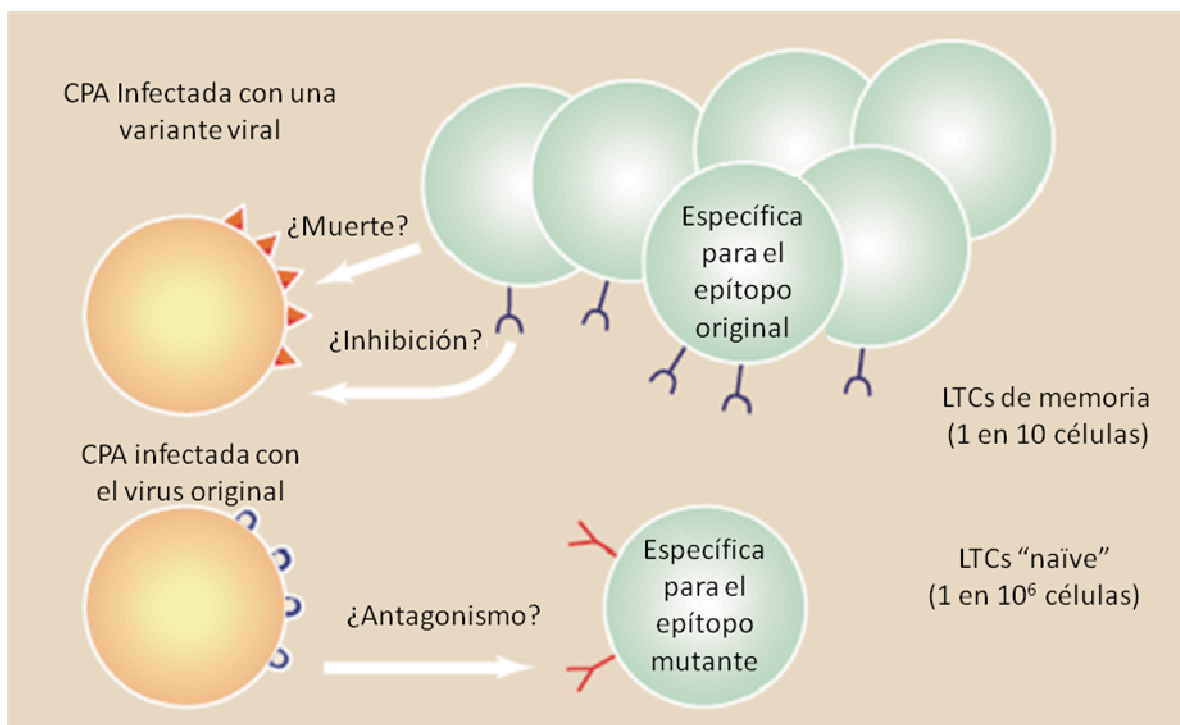


Figura 6– Fenómeno de pecado antigénico en LTC. Las células T naïve CD8+ sensibilizadas con un antígeno nativo generan LTC de memoria específicas para dicho antígeno, que al mutar puede despertar respuestas inmunes dirigidas contra el epítipo nativo más que estimular células T naïve específicas para el antígeno mutado (tomado de McMichael, 1998).

Bajo estas condiciones el antagonismo es un fenómeno muy relacionado al PAO, pues como es sabido, en el antagonismo las células T expuestas a un epítipo alterado reciben una señal parcial que inhibe su habilidad para responder del todo al agonista. Sing y colaboradores (2002) plantean que el antagonismo de células T ocurre cuando una célula T de memoria existente es funcionalmente inactivada por exposición a un mutante puntual o su epítipo cognado presentado en el CPH-I. Una gran cantidad de epítopos virales originales pueden antagonizar cualquier célula T impidiendo que responda a una nueva variante. A pesar de esto, muchas memorias de las células T naïve pueden ser generadas por una débil reacción cruzada de nuevas variantes (McMichael et al., 2000).

Algunos autores (Sing et al. 2002) afirman que existe la posibilidad de que la inmunización con una vacuna con múltiples variantes pueda generar antagonismo de células T entre los epítopos mutantes más bien que generar respuestas multivalentes de LTC. Sin embargo, encuentran que los antagonistas fallan en inducir inmunointerferencia *in vivo* cuando son presentados al sistema inmune al mismo tiempo o incluso en la misma célula.

Desde este punto de vista, tanto el PAO como el antagonismo son fenómenos que van relacionados, pudiendo presentarse los dos en un mismo sistema, junto con muchos otros fenómenos inmunológicos. Así mismo, aunque todos estos fenómenos inmunológicos pueden estar en constante interacción en un individuo infectado con un patógeno antigénicamente variable, según las estrategias de inmunización, dichos fenómenos pueden llegar a contrarrestarse, e incluso se puede generar una memoria inmunológica estable que pueda responder ante el encuentro con una variante que pudiera producirse en la naturaleza. La inmunización con múltiples variantes al azar de un epítipo puede lograr esto, y hace que esta propuesta tenga un gran potencial para el desarrollo de vacunas, pues incluso, se puede anticipar a las posibles mutaciones que tuviera un epítipo, hecho que tendría gran relevancia en el desarrollo de vacunas contra patógenos altamente adaptables.

3.6 Antecedentes del grupo de trabajo

Anteriormente, en el grupo de trabajo se realizó la construcción de una biblioteca de variantes de un epítipo perteneciente a la región variable (loop V3) de la proteína gp120 de VIH (Pedroza-Roldan et al., 2009). Dicha biblioteca posee una complejidad de alrededor de 10 000 variantes de este epítipo. La biblioteca fue construida en dos formatos: ADN plasmídico (VHBL) y fago M13 recombinante (BFL). La biblioteca en versión de ADN fue clonada en el vector de expresión eucariótica VH express, el cual codifica los epítopos variantes expresados mediante la substitución de la región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada de una inmunoglobulina codificada en dicho plásmido. En el formato de fago recombinante, se clonaron los epítopos de VIH en el fagémido pG8SAET, y mediante despliegue en fago (Phage Display) se expresaron los epítopos fusionados a la proteína VIII de la cápside del fago M13. Como inmunógeno no relacionado o control se utilizó un epítipo de 18 aminoácidos perteneciente a *Taenia crassiceps* en el caso de la versión en fago recombinante M13 (Manoutcharian et al., 2004). En el caso de la versión en ADN se conservó la región intacta CDR3 de la inmunoglobulina.

Para estimular los cultivos primarios de esplenocitos se utilizaron paneles de antígenos derivados de la biblioteca BFL. Estos antígenos se utilizaron en dos formatos: fago y péptido sintético. Dentro del panel de antígenos con el que se estimularon los cultivos también se incluyeron el epítipo original (también llamado nominal) de la proteína gp120 de VIH (ELN o PNL según su formato) y otro antígeno no relacionado (B1) derivado de la proteína Gag de VIH.

