



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“CONSTRUCCIÓN DE INMUNÓGENOS
CAPACES DE INDUCIR ANTICUERPOS
NEUTRALIZANTES CONTRA VIH”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

CLAUDIA LISETTE CHARLES NIÑO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN

COMITÉ TUTOR:

Dr. LUIS PADILLA NORIEGA Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA.

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de enero de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CHARLES NIÑO CLAUDIA LISETTE** con número de cuenta **505017507** con la tesis titulada "**Construcción de inmunógenos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes de VIH**", realizada bajo la dirección del Dr. Karen Manoutcharian Airapetian:

Presidente: DR. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA
Vocal: DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA
Secretario: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
Suplente: DR. JULIO CESAR CARRERO SÁNCHEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de Mayo de 2011.


Dra. María Del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al CONACYT por la beca de manutención recibida (CVU: 225680)
- A mi tutor principal : Dr. Karen Manoutcharian
- A mi Comité Tutor: Dr. Luis Padilla Noriega y Dr. Abraham Landa Piedra.
- Al Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- Agradezco principalmente a Dios quien me ha dado vida, salud y el amor de mucha gente.
- A las personas más importantes de mi vida que han estado a mi lado en este largo camino.

Perdón por los días de juego que no pude darte: Grecia.

Gracias por amarme, creer en mí, por abrirme camino, por ser el único y excelente hombre que eres: Cesar.

¡Los amo!

Agradezco también a:

- Mis herm@nas quienes me han apoyado desde lejos y siempre han estado ahí para reconfortarme en los momentos difíciles.

Idalia, Nelly, Erika, Griselda, Georgina y Emmanuel.

- Mi mejor amiga quien nunca me ha dejado a pesar de la distancia.

Q.C.B. Tania Mancilla Velázquez

- A la fam. Pedroza por sus palabras de aliento, por dejarme ser parte de su familia y tolerarme en mis abundantes ratos de histeria y especialmente a Suegri por haberme alimentado con tan deliciosa comida.

Lucy, Suegri y Hugo.

- Mis amigos en Monterrey quienes siempre me han escuchado y han estado en los momentos más importantes de mi vida.

Q.C.B. Alma Riojas, Q.C.B. Virginia Tamez, M.C.P. Mario Almeida, Q.C.B. Ulises Baez, Q.C.B. Rolando Escobedo, Q.C.B. Mariano Roque.

- Mis amigos y compañeros de laboratorio quienes me ayudaron y apoyaron en mejorar día a día, además de siempre estar dispuestos a colaborar en mis experimentos.

Lic. Rene Lerdo, Doc. José Francisco Gallardo, M. en C. María Elena Munguía, Alejandra Peredo, M en C Ivan Hernandez, Biol. Jairo Rosas, Biol. Geraldin Urdapilleta, Doc. Gonzalo Acero, M en C. Roxana Perez, Doc. Luis Hernandez, Doc. Angel Díaz, QFB Dora Franco.

- Mis tutores quienes ayudaron a mi formación.

Dr. Luis Padilla Noriega y Dr. Abraham Landa Piedra

- Mis “tutores no reconocidos” quienes me formaron sin más interés que la amistad.

Dra. Ana Rivas Estilla, Dra. Erika Rendon, Dr. Luis Felipe Montaña, Doc Gonzalo Acero Galindo, M en C Erika Segura, M en C Maria Elena Munguía.

- A CONACYT por darme una beca de manutención que me permitió realizar mi vida personal a la par de la profesional.
- A la UNAM por darme el honor de formar parte de esta máxima casa de estudios.
- Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por permitirme realizar mi tesis en sus instalaciones.
- Al Posgrado en Ciencias Biológicas por darme la oportunidad de cumplir mis objetivos profesionales y a todo el personal administrativo, quienes siempre me trataron como una persona y no como una matrícula. Especialmente a Lic. Lilia Espinoza, Lic. Lilia Jiménez y Dr. Ernesto Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS POR ASESORÍA TÉCNICA

Agradezco sinceramente la asistencia y asesoría técnica recibida para la realización de ésta tesis de las siguientes personas:

- M en C María Elena Munguía Zamudio
- Biol. Gonzalo Acero Galindo
- Dr. Cesar Pedroza Roldán
- Dra. Goar Gevorkian Markosian
- Dr. Felipe Masso Rojas
- Dr. Luis Felipe Montaña Estrada
- Dra. Mónica Viveros

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres: Sra. Rosa Elia Niño Silva y Sr. Manuel Charles Torres por haber hecho de mí la mujer que soy. Cada triunfo a lo largo de este camino fue guiado por los valores que he visto en ustedes: Responsabilidad, Sacrificio, Compromiso, Respeto, Amor y Fe en Dios. Cada fracaso lo enfrente tratando de seguir su ejemplo de Perseverancia, Sencillez, Paciencia y Fe en Dios.

Papá, agradezco cada noche y madrugada que trabajaste para comprar mis libros, pagar mi matrícula en la universidad, comprar mi material. Cuando no hubo trabajo, agradezco cada hora que pasaste de pie en una fila interminable bajo el sol ardiente de Monterrey para conseguirme una beca y pudiera seguir mis estudios. Agradezco cada palabra de aliento, tu mano en mi cabeza cuando llegabas del trabajo y me veías estudiar. Gracias por los consejos, gracias por siempre estar ahí para mí. Te quiero mucho.

Mamá agradezco cada madrugada que te levantaste a despertarme para ir a la universidad. Te agradezco todas las conversaciones que sembraron en mí la perseverancia y la superación profesional. Gracias por los sacrificios que has hecho por darme siempre lo mejor que podías y en ocasiones hasta lo que no podías. Agradezco que siempre creyeras en mí y nunca frenaras mis sueños. Gracias por tu “*piojito*” cuando fracase... ahora en el posgrado lo extrañé físicamente, pero tus palabras por teléfono siempre estuvieron ahí. Te quiero mucho.

Siempre agradeceré que dentro de las cosas que estaban a su alcance siempre buscaran y se esforzaran por darme lo MEJOR. Jamás podre pagar esta deuda, pero al menos les dedico este título profesional. Los quiero mucho.

INDICE

Resumen	10
Abstract	11
Introducción	12
Antecedentes	14
Justificación Metodológica	44
Hipótesis, Objetivos e Impacto del proyecto	48
Metodología	49
Clonaciones	53
Extracción de ADN	55
Amplificación y purificación de fagos recombinantes	56
Inmunización , extracción de suero y ensayos inmunoenzimáticos	57
Ensayos de neutralización	59
Ensayos de bioselección	60
Cuantificación de citocinas	62
Ensayos de proliferación celular	63
Análisis estadístico	64
Resultados	65
Discusión	82
Referencias	89

ABREVIATURAS

μL	Microlitro
Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo Monoclonal
AcN	Anticuerpo Neutralizante
ADCC	Citotoxicidad mediada por anticuerpos
ADCVI	Inhibición viral dependiente de anticuerpos mediada por células
ADN	Dexosirribonucleic acid
bAcN	Anticuerpo ampliamente neutralizante
BFL	Inmunógeno en fago M13 recombinante de la biblioteca de epítopos al azar a partir de la secuencia nominal del epítipo L
CDR	Región determinante de la complementariedad en la región variable de una inmunoglobulina.
CMI	Inactivación mediada por complemento
COs	Buffer de carbonatos
C_H	Región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELN	Inmunógeno en fago M13 recombinante con la secuencia nominal del epítipo L
FRCs	Formas recombinantes circulantes
GK1	Inmunógeno en fago M13 recombinante con la secuencia de un epítipo no relacionado. Utilizado como control negativo.
Gp120	Glicoproteína presente en la superficie del VIH
HCl	Acido clorhídrico
IC₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de la infección del VIH en un cultivo celular.
Ig	Inmunoglobulina
kD	kiloDaltones
Loop V3	Región variable tres de la proteína gp120 del VIH
LTC	Linfocito T Citotóxico
LTR	Región terminal larga
NAC	Consorcio internacional de anticuerpos neutralizantes contra el VIH.
NaOH	Hidróxido de sodio
pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer salino de fosfatos
PBS-T	Solución de Tween al 0.2% diluido en PBS 1x
PEG	Polietilen glicol
pVIII	Proteína VIII de la superficie del fago M13 recombinantes
rpm	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TG1	Cepa de <i>Escherichia coli</i>
V3	Región variable número 3 o loop V3 de la proteína gp120
V_H	Región variable de la cadena pesada de una Inmunoglobulina
VHB	Inmunógeno en ADN de la biblioteca de epítopos al azar a partir de la secuencia nominal del epítipo L
VHP	Inmunógeno en ADN con la secuencia nominal del epítipo L
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VVH	Inmunógeno en ADN con la secuencia de un epítipo no relacionado. Utilizado como control negativo.