4. JUSTIFICACIÓN

Como es sabido, muchas de las estrategias clásicas en el desarrollo de vacunas contra patógenos antigénicamente variables, como el VIH, virus de la influenza, virus del Dengue, entre otros, no han sido capaces de desarrollar la protección requerida contra estos patógenos. Una novedosa propuesta que ha venido a cambiar las perspectivas en el desarrollo de vacunas contra patógenos con antígenos altamente variables, ha sido la administración simultánea de antígenos variables, derivados de secuencias consenso, o de aquellas encontradas con mayor frecuencia en las proteínas virales (Anderson et al, 2001; Singh et al., 2002; García-Quintanilla, 2007). Sin embargo, este concepto pudiera no ser del todo correcto, pues la administración de antígenos variables basados en secuencias consenso pudieran dificultar el desarrollo de una respuesta inmune efectiva contra el virus, pues el hecho de encontrar dichas secuencias en las proteínas de virus en fase crónica de la infección, refleja que los virus que las poseen han escapado de las presiones de selección impuestas por el sistema inmune, y por lo tanto son menos efectivas para el desarrollo de vacunas. Tomando esto en cuenta, se desarrolló una novedosa propuesta, al introducir en una misma biblioteca antígenos con mutaciones al azar (BEVs) en lugar de aquellos que se presentan con mayor frecuencia, con el fin de establecer condiciones lo más cercanas posibles a lo que sucedería en caso de una infección, siendo estas, las primicias con las que debe contar una vacuna; igualar antigénicamente al inmunógeno y las condiciones de la enfermedad, así como desarrollar respuestas inmunes parecidas a las que se desarrollan en presencia del patógeno. Esta administración simultánea de variantes pretende generar células específicas para cada antígeno usado para la inmunización, incluso superar la influencia de fenómenos inmunológicos como el antagonismo a corto plazo y el PAO a largo plazo. Dentro del contexto de la generación de memoria inmunológica, esta estrategia, pretende generar células de memoria que sean reactivas a lo largo del tiempo, con el fin de que los antígenos variables con los que se inmunizó en un principio logren estimular estas células. Es así, que se propone, que la inducción de células de memoria que sean específicas para los antígenos usados para la inmunización, pueden incluso, anticiparse a las nuevas variantes de un patógeno *in vivo*. Por estas razones, el estudio del efecto de los antígenos variables sobre el desarrollo de células de memoria, es un punto crucial dentro del desarrollo de vacunas de este tipo.

5. HIPÓTESIS

- La inmunización con BEVs en ratones, podría inducir una respuesta de LTC específicos de memoria duradera.

6. OBJETIVO GENERAL

- Analizar la capacidad de la biblioteca de variantes de un epítipo derivado de gp120 para inducir memoria central/efectora a largo plazo en un modelo biológico.

Objetivos particulares

- Analizar la capacidad de proliferación en diferentes tiempos de las células de ratones inmunizados una vez con estos inmunógenos.
- Analizar estas células mediante marcadores de memoria específica.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

- Grupos e inmunización. Se utilizaron 4 grupos de 5 hembras de ratones de la cepa BALB/c de 4-6 semanas de edad. Dos de los grupos se inmunizaron de manera intradermal (i.d.) con 75 µg de ADN de VHBL en 100µl de buffer salino, y de forma intraperitoneal (i.p.) con 1×10^{11} UFC (Unidades formadoras de colonias) de BFL. Los dos grupos restantes se inmunizaron con antígenos control (GK1 y VVH; para detalles de los antígenos ver sección 3.6), utilizando las mismas dosis y vía correspondientes. Las inmunizaciones se llevaron a cabo en el día uno y los ratones se sacrificaron por anestesiado con Sevoran y dislocación cervical a los 15 días (corto plazo; 2 ratones de cada grupo) y, 8 meses (largo plazo; 3 ratones de cada grupo) después de la primera inmunización. Todos los grupos se mantuvieron en condiciones estables con alimento y agua.

- Linfoproliferación y fijación de células para citometría (FACS). Según el periodo establecido para cada grupo, se procedió a la proliferación de esplenocitos de acuerdo al siguiente protocolo: se obtuvo el bazo quirúrgicamente en condiciones de esterilidad y se perfundió con 3-5 ml de medio RPMI (GIBCO, Invitrogen) en cajas petri estériles. Se tomaron las células de la caja y se colocaron en tubos falcon de 15 ml haciendo un pool de células por cada grupo de ratones. Las células se dejaron reposar para quitar el debris y se pasaron los sobrenadantes a tubos nuevos cuidando no mezclar con el debris. Los tubos nuevos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante, posteriormente se agregaron 1500µl de buffer de lisis de eritrocitos. Las células fueron resuspendidas y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se agregaron 5 ml de RPMI y se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y se agregaron 5 ml de RPMI suplementado: 10% SFB, 1% aminoácidos no esenciales, 1% mercaptoetanol, 1% penicilina estreptomycin, 1% piruvato de sodio (invitrogen). Las células se mantuvieron a 37°C con 5% CO₂, mientras se realizó el conteo de estas en un hemocitometro Neubauer. Una vez contadas las células se colocaron en placas de 96 pozos conteniendo 1×10^5 células en 100 µl de medio RPMI suplementado por pozo, y en placas de 24 pozos a una concentración de 1×10^6 células/ml/pozo en medio RPMI suplementado para citometría. Las células se mantuvieron a 37°C con 5% CO₂ y se estimularon con un panel de antígenos de la biblioteca, cada antígeno del panel se puso a una concentración de 2×10^{10} UFC o 10 µM de péptidos sintéticos por pozo, respectivamente. Las células fueron estimuladas durante tres días en el caso de fagos y cinco en el de péptidos. Dieciséis horas antes del término del periodo de

incubación se agregaron 0.5 μ Ci/pozo de [metil-³H] timidina (GEHealthcare) a las placas de 96 pozos. Al término de la incubación, las células fueron cosechadas en membranas de fibra de vidrio y se les añadió 10 ml de líquido de centelleo, subsecuentemente, las membranas fueron leídas en un lector β -plate (Perkin Elmer). Después de tres días de incubación en presencia de antígenos, las placas de 24 pozos fueron tratadas con monensina a una concentración 4mM por pozo de 2 ml y se incubaron seis horas. Después se recolectaron las células y se pasaron a tubos eppendorf, se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, se colectaron los sobrenadantes y se congelaron a -20°C para posteriores ensayos. Las células colectadas se fijaron con paraformaldehído al 4% y se conservaron a 4°C hasta su tratamiento con anticuerpos para citometría. Los resultados de la linfoproliferación se expresan como un índice de estimulación basado en el incremento en proliferación de las células estimuladas/proliferación de las células sin estimular (Ivory y Chandee, 2007).

- Medición de células de memoria por citometría de flujo. Después del periodo de incubación de los cultivos de células en placas de 24 pozos, las células se trataron con monensina (Sigma-aldrich), se fijaron con paraformaldehído al 4%, y fueron marcadas con anticuerpos anti CD3, CD8, CD44 y CD62L (Amersham Biosciences) acoplados a fluorocromos específicos para cada anticuerpo (PECy5, PE, CPA y FITC, respectivamente). Las células se analizaron en un citometro (FACS calibur) con el software CellQuest, se analizaron al menos diez mil eventos.

- Análisis estadístico. Los datos fueron analizados utilizando pruebas de χ^2 mediante tablas de contingencia para evaluar si se presentaron diferencias al inmunizar con la BEV, utilizando un valor de $P < 0.05$ y 0.1 .

8. RESULTADOS

8.1 Proliferación celular

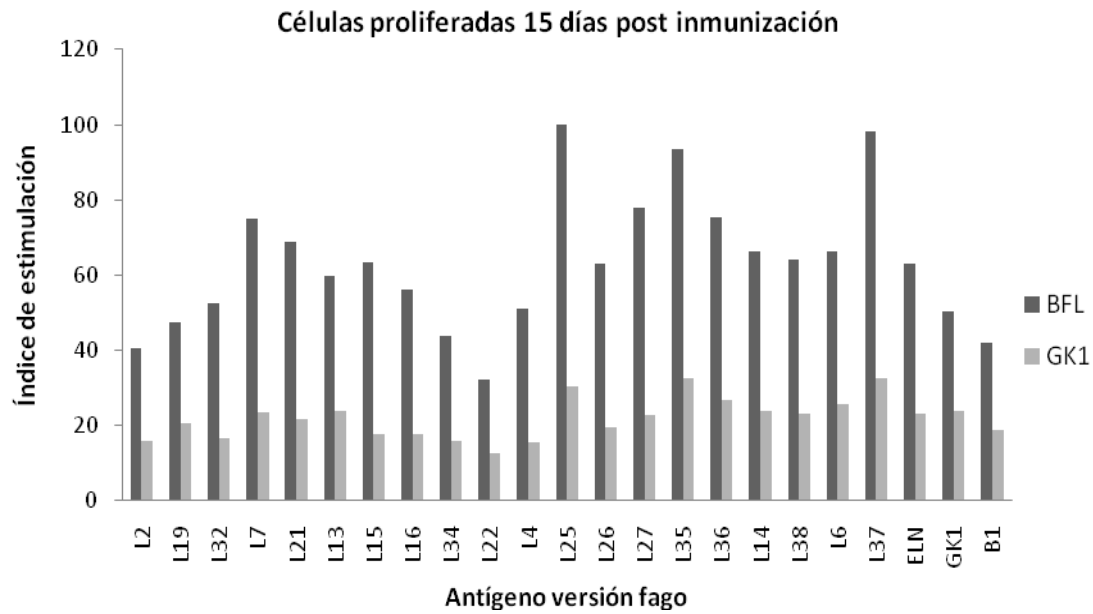
Con el fin de analizar si la inmunización con BEVs estimula células T que reconozcan los epítomos de la biblioteca, se inmunizaron ratones con dicha biblioteca en versión de fago y ADN (Figura 7). Quince días después se sacrificaron los ratones y se obtuvieron cultivos primarios de esplenocitos. Estos cultivos se estimularon con un panel de antígenos en formato de fago tomados al azar de la biblioteca.

En el primer grupo, se utilizaron ratones inmunizados con BFL y GK1, estos últimos utilizados como control no relacionado (Figura 7a). Se encontró que la mayoría de los antígenos con los que se estimuló indujeron respuestas proliferativas en las células de ratones inmunizados con BFL. Las células estimuladas de los ratones inmunizados con BFL respondieron ante todas las variantes del epítomo, así como el nominal, con índices de estimulación de entre 30 y 100. Los antígenos que estimularon más fueron los pertenecientes a la biblioteca, siendo los más altos L7, L25, L27, L35, L36 y L37, con índices de estimulación mayores a los obtenidos con el epítomo original (ELN). Así mismo, las células de los ratones inmunizados con GK1 respondieron en menor medida que las de BFL, teniendo índices de estimulación de entre 18 a 30. En este caso se encontró diferencia significativa entre la inmunización con la biblioteca y la inmunización con el inmunógeno control, utilizando valores de $P < 0.01$.

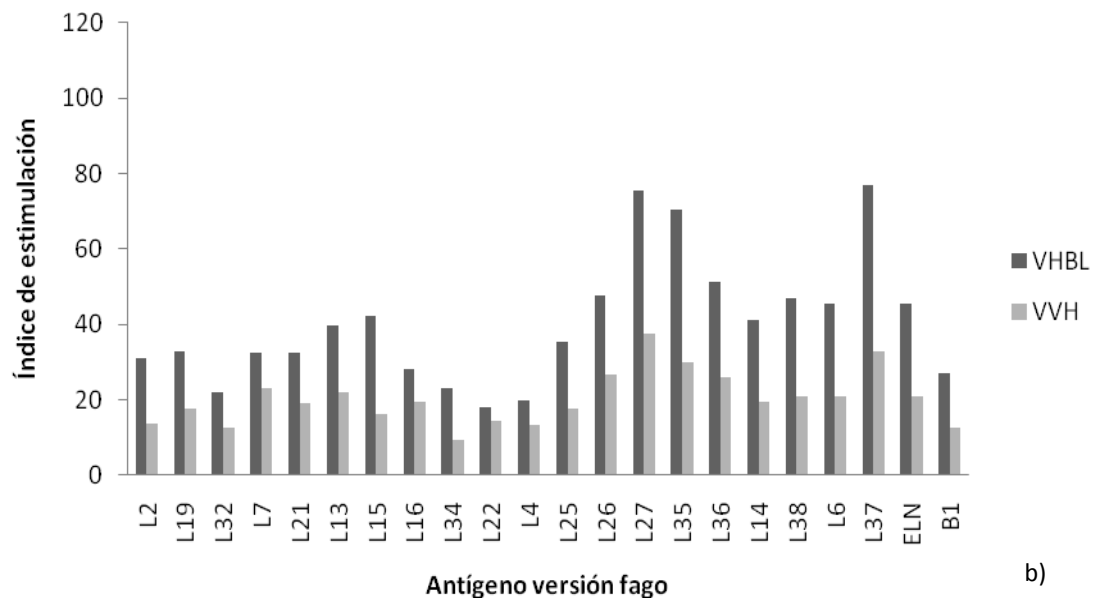
Para analizar si el formato de los antígenos (ADN o fago recombinante) influye en la estimulación de las células, se inmunizó un grupo paralelo con la biblioteca en versión de ADN plasmídico (Figura 7b). En este caso las células de los ratones inmunizados con VHBL mostraron índices de estimulación de entre 18 y 75, siendo más bajos que en el caso de los ratones inmunizados con BFL. Sin embargo, dentro del panel de antígenos, la mayoría estimularon a las células de los ratones inmunizados con VHBL. Entre los antígenos que demostraron estimular más en formato de ADN se encontraron L26, L27, L35, L36 y L37, de los cuales, poco más de la mitad tenían índices de estimulación más altos que ELN. En comparación con las respuestas mostradas en células de ratones inmunizados con el antígeno control VVH que presentaron índices de estimulación de entre 8 y 35, los antígenos del panel mostraron estimular más a las células de ratones inmunizados con VHBL, presentándose en este caso, algunos antígenos que tuvieron índices de estimulación de alrededor del doble con respecto al control.

Estadísticamente se encontró diferencia significativa ($P < 0.01$) entre los índices de estimulación en ratones inmunizados con VHBL y los inmunizados con VVH.