RESUMEN

Un gran obstáculo en la generación de anticuerpos neutralizantes contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es la alta variabilidad antigénica presente en sus epítomos que provoca un escape de la respuesta inmunológica. En este trabajo se emplea un nuevo tipo de inmunógeno basado en una biblioteca de epítomos variables, es decir, un pool de variantes al azar de un determinado epítomo. Hipótesis: Inmunógenos construidos con múltiples mutaciones dentro de un epítomo de gp120 del VIH inducirán respuesta inmune más amplia y diversa contra el virus que la inducida por inmunógenos del epítomo nominal. Metodología: Se construyó una biblioteca de epítomos variables con base en el epítomo ³¹⁸RGPGRAFVTI³²⁷ (loop V3 de la proteína gp120 de VIH) para ser empleada como inmunógeno. Esta misma biblioteca fue construida tanto en contexto de ADN como en fago M13 recombinante, por lo tanto, se generaron dos bibliotecas. Grupos de ratones Balb/c fueron inmunizados con ambas construcciones y sus respectivos controles. Los sueros inmunes generados fueron probados en diversos ensayos: ELISA, Dot blot, Bioselección y Ensayos de neutralización. Resultados: Los sueros generados por nuestros inmunógenos alcanzan una amplitud aproximada al 60% y una potencia de 25-60% al ser probados en ensayos de neutralización contra aislados primarios de VIH. Dichos aislados neutralizados incluyen Formas Circulantes Recombinantes, reportadas como resistentes a la neutralización. Conclusión. Estos resultados indican que los inmunógenos basados en bibliotecas de epítomos variables generan una buena respuesta neutralizante contra el VIH. Este nuevo concepto de inmunógeno sugiere ser muy prometedor para enfrentar al VIH, pero quizá también para combatir muchos otros patógenos o enfermedades que también presentan alta variabilidad antigénica (virus de hepatitis C, virus del Dengue, virus de la Influenza, cáncer, etc.).

ABSTRACT

Antigenic variability of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) is a serious issue in the development of an effective vaccine. The immunogens capable of inducing broadly neutralizing antibodies could be useful to attack the antigenic variability and to avoid the immune escape. In this study, we developed a novel type of immunogen that contains a mixture of random peptides based on the wild-type sequence of an epitope. We called this immunogen as variable epitope library. Hypothesis: The immunization of a variable epitope library based on a gp120 HIV epitope will elicit an immune response broad and diverse against the HIV. Material and methods: We constructed a variable epitope library based on an epitope derived from the loop V3 of gp120. The same immunogen concept was used for constructing two libraries, one as DNA and another as recombinant M13 phages. Indeed, we constructed the control immunogens in both formats as DNA and phage M13 (nominal epitope and non related epitope). Groups of mice were immunized with either DNA or phage M13 library and its respective controls. The immune sera were used in gp120- and whole virus- ELISA, gp120-Dot blot, biopanning and neutralizing essay. Results: We demonstrated that immune sera elicited by the libraries were capable of neutralizing primary HIV isolates with a breadth of 50% and a potency of 25-60%. The neutralized primary isolates were from diverse subtypes of HIV and of recombinant circular forms, which are neutralizing resistant. Conclusion: Our results showed that the immunogens based on a variable epitope library were capable of elicit an efficient neutralizing humoral response against HIV. This novel concept of immunogen may be convenient as vaccine against HIV but maybe also for attacking other variable pathogens as Hepatitis C virus, Dengue Virus, Flu Virus, etc.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existen 33.3 millones de personas infectadas por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) en todo el mundo¹. Tan solo en México existen alrededor de 140,000 personas con la enfermedad causada por la infección del VIH: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)². La ausencia de un tratamiento que elimine el VIH presente en el hospedero y/o evite el deterioro general y con ello la muerte hace urgente la necesidad de una vacuna.

En casi ya 30 años de búsqueda por un inmunógeno que genere una respuesta inmune protectora contra el virus, se han propuesto múltiples y diversas estrategias. Sin embargo, aun no se tiene una vacuna eficaz. Si bien esta búsqueda ha generado grandes aportaciones al conocimiento tanto del virus como de su patogenicidad, la necesidad de encontrar un inmunógeno efectivo continúa siendo una prioridad. La estrategia contra el VIH debe ser muy distinta a como se han abordado otros patógenos, pues los inmunógenos clásicos no son efectivos contra el virus^{3,4,5}. Una de las razones de la inefectividad de los inmunógenos clásicos es que la población viral presente en el hospedero es dinámica, es decir, constantemente se generan cepas virales mutantes⁶. Esto dificulta la eliminación del virus por el sistema inmunológico, pues mediante un proceso de selección natural las mutantes virales que evaden el sistema inmunológico se establecen como predominantes en el hospedero⁷. Esta constante generación de mutaciones representa un gran problema en la generación de inmunógenos que evoquen respuesta inmune protectora contra el VIH.

En esta tesis se expone la construcción de un inmunógeno con un abordaje distinto y lógico que tiene como objetivo atacar el problema de la variabilidad antigénica. Mediante la construcción y uso de bibliotecas de variantes al azar de un epítipo de VIH se logró inducir una respuesta humoral más amplia contra variantes de un epítipo que la obtenida con el uso de inmunógenos que presentan solo el epítipo nominal u original. Creemos que esta estrategia puede no solo ser utilizada en la infección por VIH, sino en otros patógenos de naturaleza variable como lo son el virus de la hepatitis C, el virus de la influenza, el virus del Dengue, etc.

“Vale la pena conocer al enemigo... entre otras cosas por la posibilidad de que algún día se convierta en un amigo”.

Margaret Thatcher

ANTECEDENTES

Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana es un miembro de la familia *Retroviridae*, del género *Lentivirus*. Ha sido clasificado dentro de esta familia por que posee un genoma de ARN de cadena positiva y para su replicación es necesaria la transcripción reversa a ADN y la posterior integración al genoma del hospedero. Se agrupó en el género *Lentivirus* debido a que su período de incubación es muy largo; la progresión a SIDA puede tardar hasta 25 años después de la infección. Además una característica particular que comparte con los virus del género es que puede infectar células vecinas a las que ocupa sin necesidad de liberar viriones, mediante la formación de sincicios⁸. Según la secuencia de su genoma ha sido subdividido en tipo 1 y tipo 2, sin embargo el causante de la pandemia es el tipo 1⁹. Se ha acordado que solo al referirse al tipo 2 debe especificarse⁹; si el número 2 no aparece en el nombre se entiende que se hace referencia al tipo 1. Debido a que esta tesis está solamente enfocada al VIH tipo 1 seguiremos esta recomendación refiriéndonos a éste solo como VIH.