En ambos ensayos, tanto en la inmunización con antígenos en formato de fago como en la inmunización con ADN, se logró inducir células específicas mediante la inmunización de BEVs, que fueron capaces de reconocer antígenos variables tomados al azar de la biblioteca.



a)



b)

Figura 7– Ratones inmunizados con BFL (a) o VHBL (b). Quince días después de la inmunización se obtuvieron cultivos primarios de esplenocitos, las células fueron estimuladas con un panel de 22 (b) o 23 (a) antígenos en versión de fago. En ambos grupos se utilizaron esplenocitos de ratones inmunizados con GK1 (a) o VVH (b) como inmunógenos no relacionado. Se encontraron diferencias significativas utilizando valor de $P < 0.01$.

Para comprobar si se mantiene la capacidad de estimular las células generadas durante la inmunización con BFL o VHBL a lo largo del tiempo, se proliferaron cultivos primarios de esplenocitos de ratones ocho meses después de la inmunización (Figura 8). Los esplenocitos se estimularon con parte de los antígenos iniciales en versión de péptidos sintéticos y fago.

Las células de ratones inmunizados con BFL y estimuladas con el panel de antígenos en formato de péptidos sintéticos (Figura 8a) mostraron índices de estimulación bajos, siendo los índices de estimulación más altos cercanos a 3.5. No obstante, las células estimuladas mostraron proliferar ante todo el panel de antígenos. Las respuestas más altas se presentaron en los antígenos L7, L2, L13, L14 y L15, los cuales mostraron índices de estimulación más altos comparados con PNL. Así mismo los índices de estimulación generados por la biblioteca sobrepasaron los índices generados por el inmunógeno no relacionado, en varios antígenos, con casi el doble de estimulación con respecto a este último, que presentó índices de estimulación de entre 0.8 y 1.2, presentándose una diferencia estadísticamente significativa al utilizar valores de $P=0.1$.

En el caso de los ratones inmunizados con VHBL y estimulados con el panel de péptidos sintéticos (Figura 8b), las células estimuladas mostraron índices de estimulación de entre 1.2 y cercanos a 3.5. Así mismo, en este grupo se logró estimular las células con casi todos los antígenos, siendo los antígenos que mejor estimularon: L7, L2, L15, L22 y L26, y presentando, en solo tres de estos, índices de estimulación mayores que los encontrados al estimular con PNL. Sin embargo, en este caso, muchos de los antígenos (alrededor el 50% del panel) presentaron índices de estimulación cercanos a inmunógeno control, por lo que se considera que estos antígenos presentan índices de estimulación muy bajos. Estadísticamente no se encontró diferencia significativa al utilizar valores de $P=0.05$

Sin embargo, en ambos ensayos se demostró que la inmunización con BEVs es capaz de generar células que permanecen a lo largo del tiempo, presentándose células específicas para diferentes antígenos en ambos grupos, lo que sugiere que la inmunización con BFL estimula células específicas que son mantenidas durante 8 meses para antígenos específicos. En el caso de la inmunización con VHBL sucede lo mismo pero con células específicas para otros antígenos, estimulando así, cada versión de la biblioteca algunas células diferentes, pero también respondiendo contra algunos antígenos en común.

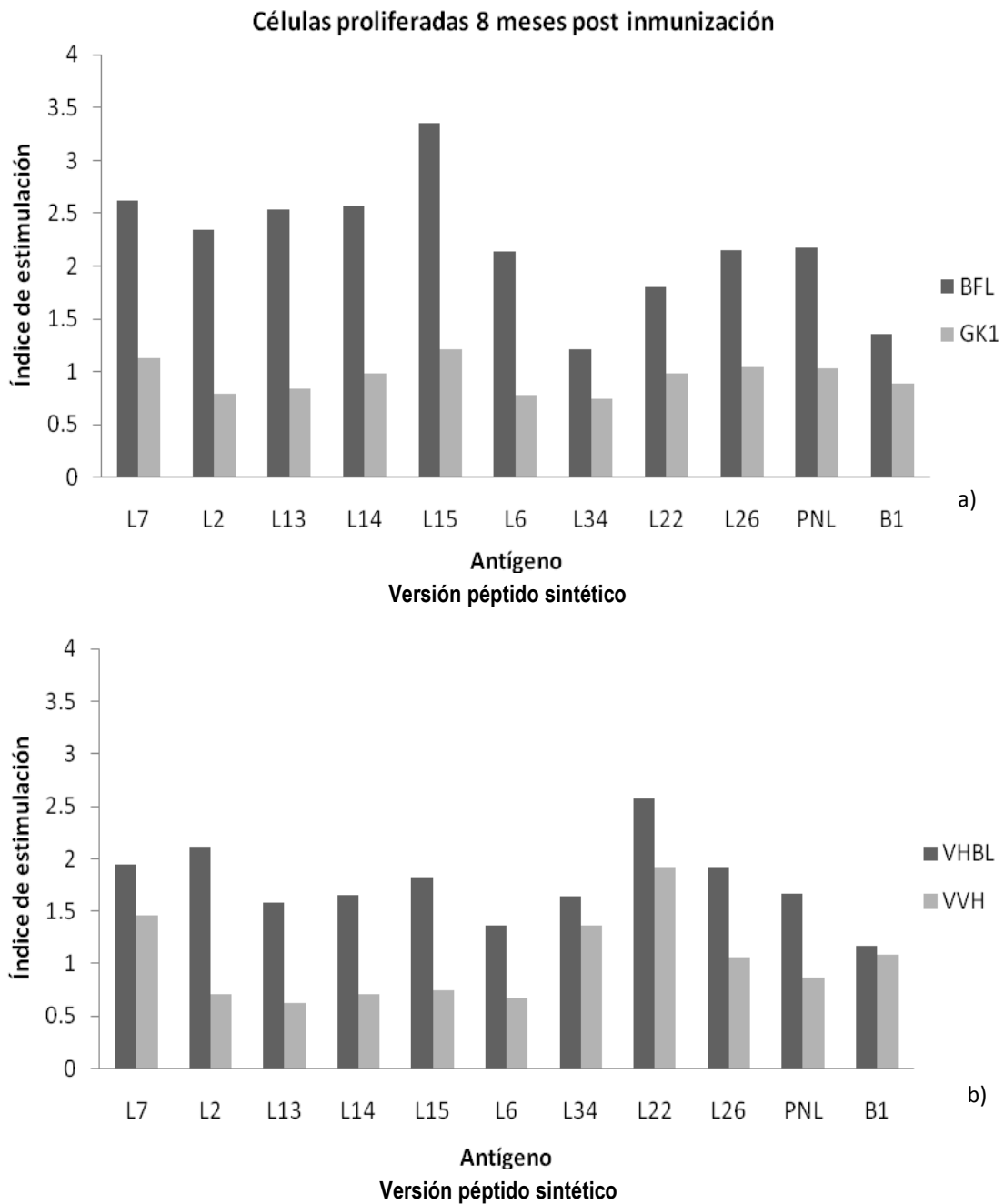


Figura 8— Ratones inmunizados con BFL (a) o VHBL (b). Ocho meses después de la inmunización se obtuvieron cultivos primarios de esplenocitos, las células fueron estimuladas con un panel 11 antígenos en versión de péptido sintético. En ambos grupos se utilizaron esplenocitos de ratones inmunizados con GK1 (a) o VVH (b) como inmunógenos no relacionado. Se utilizaron valores de $P=0.1$ (a) y 0.05 (b)

Dos grupos equivalentes a los anteriores, igualmente, inmunizados con BFL y VHBL (Figura 9) fueron estimulados con el panel de antígenos, esta vez en versión de fago, ocho meses después de la inmunización.

En ratones inmunizados con BFL y estimulados con antígenos en versión de fago (Figura 9a), se observó que la mayoría de los antígenos con los que se estimuló presentaron respuestas proliferativas altas, de entre 5 y 65. Sin embargo, los antígenos considerados como positivos fueron menos en este caso, siendo positivos nueve de los doce antígenos con los que se estimuló. Dentro de estos nueve antígenos, los que demostraron estimular en mayor medida las células de los ratones inmunizados con BFL fueron L2, L6, L13, L14 y L15. Utilizando valores de $P < 0.01$ se encontró una diferencia significativa entre los índices de estimulación del grupo inmunizado con BFL y del inmunizado con GK1.

En células de ratones inmunizados con VHBL y estimuladas con antígenos en versión de fago (Figura 9b), se observaron respuestas con índices de estimulación de entre 8 y 45. De los 11 antígenos con los que se estimularon las células respondieron cinco de estos, siendo L2, L6, L13 y L14 los que demostraron mayor estimulación en los cultivos, así mismo, los índices de estimulación con estos antígenos fueron mayores que los inducidos por ELN. En células de ratones inmunizados con el control, se presentaron índices de estimulación de entre 8 y 30. Estadísticamente, se encontró diferencia significativa al utilizar valores de $P < 0.05$.

En este caso, las células inducidas por la inmunización con BEVs se mantuvieron durante los ocho meses en los que no hubo estímulo antigénico, sin embargo, como se puede ver en los ensayos, parte de las células generadas no fueron capaces de sobrevivir. Por otra parte, la inmunización con BFL demostró desarrollar respuestas más altas, lo que indica que el estímulo antigénico inducido por los inmunógenos encontrados en versión de fago es más fuerte que el desarrollado por inmunógenos en versión de ADN, esto indica que en la inmunización con fagos recombinantes no es necesario el uso de adyuvantes que estimulen el sistema inmune, pues el fago mismo funciona como un estímulo para el sistema inmune.

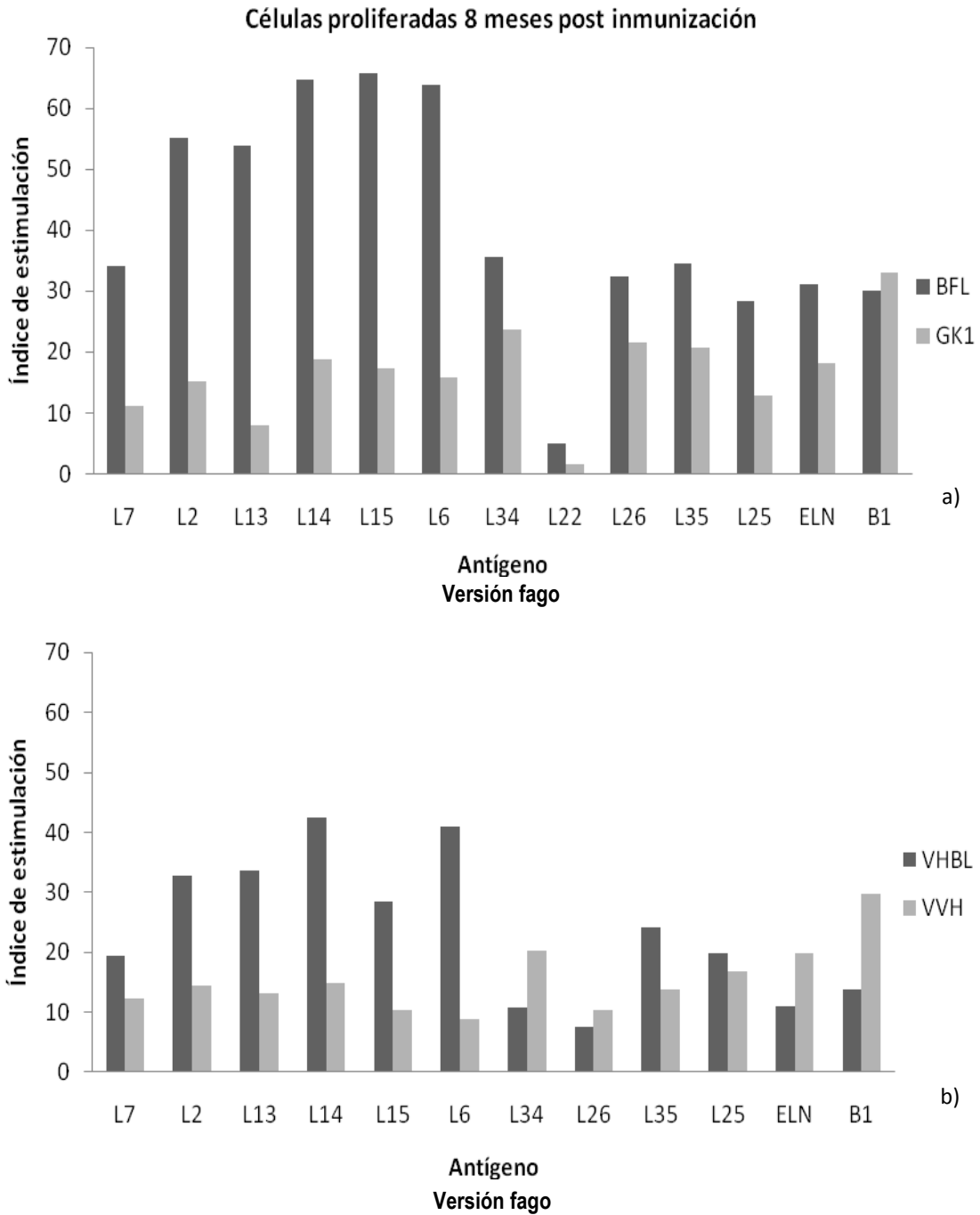


Figura 9– Ratones inmunizados con BFL (a) o VHBL (b). Ocho meses después de la inmunización se obtuvieron cultivos primarios de esplenocitos, las células fueron estimuladas con un panel 11 antígenos en versión de fago. En ambos grupos se utilizaron esplenocitos de ratones inmunizados con GK1 (a) o VVH (b) como inmunógenos no relacionado. se encontraron diferencias significativas utilizando valores de $P < 0.01$ (a) y 0.05 (b).

8.2 Medición de células de memoria

En un último ensayo, se intentó determinar si la inmunización con BFL genera linfocitos CD8+ de memoria que sean activos después de ocho meses, y la identidad de esta memoria, si son células de memoria central o efectora. Por lo que se identificaron dichas poblaciones mediante marcadores de superficie celular por citometría de flujo en ratones inmunizados con BFL y GK1 (Figura 10).