El VIH presenta una gran variabilidad que ha generado una compleja clasificación en grupos, subgrupos y cuasiespecies (Fig 1). Inicialmente el virus fue clasificado en los siguientes grupos: el grupo “M” (del inglés “main/principal”), el grupo “O” (del inglés “outliers/atípicos”) y el grupo “N” (del inglés “new/ nuevo”) ⁹. Recientemente se identificó un nuevo grupo en una mujer de Camerún y se le encontró un estrecha relación con el virus de inmunodeficiencia de simios-gorilas, a éste se le designó como el grupo “P”¹⁰. Dentro de estos grupos, el grupo M es el más frecuente y éste a su vez ha sido dividido en los siguientes subgrupos: A,B,C,D,F,G,H,J,K y en las formas recombinantes (FRC's): A_E, A_B, etc. De estos grupos el que está presente en un mayor porcentaje de personas infectadas a nivel mundial es el subgrupo B⁹. En México la población infectada está predominantemente infectada con el subgrupo B¹¹.

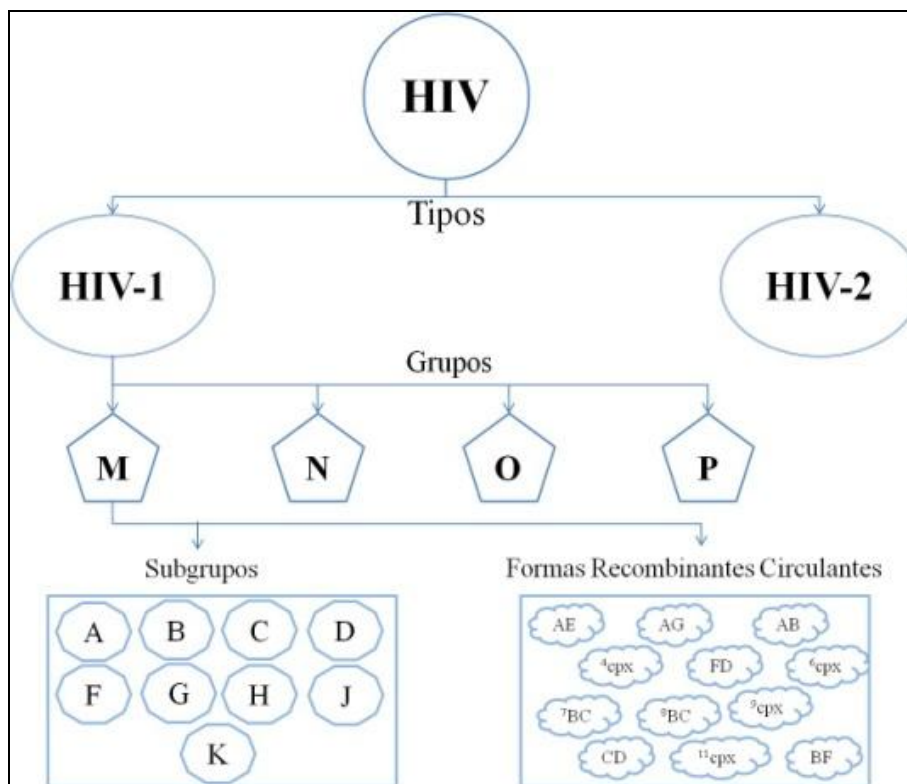


Fig. 1. Organización filogenética del VIH. Actualmente se conocen dos tipos, cuatro grupos, nueve subgrupos y al menos 12 FRCs del VIH.

El ARN del VIH codifica para 15 proteínas que han sido clasificadas según su función ¹². Dicha clasificación se enlista a continuación: a) proteínas de la envoltura: gp120 y gp41, b) estructurales: p24, p17, p7 y p6, c) enzimas virales: IN Integrasa, RT Transcriptasa reversa, PR Proteasa y d) proteínas reguladoras y accesorias: tat, rev, nef, vif, vpr y vpu. Cada una de ellas tiene una participación crucial en diferentes pasos del ciclo viral (Tabla 1 y parte superior derecha de la Fig. 2).

El ciclo de replicación del virus ha sido descrito como un proceso de siete pasos (Fig. 2): entrada, síntesis de ADN, integración, transcripción, procesamiento de ARN y transporte, síntesis de proteínas y ensamblaje de nuevas partículas virales ¹². Para la entrada del virus es necesaria la unión de la proteína de envoltura gp120 con un receptor (molécula CD4) y un co receptor (CCR5/CXCR4) de la célula huésped. Una vez que las membranas se fusionan el core del virus es liberado al citoplasma de la célula.

Tabla 1. Proteínas virales y su función.

Proteína	Tamaño (kDa)	Función
Gag	p24(p25)	Cápside (CA) proteína estructural. Ensamblaje de la partícula viral e infectividad.
	p17	Matriz (MA) proteína miristilada. Estabiliza la incorporación de las proteínas Env en los viriones maduros.
	p6	Participa en gemación.
	p7	Proteína de la nucleocápside (NC); ayuda en la transcripción reversa.
Polimerasa (Pol)	p66, p51	Transcriptasa reversa (RT); ARNsa H dentro del core.
Proteasa (PR)	p10	Procesamiento post-traducciona l de proteínas virales.
Integrasa (IN)	p32	Integra el ADNc viral en el ADN celular.
Envoltura (ENV)	gp120	Glicoproteína de superficie (SU). Interacción con receptores de la célula al momento de iniciarse la entrada del virus.
	gp41	Glicoproteína transmembranal (TM). Media la fusión de la membrana viral con la celular después de la interacción con ENV.
Tat	p14	Transactivación. Permite la elongación eficiente durante la transcripción.
Rev	p19	Regula la expresión viral del ARNm.
Nef	p27	Puede incrementar o decrecer la replicación viral.
Vif	p23	Incrementa la infectividad del virus y la transmisión célula: célula; ayuda en la síntesis de ADN proviral y/o al ensamblaje.
Vpr	p15	Ayuda en la replicación viral y en la transactivación.
Vpu	p16	Ayuda en la liberación viral; rompe los complejos gp120/CD4.
Vpx	p15	Ayuda a la infectividad.