Para analizar cómo se distribuyen las células de memoria central o memoria efectora en los ratones inmunizados con BFL, se obtuvieron cultivos de esplenocitos sin estimular y estimulados con antígenos pertenecientes a la biblioteca en formato de fago recombinante. Las células se fijaron con paraformaldehído y se incubaron con anticuerpos acoplados a fluorocromos específicos para las moléculas de superficie: CD3, CD8, CD44 y CD62L. Las proporciones más frecuentes de células de memoria central/memoria efectora fueron 1 a 4 en células sin estimular en ratones no inmunizados. La proporción de células T_{ME} incrementó a cerca del 40% en células CD44+ de ratones inmunizados con BFL y estimulados con alguno de los antígenos (elegidos por presentar respuestas altas durante los primeros ensayos de proliferación; figura 7). Por otro lado, en ratones inmunizados con GK1 no se encontraron cambios significativos en las proporciones de células T_{ME} y T_{MC}, con respecto a las células sin estimular.

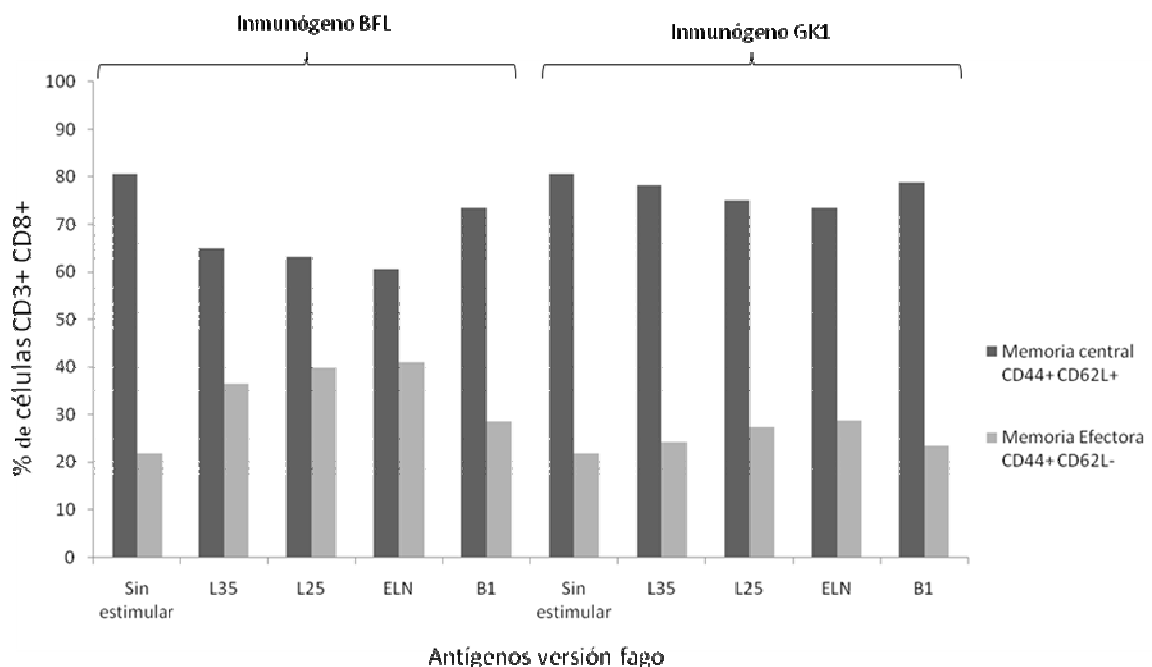


Figura 10- Distribución de la memoria central/efectora en ratones BABL/c inmunizados con BFL y GK1. Los ratones fueron sacrificados 8 meses después de su inmunización y las células fueron estimuladas con un panel de antígenos perteneciente a la biblioteca, posteriormente fueron tratadas para su análisis por FACS. Se midió la expresión de CD44+ y CD62L como marcadores de memoria en linfocitos T CD8+ de ratones inmunizados con BFL (izquierda) y GK1 (derecha).

9. DISCUSIÓN

9.1 La inmunización con antígenos variables es capaz de desarrollar respuestas específicas

Con el fin de saber si la inmunización con las BEVs es capaz de generar células específicas para los antígenos inmunizados, se inmunizaron ratones con dicha biblioteca en versiones de fago recombinante y ADN. El panel de antígenos demostró inducir respuestas específicas en ratones inmunizados tanto con BFL como con VHBL (Figura 7a y 7b). Puesto que todos los antígenos con los que se estimularon los cultivos celulares fueron tomados al azar, representan antígenos mutantes dentro de la biblioteca, por lo que los resultados obtenidos con la estimulación del panel de antígenos se puede extrapolar a lo que sucede *in vivo* al inmunizar con la biblioteca. En este caso, se puede decir que al inmunizar con la biblioteca en ambas versiones, esta tiene la capacidad de generar células específicas para la mayoría de los antígenos. Sin embargo, aunque se generan células específicas contra gran parte de los antígenos de la biblioteca, el porcentaje de los que tienen respuestas más altas es variable, según la versión de la biblioteca con la que se inmunizó. Por lo tanto, BFL tiene una mayor capacidad en generar células específicas.

El uso de BEVs se basa en un principio básico: una vacuna debe corresponder antigénicamente al patógeno y las condiciones de la enfermedad en niveles de epítomos, y debe ser capaz de desarrollar respuestas inmunes que se parezcan a las respuestas inducidas por el patógeno mismo. Por lo que la administración de BEVs basada en antígenos variables de VIH tiene como objetivo estimular al sistema inmune con una gran variedad de antígenos con el fin de generar células específicas para cada uno, como sucedería en el transcurso de una infección natural con el VIH. Sin embargo, las mutaciones azarosas en los antígenos durante una infección natural pueden ocasionar que los antígenos no sean reconocidos por un CPH o por un RCT específico para dicho antígeno. No obstante, el amplio repertorio de RCT y la alta promiscuidad del CPH para reconocer gran variedad de antígenos, son estrategias adaptativas desarrolladas por el sistema inmune como medio para aminorar las posibles consecuencias que conlleva la alta variabilidad antigénica de algunos patógenos. Por estas razones, la administración simultánea de antígenos variables puede estimular células específicas para cada antígeno.

9.2 La inmunización con BFL y VHBL es capaz de generar células específicas pasados 8 meses

Aunque en un momento inicial la inmunización con la biblioteca es capaz de activar células específicas, un hecho desconocido es si estas células son mantenidas a largo plazo o se pierden por selección clonal o por falta de estímulo antigénico. Por esta razón, se realizaron ensayos en los que se estimularon cultivos de esplenocitos de ratones inmunizados con la biblioteca ocho meses antes.

En general, las respuestas desarrolladas en células de ratones inmunizados con BEVs demostraron ser específicas para la mayoría de los antígenos con los que se inmunizó, lo cual demuestra que la inmunización con BEVs es capaz de desarrollar células específicas que se mantienen a lo largo del tiempo, pudiendo incluso ser células de memoria específicas para los antígenos, que son capaces de reconocerlos después de ocho meses.

Así mismo, el uso del fago M13 recombinante en cuya cápside se acoplaron los antígenos variables, lo convierte en un inmunógeno fuerte para el cual no es necesario el uso de ningún adyuvante adicional. Esto explica una menor respuesta en ratones inmunizados con BEVs en versión de ADN, pues la estimulación y desarrollo de células específicas para cada antígeno es favorecida cuando se inmunizan antígenos en formato de fago recombinante.

La hipótesis planteada en el desarrollo de BEVs supone que la presentación simultánea de miles de variantes de epítopos al sistema inmune puede inducir la activación de un amplio repertorio de células T, tanto LTC como linfocitos T cooperadores, ambas capaces de reconocer los antígenos del patógeno presentados al momento del cambio natural o experimental en sus antígenos y las variantes de estos que pueden aparecer rápidamente en el curso de la infección. La activación de células específicas que reconozcan los antígenos de la biblioteca supondría la protección del individuo ante una infección con el patógeno, ya que las células generadas son capaces de reconocer antígenos que pudieran presentarse de forma natural en el patógeno.

9.3 La inmunización con BFL es capaz de generar células T CD8+ de memoria efectora

La inmunización con la biblioteca en ambos formatos demostró generar células que son reactivas aun después de ocho meses, sin embargo, para demostrar si estas células específicas son células de memoria y la identidad de estas, se procedió a hacer citometría de flujo, por medio de la cual se determinaría la identidad de dichas células por el marcaje específico de las proteínas CD3, CD8, CD45 y CD62L.

La inmunización de BEVs demostró ser capaz de generar células de memoria tanto central como efectora después de ocho meses, siendo que ante un estímulo antigénico con epítomos de la biblioteca hay un aumento de las poblaciones de células de memoria efectora que poseen especificidad antigénica. Aunque las células de memoria central son de importancia por su posible capacidad para activarse y diferenciarse en células con función efectora, las células con mayor potencial son las células de memoria efectora, por poder desarrollar funciones efectoras y eliminar células infectadas con mayor rapidez durante una segunda infección. Por esto, la inducción de células de memoria efectora mediante la inmunización con BEVs, supone la capacidad de proteger al individuo contra patógenos.

Extrapolando los resultados obtenidos con estos antígenos y sumados a los resultados de proliferación, se puede decir que la inmunización con las BEVs, en general, posee la capacidad de generar una gran cantidad de células específicas, y también, células de memoria efectora, siendo estas de gran importancia por tener gran potencial en la protección del individuo.

Sin duda, resulta difícil elucidar al inmunizar con una gran cantidad de variantes de antígenos cuales son los que despiertan una respuesta inmune favorable, y más aun cuales generan una memoria inmunológica que puede beneficiar al huésped. Esto debido a que al hablar de mutantes de un epítopo se puede deducir que existen gran cantidad de estos que pueden ser reconocidos por alguna célula específica, sin embargo también existen otros que por el simple hecho de presentar mutaciones drásticas no son tan afines, en este caso, a un CPH en donde puedan anclarse para ser reconocidos por un RCT específico y generar una cascada de señales que deriven en las respuestas inmunológicas apropiadas para eliminar dicho antígeno. O bien, si se lleva a cabo el anclaje a un CPH, pero el reconocimiento por el RCT es nulo o inapropiado, derivando, incluso, en la muerte de la célula o células que reconocen el antígeno (Goulder y Wadkins, 2004). Sin embargo, la inmunización simultánea de variantes de un epítopo pueden llegar a sobrepasar algunas de las barreras inmunológicas impuestas

por esta variación antigénica natural (Anderson et al., 2001; Singh et al., 2002; Garcia-Quintanilla, 2007), pues el encuentro de células naïve con los antígenos puede originar clonas específicas para algunos de los antígenos, llevando, si el estímulo es apropiado, a la generación de células de memoria específicas para dichos antígenos. En este caso, los resultados obtenidos muestran que la generación de respuestas amplias contra variantes antigénicas no es un hecho imposible.

10. CONCLUSIÓN

-El uso de BEVs basadas en un fragmento de la proteína gp120 de VIH como inmunógenos presentados en la superficie del fago M13 o como ADN, induce un amplio repertorio de células específicas que reconocen las variantes de los antígenos de VIH

-El reconocimiento por parte de las células específicas generadas con una única inmunización de BEVs se mantuvo a largo plazo.

-Se demostró la inducción de células T de memoria a largo plazo con una única inmunización con BEVs, las cuales reaccionan ante un estímulo antigénico aumentando la población de células de memoria efectora, siendo estas las de mayor importancia por su potencial en la protección de un individuo.

11. PERSPECTIVAS

El desarrollo de vacunas contra patógenos con antígenos variables representa un reto sin precedentes, pues los métodos de desarrollo de vacunas clásicos no han demostrado ser efectivos ante la variabilidad antigénica que presentan estos patógenos. La inmunización con BEVs propone una novedosa estrategia para el desarrollo de vacunas, sobre todo contra patógenos que son antigénicamente variables como el VIH, virus de la influenza, Dengue, *Trypanozoma cruzi*, entre otros. Sin embargo, mientras la diversidad antigénica es el principal obstáculo para el desarrollo de vacunas, técnicamente, el principal problema es encontrar el camino para incorporar esta diversidad en los inmunógenos de una vacuna. Sin embargo, el poco conocimiento acerca de la influencia de fenómenos inmunológicos sobre estrategias de inmunización como la expuesta en este trabajo, supone un gran obstáculo en el desarrollo de vacunas.

Aunque la inmunización con ADN mostro ser efectiva, la aplicación de otros sistemas de vacunación como la electroporación de ADN *in vivo* y el uso de vectores virales, adición de adyuvantes moleculares y/o regímenes de inmunización/refuerzo pueden contribuir al desarrollo de respuestas inmunes más fuertes. Así mismo, el uso de BEVs utilizando antígenos derivados de epítomos de células B y T, incluyendo epítomos inmunodominantes y subdominantes, pueden ser combinados en un solo inmunógeno, cubriendo un amplio espectro de antígenos, que al ser administrado reduzca la probabilidad del escape inmune por parte del patógeno.

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

Antagonismo	Fenómeno inmunológico en el que la variante de un antígeno inhibe células específicas para el antígeno original, evitando que se generen respuestas contra la variante, incluso ocasionando la depleción de las células
Antígeno	Sustancia reconocida por receptores de células T o B y que actúa como blanco de las respuestas inmunes generadas por estas células
B1	Inmunógeno no relacionado utilizado para estimular los cultivos celulares
BEVs	Biblioteca de epítomos variables
BFL	Biblioteca de epítomos variables de VIH en formato de fago M13 recombinante
Células TMC	Células T de memoria central
Células TME	Células T de memoria efectora
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CPA	Célula Presentadora de Antígenos
ELN	Epítomo L Nominal, epítomo nativo de VIH a partir del cual se generaron las bibliotecas de epítomos variables
Epítomo	Fragmento específico de una proteína que es reconocido por receptores de células T o B.
GK1	Inmunógeno/antígeno utilizado como control no relacionado, en versión de fago recombinante M13 y cuyo epítomo proviene de <i>Taenia crassiceps</i>
Inmunógeno	Molécula o conjunto de moléculas capaces de inducir una respuesta inmunitaria en un huésped particular
LTC	Linfocito T citotóxico
PAO	Pecado Antigénico Original. Fenómeno inmunológico en el cual las respuestas inmunes generadas contra un antígeno mutante son dirigidas contra el antígeno original, evitando que se generen células específicas que puedan reconocer y eliminar los antígenos mutantes
PLN	Péptido L Nominal
RCT	Receptor de Célula T.
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
VHBL	Biblioteca de epítomos variables de VIH en formato de ADN plasmídico
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1
VVH	Inmunógeno/antígeno utilizado como control no relacionado, en versión de ADN plasmídico y cuyo epítomo proviene de <i>Taenia crassiceps</i>

REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman A. H. y Pober J. S., *Inmunología celular y molecular*, McGraw-Hill, 1998, tercera edición
- Anderson, D. E., Carlos M. P., Nguyen L. y Torres J. V., Overcoming original (antigenic) sin, *Clinical Immunology*, 2001, 101(2): 152-157
- Brown S. A., Hurwitz J. L., Zhan X., Doherty P. C., Slobod K.S., CD8+ T-cells: are they sufficient to prevent, contain or eradicate HIV-1 infection?, *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2005, 5:113-119.
- Dagarag M., Ng H., Lubong R., Effros R. B., Yang O. O., Differential impairment of lytic and cytokine functions in senescent human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes, *Journal of Virology*, 2003, 77(5): 3077-3083
- Douek D. C., Picker L. J., Koup R. A., T cell dynamics in HIV-1 infection, *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, 21: 265-304
- Dutton, R. W., Bradley L. M. y Swain S. L., T cell memory, *Annu. Rev. Immunol.*, 1998, 16:201-223
- Ferrantelli F. y Ruprecht R. M., Neutralizing antibodies against HIV – Back in the major leagues?, *Current opinion in immunology*, 2002, 14: 495-502
- Franchini, G., Choosing the right memory T cell for VIH, *Nature Medicine*, 2009, 15(3): 244-246
- Frankel A. D. y Young J. A. T., HIV-1: Fifteen proteins and an RNA, *Annu. Rev. Biochem*, 1998, 67:1-25
- Gandhi R. T. y Walker B. D., Immunologic control of HIV-1, *Annu. Rev. Med.*, 2002, 53: 149-172
- Garcia-Quintanilla, A., Overcoming viral escape with vaccines that generate and display antigen diversity *in vivo*, *Virology Journal*, 2007, 4: 125-129
- Goulder, J. R. P. y Watkins D. I., HIV and SIV LTC escape: implications for vaccine desing, *Nature*, 2004, 4: 630-640
- Hutchinson F. J., The Biology and Evolution of HIV, *Annu. Rev. Anthropol*, 2001, 30:85-108
- Ivory, C. P. A. y Chadee K., Intranasal immunization with Gal-inhibitable lectin plus an adjuvant of CpG oligodeoxynucleotides protects against *Entamoeba Histolitica* challenge, *Infection and Immunity*, 2007, 75(10): 4917-4922

- Jackson, S. S., Schmitz J. R., Kuroda M. J., McKay P. F., Sumida S. M., Martin K. L., Yu F., Lifton M. A., Gorgone D. A. y Letvin N. L., Evaluation of CD62L expression as a marker for vaccine-elicited memory cytotoxic T lymphocytes, *Immunology*, 2005, 116: 443-453
- Klenerman, P., y Zinkernagel, R.M., Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes, 1998, *Nature* 394: 482–485
- Louar, A., Manocha M., Haridas V. y Manjunath N., Concurrent generation of effector and central memory CD8 T cells during vaccinia virus infection, *PLoS ONE*, 2008, 3(12): 1-7
- Manoutcharian, K., Diaz-Orea A., Gevorkian G., Fragoso G., Acero G., Gonzalez E., De A.A., Villalobos N., Gomez-Conde E., Scitutto E., Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2004, 99: 11–24.
- McCune J. M., The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease, *Nature*, 2001, 410: 974-979
- McHeyzer-Williams, L. J. y McHeyzer M. G., Antigen-specific memory B cell development, *Annu. Rev. Immunol.*, 2005, 23: 487-513
- McMichael A. J. y Phillips R. E., Escape of human immunodeficiency virus from immune control, *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, 15: 271-296.
- McMichael, A. J., The original sin of Killer T cells, *Nature*, 1998, 934: 421-422
- McMichael A. J., Ogg G., Wilson J., Callan M., Hambleton S., Appay V., Kelleher T., Rowland-Jones S., Memory CD8+ T cells in HIV infection, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 2000, 355: 363-367
- Organización mundial de la salud departamento de VIH/SIDA, estrategia mundial del sector sanitario para el VIH/SIDA 2008-2009, 2008, pp. 01-32
- Pantaleo G. y Fauci A. S., Immunopathogenesis of VIH infection, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, 50:825-854
- Parslow, T. G., Stites D. P., Terr A. I., Imboden J. B., *Inmunología básica y clínica*, 10a. edición, Mexico, editorial Manual moderno, 2002, 751-766
- Pedroza-Roldan, C., Charles-Niño C., Saavedra R., Govezensky T., Vaca L., Avannis-Aghajani E., Gevorkian G. y Manoutcharian K., Variable epitope library-based vaccines: shooting moving targets, 2009, *Mol. Immunol.*, 47: 270-282
- Sallusto, F., Geginat J. y Lanzavecchia A., Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance, *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, 22: 745-763

- Severino M. E., Sipsas N. V., Nguyen P. T., Kalams S. A., Walker B. D., Johnson R. P., Yang O. O., Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary CD4+ T lymphocytes, monocytes, and dendritic cells by cytotoxic T lymphocytes, *Journal of Virology*, 2000, 74(14): 6695-6699
- Singh, R. A., Rodgers J. R. y Barry M. A., The role of T cell antagonism and original antigenic sin in genetic immunization, *Journal of Immunology*, 2002, 169: 6779-6786
- Srivastava K. I., Ulmer J. B., Barnett S. W., Role of neutralizing antibodies in protective immunity against HIV, *Human Vaccines*, 2005, 1(2): 45-60
- Stemberger, C., Neuenhanh M., Buchholz V. R. y Busch D. H., Origin of T CD8+ effector and memory T cells subsets, *Cellular and Molecular Immunology*, 2007, 4(6): 399-405
- Valdespino J. L., García-García M. L., Conde-González C. J., Olaiz-Fernández G., Palma O., Sepúlveda J, Prevalencia de infección por VIH en la población adulta en México: una epidemia en ascenso y expansión, *Salud Publica México* 2007, 49 supl 3:S386-S394.
- Walker C. M., Non-cytolytic control of HIV replication by CD8+ T cells, *Seminars in Immunology*, 1993, 5: 195-201
- Welsh, R. M., Selin L. K. y Szomolanyi-Tsuda E., Immunological memory to viral infections, *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, 22: 711-743
- Williams, M. A. y Bevan M. J., Effector and memory LTC differentiation, *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, 25: 171-192
- Yang O. O., Kalams S. A., Rosenzweig M, Trocha A., Jones N., Koziel M., Walker B. D., Johnson R. P., Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes, *Journal of Virology*, 1996, 70(9): 5799-5806
- Zinkernagel, R. F., Bachman M. F., Kündig T. M., Oehen S., Pirchet H. y Hengartner H., On immunological memory, *Annu. Rev. Immunol.*, 1996, 14: 333-367
- Zolla-Pazner S., Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies, *Nature reviews*, 2004, 4:199-210