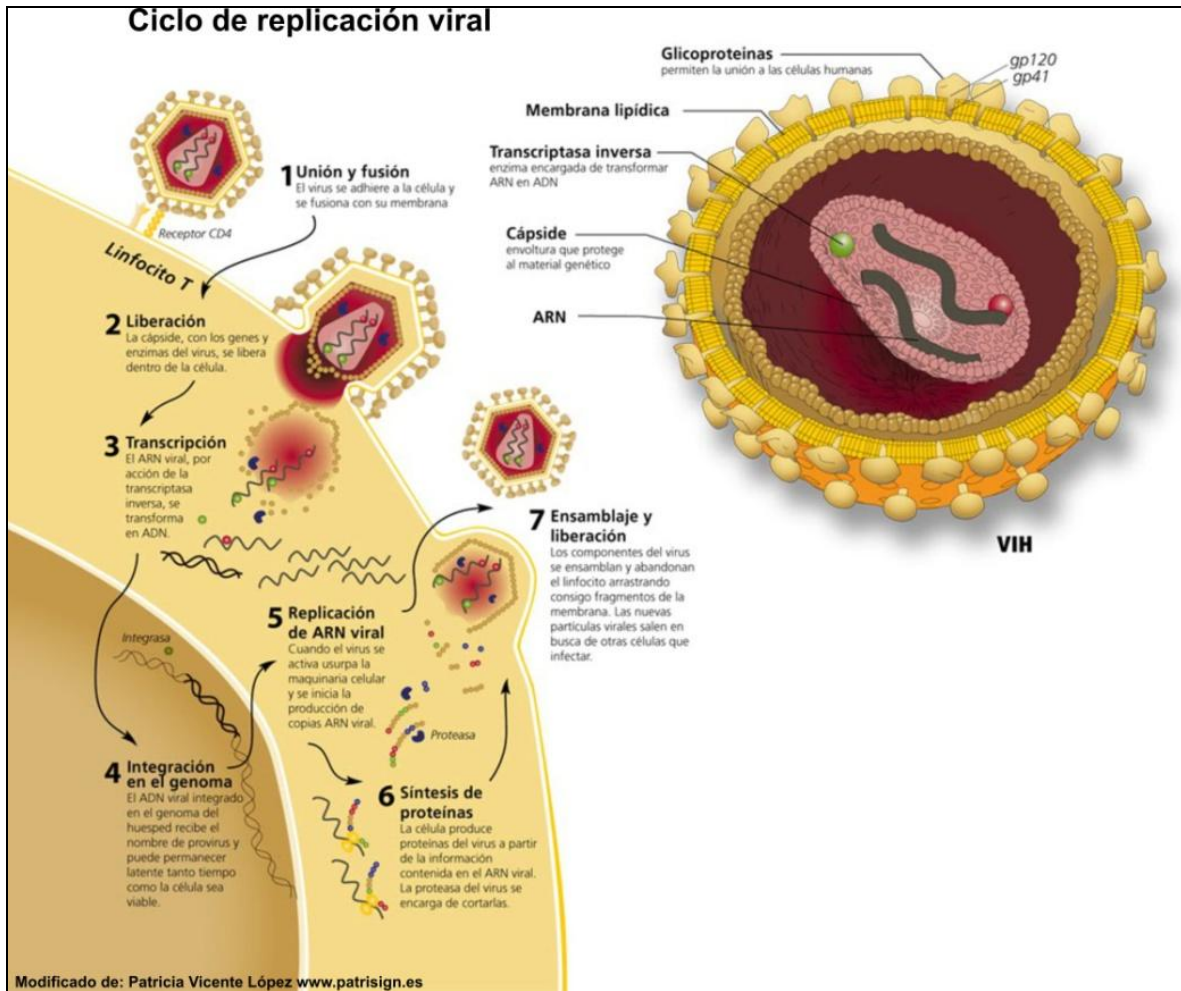


Fig. 2. Estructura y ciclo de replicación viral. El VIH posee un genoma de aproximadamente 10 kb que codifica para 15 proteínas (la figura muestra algunas). Cada proteína tiene una función específica dentro del ciclo de replicación viral, el cual se describe como una serie de siete pasos que culminan en la generación de nuevas partículas virales.

La pérdida de la envoltura del virus se lleva a cabo por factores celulares y las proteínas virales p17, vif y nef. Posteriormente el ARN es retrotranscrito a ADN por la enzima viral RT. La proteína vpr conduce el ADN viral a la membrana nuclear donde entra a través de los poros. Antes de la integración el ADN puede encontrarse en forma lineal y dos formas circulares con una o dos regiones de repetición terminal larga (LTR). Las formas circulares pueden ser activadas por las LTR a través de factores de transcripción celulares como el factor nuclear NF- κ B, y generar las proteínas rev, tat y nef. El ADN es integrado al genoma

celular por la IN viral ¹². Utilizando la maquinaria celular el ADN es transcrito a ARN, el cual posee sitios de unión a la proteína rev facilitando su transporte al citoplasma para su traducción. La traducción del material genético del virus genera poliproteínas precursoras que son procesadas por proteasas celulares en proteínas funcionales. Las proteínas virales son entonces reclutadas en la membrana celular y son empaquetadas para formar los nuevos viriones que geman de la célula huésped ⁸.

Esta tesis aborda el tema de generación de anticuerpos neutralizantes (AcN), específicamente contra la proteína gp120. Para la generación de anticuerpos neutralizantes es necesario conocer la estructura de nuestra proteína de interés y conocer un poco más a detalle el proceso de entrada del virus que es el que queremos bloquear.

Entrada del virus a la célula

La entrada del virus a la célula hospedero consiste de una serie de pasos que culminan en la fusión de las membranas viral y celular (Fig. 2). Generalmente el virus utiliza la fusión mediada por receptores de la membrana celular para entrar; sin embargo, se ha visto que también puede entrar por una vía alternativa de endocitosis¹³. El evento inicial es la interacción de la proteína gp120 con receptores específicos de la célula. El receptor principal es una proteína tipo inmunoglobulina denominada CD4, la cual es expresada en la superficie de células T CD4+ y macrófagos¹⁴. Otros receptores que interactúan con gp120 que han sido reportados son la galactosilceramida presente en células de Schwann y oligodendrocitos y los receptores Fc de inmunoglobulinas presentes en neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, plaquetas y linfocitos B¹⁵. La unión de gp120 con CD4 genera cambios conformacionales en gp120, el cual expone sitios de reconocimiento para un correceptor¹⁴.

La interacción entre gp120 y un correceptor celular es parte crucial del proceso de entrada del virus. El correceptor puede ser un miembro del grupo de receptores de quimiocinas. Generalmente en la etapa inicial de la infección pueden encontrarse virus que infectan fácilmente a macrófagos y linfocitos primarios pero no a líneas inmortalizadas de células T. A estos virus se les nombró macrofagotrópicos (M-trópicos)¹⁶. En la etapa crónica se encuentran virus con capacidad de infectar líneas inmortalizadas de células T pero que han disminuido su capacidad para infectar macrófagos. A estos virus se les nombró linfotrópicos y tiene la capacidad de formar sincicios (T-trópicos)¹⁶. El uso preferencial del correceptor CCR5 por los virus M-trópicos y del correceptor CXCR4 por los virus T-trópicos se debe a que la expresión de correceptores celulares es específica de cierta población celular¹⁶. El uso preferencial de cierto correceptor también se utiliza para nombrar al virus como R5 (CCR5), X4 (CXCR4) y D/M (ambos CCR5 y CXCR4)^{16,17,18}.

La evolución del tropismo viral a lo largo de la infección ha sido asociada a la progresión de la enfermedad^{16, 17,19}. Los virus X4 generan mayores efectos citopáticos en la célula hospedera. Como comentábamos éstos virus tienen la capacidad de formar sincicios, los cuales permiten la infección célula-célula sin necesidad de la fase extracelular del ciclo viral y por lo tanto los virus X4 son menos susceptibles a inhibidores de entrada, como lo

son los anticuerpos o tratamientos con quimiocinas inhibitorias. Un cambio de virus R5 a X4 o D/M en la población viral predominante de un paciente es asociado a una rápida progresión al SIDA^{16, 17}. A pesar de que los síntomas del SIDA pueden presentarse en ausencia de virus X4, se ha documentado que estos virus surgen y pueden encontrarse hasta en un 50% de pacientes infectados que presentan deterioro inmunológico²⁰. Además, se ha demostrado *in vitro* que las células T CD4+ no activadas (*naive*) son infectadas principalmente por los virus X4 cuando las células son cultivadas en presencia de ambos tipos virales y, que la velocidad de reducción de células T totales correlaciona con el porcentaje de células T no activadas infectadas²¹. Dado que la pérdida de células T lleva a un deterioro inmunológico, este hallazgo puede ser uno de los factores involucrados en la asociación de la presencia de virus X4 con la rápida progresión a SIDA^{22,23}.

Después de la unión de gp120 con el correceptor se inicia el proceso de fusión de membranas en donde participa gp41. La unión gp120/correceptor induce un cambio conformacional en gp41 y expone regiones previamente no disponibles²⁴. Una de ellas es el dominio de fusión altamente hidrofóbico en su región amino terminal (N-Terminal), que se relocaliza para tener un contacto directo con la membrana celular. Se ha propuesto que este contacto induce defectos en la membrana desestabilizándola para que la fusión se lleve a cabo²⁴ (Fig. 3).

Se ha sugerido la existencia de un tercer factor involucrado en la entrada del virus. Este nuevo factor es la proteína disulfuro isomerasa (PDI), la cual es una oxido reductasa asociada a membrana²⁵. Ésta actúa después de la unión a CD4 pero antes de la unión al correceptor. La participación de PDI se sugiere dentro de la hipótesis que contempla que el cambio conformacional de gp120 depende de una acción coordinada de un sistema tripartito (gp120-gp41-PDI), en el cual PDI ayuda a reducir la energía de activación requerida para el rearrreglo conformacional²⁵.

A pesar de que la entrada del virus a la célula es un proceso que puede ser bloqueado al evitar cualquiera de las interacciones entre las proteínas de envoltura y las proteínas celulares, elegimos trabajar con la proteína gp120 debido a que su participación es primordial^{26,27}. Ya que como mencionamos, la proteína gp41 es inaccesible dada su

naturaleza y solo es expuesta después de la unión CD4/gp120. Aún así, hablaremos un poco de la estructura de ambas proteínas.

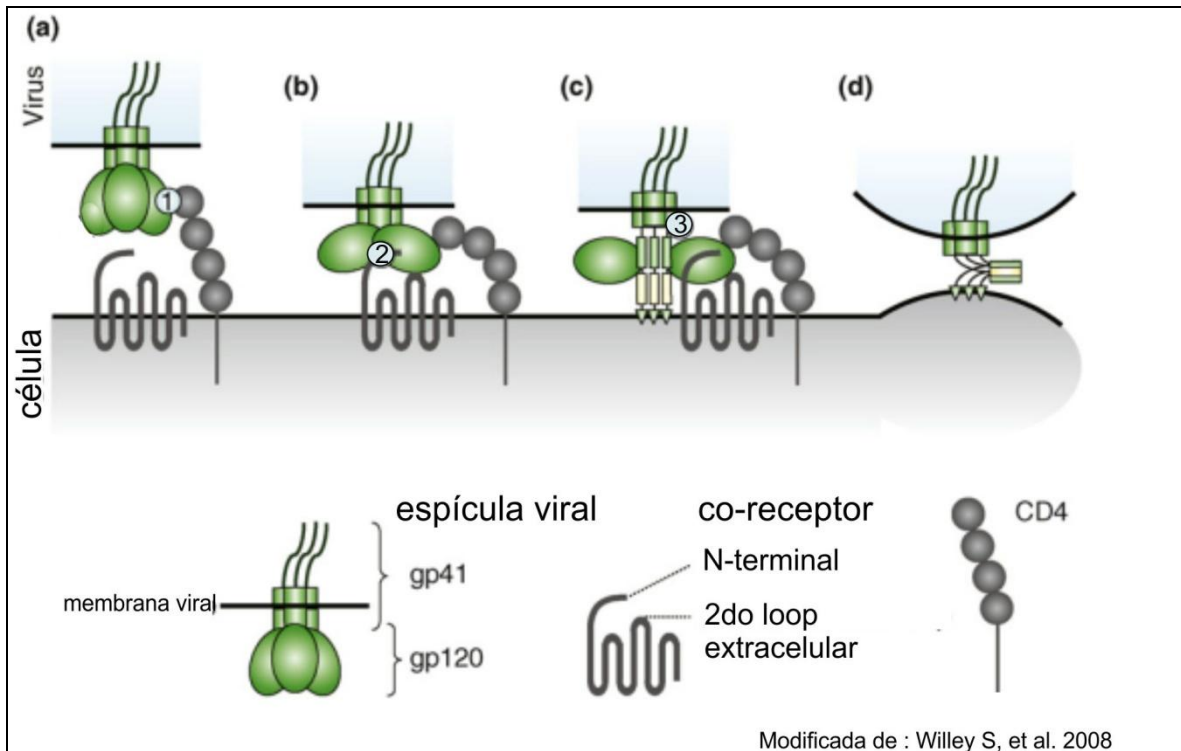


Fig. 3. Fusión de las membranas celular y viral. La región C4 de la proteína viral gp120 se une a la región D1 de la molécula celular CD4 (a). La unión gp120/CD4 provoca un cambio de conformación en la espícula viral que permite la interacción con el co-receptor (b). La porción N-terminal y el segundo loop extracelular del co-receptor interactúan con la región lámina puente y con el loop V3 de gp120, respectivamente. Esto nuevamente provoca un cambio conformacional en la espícula que expone el ectodominio de gp41 (c), esta molécula contiene una región hidrofóbica llamada “péptido de fusión”, el cual es insertado en la membrana celular. Las regiones complementarias de las tres subunidades de gp41 se pliegan sobre sí mismas para formar un haz de seis hélices que acerca las membranas viral y celular acelerando la fusión (d). Posibles sitios de acción por anticuerpos neutralizantes: (1) sitio de unión con CD4 (2) sitio de unión con el co-receptor y (3) región membrana proximal externa de gp41.

Proteínas de envoltura

Las glicoproteínas virales de superficie, gp120 (SU) y la transmembranal, gp41 (TM) son generadas a partir de un precursor. Durante la traducción del gen *env* ocurre un evento de cambio de marco de lectura que resulta en un poliproteína precursora denominada gp160, la cual es altamente glicosilada al llegar al aparato de Golgi. Se ha descrito que esta poliproteína es procesada por furina o endoproteasas celulares similares

durante el tráfico hacia la membrana celular dando como resultado las proteínas gp120 y gp41. Una vez generadas, las proteínas permanecen unidas a través de uniones no covalentes y son expresadas en la superficie de la membrana de la célula hospedera. Ahí permanecerán hasta el proceso de gemación donde formarán parte de la envoltura de nuevas partículas virales²⁶.

La envoltura viral es una bicapa lipídica donde las proteínas gp120 y gp41 se encuentran formando espículas²⁴. Durante el proceso de gemación la nueva partícula viral toma parte de la membrana celular del huésped para crear su envoltura. Si bien el VIH no es un virus de naturaleza lítica²⁴, a través de su replicación y la constante remoción de una parte de la membrana celular puede debilitarla de tal forma que puede provocar el colapso celular. La destrucción de células blanco mediante este proceso es uno de los mecanismos que explican la pérdida de linfocitos T CD4+ a lo largo de la infección²⁸. La envoltura viral contiene entre 7 a 10 espículas²⁹, las cuales son cruciales para el proceso de entrada del virus a la célula. El conocimiento de la estructura de la espícula viral tiene una gran implicación en la generación de anticuerpos neutralizantes (AcN).

La espícula viral en su unidad funcional es un complejo heterodímero de trímeros³⁰ (Fig. 4). Se describe así debido a que la espícula como estructura presenta dos subunidades formadas por proteínas diferentes (gp120 y gp41) además, cada subunidad es compuesta por tres moléculas idénticas. Cada molécula del trímero de gp120 está asociada no covalentemente con una molécula del trímero de gp41. Aunque se ha demostrado que este complejo es sin duda la unidad funcional de la espícula, no se descarta que existan otras entidades presentes en la envoltura como lo son monómeros, dímeros o tetrameros de una o ambas proteínas^{29,31}. Se ha propuesto que la presencia de estas otras formas puede deberse a mutaciones que generan una disociación de los complejos funcionales o una trimerización ineficiente en el aparato de Golgi, lo que en cualquiera de los casos expone la proteína gp120 monomérica o dimérica sobre la superficie²⁹. Esto podría explicar por qué la mayoría de los anticuerpos generados en la infección natural no son neutralizantes^{32,33}, pues al unirse al monómero o dímero no funcional no se estaría evitando la entrada del virus a la célula.

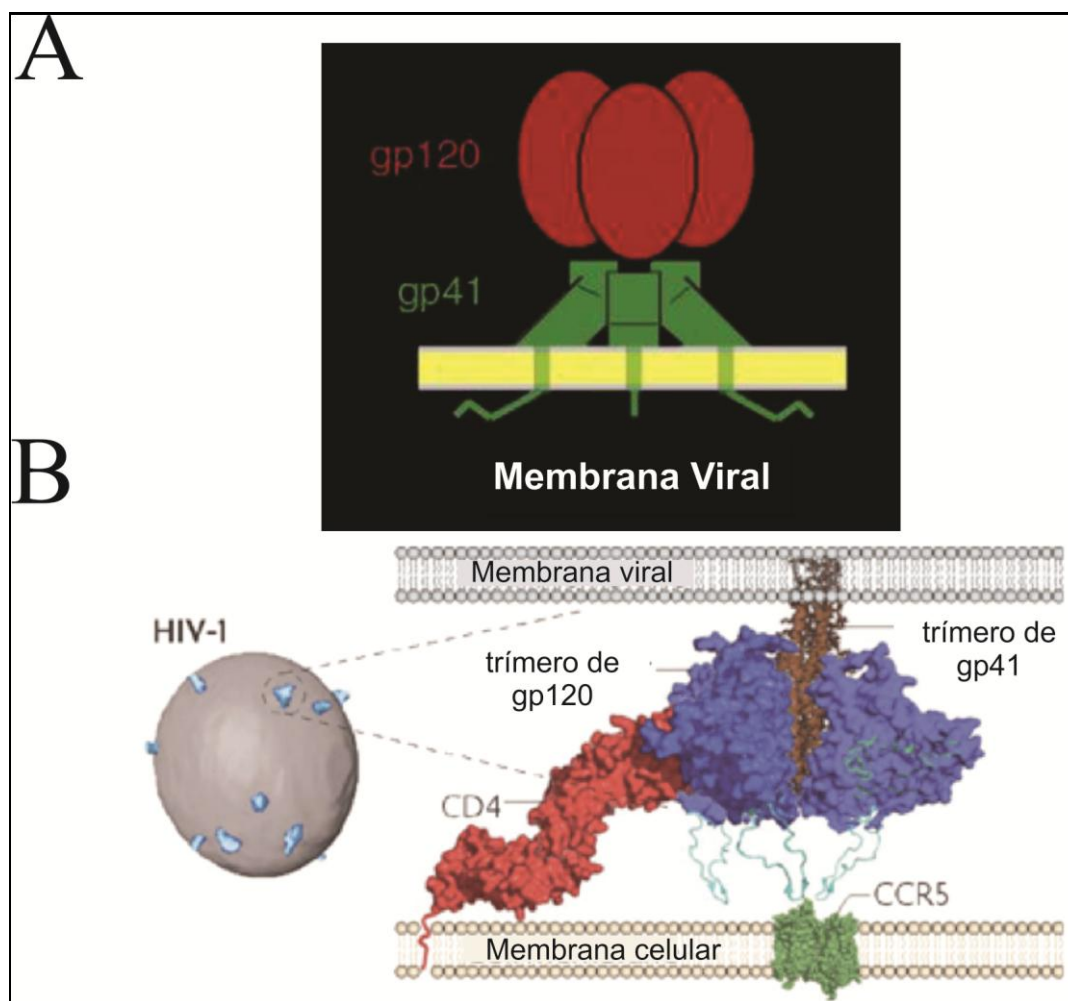


Fig. 4. La espícula viral como un complejo heterodímero de trímeros. En A se muestra una caricatura del trímero de gp120 unido no covalentemente con el trímero de la proteína transmembranal gp41. En B se muestra una representación tridimensional de la estructura cuaternaria de la espícula viral.

Proteína gp41

La proteína gp41 es una molécula transmembranal localizada en la membrana del virus, su función es mediar la fusión entre la membrana viral y la membrana celular después de la unión de la gp120 al receptor de la célula. Esta proteína está compuesta de un ecto dominio N-terminal, un dominio transmembranal y un segmento intraviral C-terminal. El dominio N-terminal, también llamado péptido de fusión, es un segmento que inicia la fusión de las membranas y permite la entrada del virus a la célula; este péptido es hidrofóbico además de ser rico en glicinas²⁴.

Proteína gp120

La proteína gp120 es una glicoproteína de 120 kiloDaltones (kD). Su estructura está organizada en dominio interno, dominio externo y lamina puente²⁶ (Fig. 5A). De acuerdo a esta organización el sitio de unión al receptor se encuentra en una cavidad hidrofóbica (nombrada como Phe43) formada por la intersección de los tres dominios y el sitio de unión al correceptor está localizado en parte del dominio externo y la lamina puente²⁶.

Por otro lado, según su secuencia la proteína gp120 se organiza en 5 regiones conservadas (C1-C5) y cinco variables (V1-V5)²⁶ (Fig. 5 B). Las regiones C1, C5, V1 y V2 forman parte de la estructura del dominio interno. Las regiones C1 y C5 son las principales áreas de contacto con la gp41 mientras que las regiones V1 y V2 son importantes para el enmascaramiento de epítomos conservados en la interacción con el correceptor³⁴. Las regiones C2, C3 y C4 forman el centro hidrofóbico de la proteína y se han relacionado con el encubrimiento de epítomos importantes de los sitios de unión al receptor y co receptor de la glicoproteína³⁵. El inicio de las regiones V1 y V2 (*V1/V2 stem*) forma parte de la estructura de la lámina puente. El dominio externo está formado por las regiones V3-V5. Aún no se ha elucidado bien la función de V4 y V5, pero se sabe que la delección de V4 lleva a un mal plegamiento de gp120³⁶. La región V3 forma parte del sitio de unión al co receptor junto con las regiones iniciales de V1/V2^{26,37}.

La región V3 está constituida por 34 a 36 aminoácidos flanqueados por dos cisteínas (posición según la cepa de referencia HXB2: 296 - 331) formando un asa o loop de superficie accesible²⁶. Según la comparación de múltiples secuencias de la región V3, se sabe que las regiones amino y carboxilo terminal y lo que se conoce como la cresta o corona del loop (“crown” o “crest”) poseen algunos aminoácidos conservados. En la cresta de la región V3 se encuentra el motivo GPG que forma parte de la secuencia del epítomo que trabajamos en esta tesis; RGPGRFVTI²⁷. El motivo GPG es rodeado de posiciones altamente variables que al variar modifican la estabilidad de la estructura secundaria de la región V3 y ésta influencia el uso de los correceptores¹⁸. La región V3 fue señalada como principal región de neutralización en 1989 debido a su inmunogenicidad, sin embargo fue considerada inapropiada como blanco de vacunas debido a la alta variabilidad de sus epítomos²⁷. Nosotros decidimos trabajar con un epítomo de esta región V3 justamente por

su inmunogenicidad y variabilidad. Para explicar el porqué nuestra hipótesis ve en la variabilidad del loops V3 como una ventaja más que una desventaja revisaremos primero algunos hallazgos inmunológicos encontrados en la infección natural y en la lucha constante contra la variabilidad antigénica del virus.

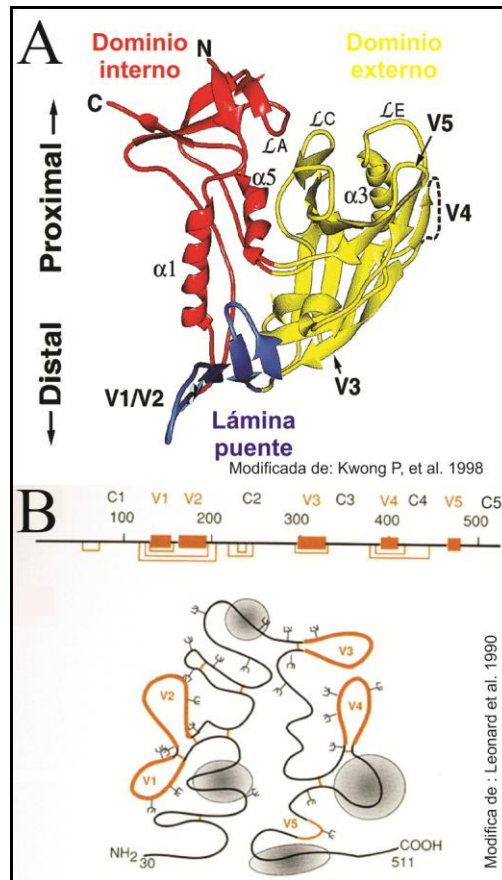


Fig. 5. Organización de un monómero de la proteína gp120. En A se muestra la organización en dominio interno, externo y lamina puente. En B se muestra la secuencia organizada en regiones constantes (C1-C5) y variables (V1-V5).

Respuesta inmunológica contra la infección por VIH

La infección por VIH y la progresión a SIDA es caracterizada por tres fases: fase aguda o infección primaria, fase de latencia y fase clínica o SIDA¹⁹ (Fig. 6). La fase de infección primaria es caracterizada por la presencia de altos niveles de partículas virales en plasma (4-11 días después de la infección) y la disminución de las células blanco del virus, las células T CD4+³⁸. La pérdida de células T CD4+ en la etapa aguda se ha calculado hasta en un 60% en el pico máximo de carga viral (aproximadamente día 10)³⁹, sin embargo en muy raras ocasiones se detecta debido a que el hospedero ignora los síntomas inespecíficos de la infección como mialgia, malestar general y fiebre. La seronegatividad en ensayos de ELISA o Western Blot puede prolongarse hasta 6 meses posteriores a la infección⁴⁰. La fase de latencia clínica se establece cuando, debido a la respuesta inmunológica contra el virus, la carga viral es disminuida y de alguna manera controlada. Sin embargo, en este período existe una continua replicación viral y una continua selección de mutaciones virales que permiten evadir al sistema inmunológico. En esta fase la pérdida de células T CD4+ es lenta pero constante (se calcula alrededor de 1% diario)³⁹. La infección por VIH puede permanecer en fase de latencia hasta por periodos de 8 a 10 años antes de progresar a SIDA (10% de los pacientes infectados progresan a SIDA en 2 o 3 años)¹⁹. La fase clínica de SIDA se establece cuando la excesiva pérdida de células T CD4+ lleva a un deterioro general del sistema inmune presentándose infecciones oportunistas, además de un aumento en la carga viral.

El conocimiento de la respuesta inmunológica contra la infección es imprescindible para el desarrollo de vacunas. El estudio del curso natural de la infección en pacientes ha generado datos importantes tales como la evolución de la respuesta inmunológica respecto a la evolución de la población viral⁶, factores genéticos que confieren susceptibilidad o resistencia a la infección por el virus^{41,42,43,44}, factores genéticos y virales que ayudan a establecer un pronóstico clínico⁴⁵, entre muchos otros datos^{46,47,48}. Otros datos inmunológicos relevantes han sido obtenidos del modelo preclínico en monos de la infección por el virus de inmunodeficiencia de simios SIV (*del inglés Simian immunodeficiency virus*)⁴⁹.

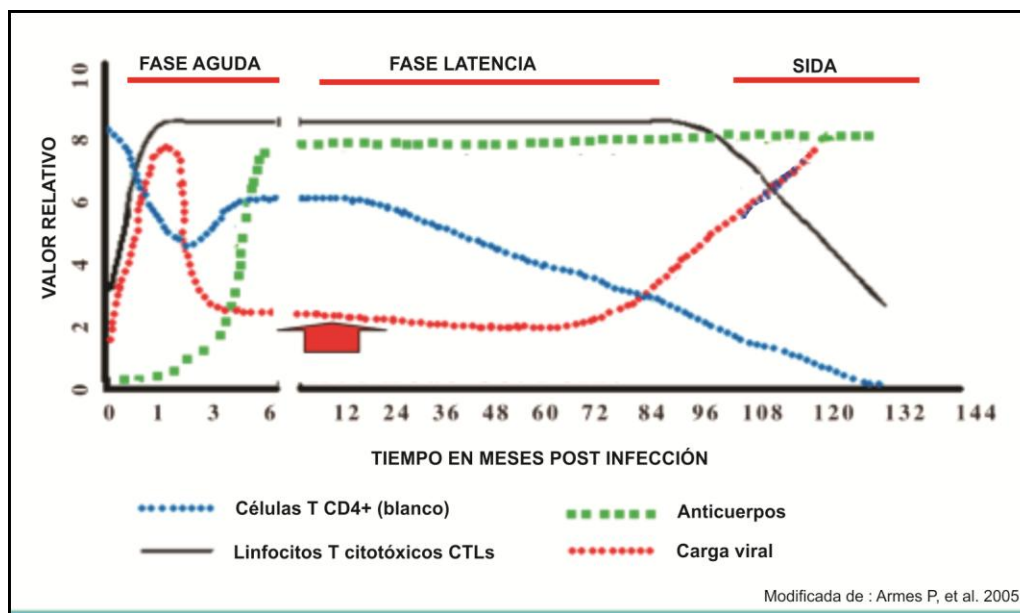


Fig. 6. Esquema representativo del curso natural de la infección por VIH. En la infección por VIH pueden distinguirse tres fases: aguda, latencia y SIDA. La fase aguda es caracterizada por una alta carga viral y una rápida disminución de células blanco. La respuesta específica de CTLs coincide con una disminución en la carga viral. La generación de anticuerpos contra VIH puede ocurrir hasta la octava semana. En la fase de latencia clínica se mantiene la respuesta inmune y la carga viral baja, mientras que la disminución de células blanco es lenta pero progresiva. La fase de SIDA se caracteriza por la pérdida de respuesta inmune específica y una drástica disminución de células blanco así como un aumento de la carga viral.

La mayoría de los individuos infectados generan una fuerte respuesta inmunológica contra el virus⁵⁰. Sin embargo, la especificidad de la respuesta inmunológica es la que está inversamente relacionada con la progresión de la enfermedad. Se ha mostrado que la ausencia de una respuesta inmunológica específica al inicio de la infección conduce a una drástica depleción de células T CD4+, y ésta disminución, a su vez está relacionada con una rápida progresión a SIDA^{22,51,52,53,54}. Por otro lado, una exacerbada respuesta inmunológica inespecífica parece ser un indicador más eficaz de rápida progresión a SIDA que la carga viral⁵⁰.

Un dato importante obtenido del estudio del curso natural de la infección es la caída de la carga viral alrededor de la 3er y 4ta semana después de la infección. Esta disminución

en la carga viral coincide con un aumento de linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos contra el virus. Debido a esto, y a que los anticuerpos que están presentes en la fase aguda no son capaces de neutralizar al virus, la respuesta citotóxica es considerada como principal en la contención de la viremia³². Se ha reportado que los LTCs tomados de pacientes infectados con VIH inhiben la replicación viral en cultivos de células CD4+ infectadas *in vitro*³². Borrow P y colaboradores demostraron la aparición de LTCs específicas contra proteínas derivadas de VIH como Env, Gag, Pol, Nef y Tat en pacientes en fase aguda de infección. Los pacientes que demostraron mayor actividad de LTCs contra estas proteínas mostraron una reducción de la carga viral en comparación a pacientes con menor actividad de LTCs sugiriendo la importancia de la aparición de LTCs específicas para la contención de la viremia^{32,46, 55,56}.

En los individuos infectados la generación de la respuesta humoral ocurre lentamente (entre la 6ta y 8va semana)⁵⁷. La mayoría de los anticuerpos generados en la fase aguda de la infección no son neutralizantes y los anticuerpos neutralizantes que aparecen alrededor de la 12ava semana sólo son efectivos en la neutralización hacia virus autólogos: virus que provienen de un mismo paciente^{57,6}. Es decir, los anticuerpos neutralizantes generados por un individuo sólo le sirven a él y no pueden ser utilizados para neutralizar los virus presentes en otros individuos infectados nombrados como virus heterólogos. La aparición de anticuerpos neutralizantes de virus heterólogos ocurre años después de la infección tan sólo en un 20% de los pacientes^{57,6}.

Sin embargo, la lenta generación de la respuesta humoral no significa que los Ac no tengan un papel importante en el control de la infección. Se ha estudiado el papel de las células B en la infección por VIH en diversos contextos. Por un lado, se ha reportado que el bloqueo en la generación de anticuerpos mediante la depleción de células B en macacos aumenta significativamente la carga viral y genera una rápida progresión a la enfermedad⁵⁸. Por otro lado, se ha demostrado que anticuerpos tardíos, que son incapaces de neutralizar virus autólogos tardíos presentes al momento del aislamiento de los anticuerpos, son capaces de neutralizar virus autólogos tempranos aislados meses antes⁵⁹. También se ha comprobado en macacos que la transferencia pasiva de anticuerpos neutralizantes *in vitro* ya sea antes o después del reto con el virus de la inmunodeficiencia de simios, protege de la infección⁶⁰.

Recientemente, se estudió un caso clínico donde un paciente infectado, sin tratamiento previo con antirretrovirales, fue tratado con rituximab, un anticuerpo monoclonal ampliamente utilizado para la depleción de células B CD20+ en el tratamiento de linfomas⁴⁸. La depleción de células B generó una disminución de anticuerpos neutralizantes autólogos y un aumento de $1.7 \log_{10}$ en la carga viral del paciente. El posterior restablecimiento de los anticuerpos neutralizantes en el paciente generó la disminución de la carga viral a niveles basales. Este trabajo concluye confirmado el papel de las células B en la contención a largo plazo de la carga viral y que los anticuerpos neutralizantes pueden ser más importantes en el control de la infección crónica de lo que se pensaba.

Además, los anticuerpos no neutralizantes referidos como solo anticuerpos de unión han sido implicados en una serie de mecanismos que contribuyen a contener la viremia. La unión de anticuerpos al virus libre o células infectadas promueve la eliminación del virus por mecanismos efectores mediados por el Fc del anticuerpo⁶¹. Los más frecuentes son la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), inhibición viral dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCVI) y la inactivación mediada por complemento (CMI)⁶¹. La transferencia pasiva de anticuerpos no neutralizantes pero desencadenantes de ADCVI fue capaz de conferir protección a macacos retados con el virus de la inmunodeficiencia de simios de manera oral⁶². Incluso se habla de que la protección del 30 % que logró la vacuna AIDSVAX en fase III fue debida a la generación de anticuerpos de unión no neutralizantes pero capaces de evocar citotoxicidad mediada por anticuerpos o la vía del complemento⁶³. Estos datos sugieren que la generación de la respuesta humoral contribuye de manera importante al control de la infección no solo con la neutralización directa de la entrada del virus sino con la eliminación o inactivación viral mediante otros mecanismos.

La respuesta inmunológica efectiva contra la infección por VIH no puede estar dada por un solo componente. A pesar de existir diferentes opiniones acerca del fracaso de las vacunas AIDSVAX y STEP se concuerda en que en adelante una vacuna óptima contra VIH necesita inducir ambas respuestas inmunes, tanto humoral como celular^{3,4,5,64}. Este

trabajo se enfoca en la respuesta humoral, sin embargo nuestro inmunógeno está basado en un epítipo de LTCs por lo que también contempló la generación de la respuesta celular.

Otro dato importante es, que para que una respuesta inmunológica sea efectiva debe ejercer una actividad antiviral amplia en contra de la gran diversidad del virus^{3,4,5,64}. A continuación volveremos a enfocarnos en la respuesta humoral concerniente a esta tesis y detallaremos los problemas que la variabilidad antigénica del virus ha causado en el desarrollo de inmunógenos inductores de anticuerpos neutralizantes.

Problemas en el desarrollo de vacunas basadas en anticuerpos.

La escasa generación de anticuerpos neutralizantes contra VIH en la infección natural es debida a algunos mecanismos virales de evasión inmunológica. Los principales mecanismos son los siguientes: 1) las proteínas de envoltura están altamente glicosiladas, lo que genera un enmascaramiento de regiones epitópicas importantes⁶⁵, 2) debido a la trimerización de las proteínas existe un encubrimiento de epítomos posiblemente vulnerables, que serían expuestos en la subunidad monomérica⁶⁶ y 3) alta variabilidad antigénica de los epítomos virales que provoca un escape inmune^{6,67}. La variabilidad antigénica es considerada como un problema importante al que se enfrenta el sistema inmunológico del individuo infectado, además de ser un gran obstáculo en la generación de vacunas efectivas³³.

Variabilidad Antigénica

La variabilidad antigénica del VIH que genera un continuo escape inmunológico es una característica fundamental de la patogénesis viral^{6,7,59}. Las causas de esta variabilidad son: la recombinación viral, la baja fidelidad de la transcriptasa reversa del virus y su carencia de un sistema de corrección de lectura 3'-5'. Se ha reportado que la tasa de mutación de la RT viral es de 1 por cada 10^5 pares de bases, que el genoma del virus es de aproximadamente 10^4 pares de bases y que se generan 10^9 - 10^{10} partículas virales cada día. Si hacemos un cálculo matemático sencillo obtendríamos que se están generando 10^8 - 10^9 mutantes diariamente⁵⁹.

A este número habría que añadir la recombinación entre virus presentes en una misma célula huésped. Se ha reportado que una célula infectada puede tener hasta 8 virus integrados en su genoma (provirus). La recombinación es una de las mayores fuentes de heterogeneidad genética de las poblaciones del VIH y evolución viral dentro del individuo infectado⁶⁸. Además de ser un mecanismo de evasión inmunológica ha sido involucrado en la resistencia a fármacos antivirales⁶⁹.

Durante la infección por VIH, el sistema inmunológico diariamente se encuentra con una gran diversidad de mutantes virales. Algunas de éstas presentan características que impiden su reconocimiento por el sistema inmunológico, lo cual les confiere una ventaja sobre otras mutantes que son fácilmente reconocidas y eliminadas. Aquellas mutantes virales que logran evadir al sistema inmunológico, por cualquiera que sea su característica, por simple selección natural se establecen en la población viral del individuo infectado⁶. Por establecer nos referimos a que esa mutante viral será la predominante, sin embargo la población viral en un individuo siempre es diversa y dinámica.

Cambios tan mínimos como el de un solo aminoácido en la secuencia de un epítipo puede evitar su reconocimiento por células inmunes previamente activadas por el epítipo nominal (original). Esto ocurre debido a que el epítipo mutado estimula a aquellas clonas de células B de memoria, cuyos receptores de superficie reconocen las secuencias originales del epítipo y no reconocen a nuevas variantes o mutantes favoreciendo la selección natural de mutantes inmunorresistentes. Este fenómeno ha sido nombrado pecado antigénico original (PAO) y fue descrito inicialmente en la infección por el virus de la influenza^{70,71,72}.

El PAO puede ser uno de muchos factores que limitan la efectividad de los anticuerpos neutralizantes generados tanto en la infección natural como por el uso de vacunas. Algunos inmunógenos basados en la presentación de un solo antígeno inducen respuesta humoral contra el antígeno nominal indicada por la neutralización de la cepa de laboratorio de VIH de la cual proviene el inmunógeno. Sin embargo, estos inmunógenos son incapaces de generar AcN con capacidad de reconocer variantes del nominal, las cuales están representadas por aislados primarios del virus de diferentes pacientes infectados con diferentes subgrupos de VIH^{67,73}.

Cualquier inmunógeno con múltiples epítopos contiene ciertos epítopos que inducen una respuesta inmunológica más fuerte que los otros y por lo tanto actúan como blanco primario de la respuesta inmunológica. Estos epítopos dentro de un inmunógeno dado son conocidos como inmunodominantes⁷⁴. En el caso de patógenos antigénicamente estables la identificación de epítopos inmunodominantes y su uso en la construcción de vacunas ha sido de gran ayuda^{70,74}. Sin embargo, en el caso de patógenos antigénicamente variables

como el VIH se cree que la inmunodominancia de algunos epítomos predispone la selección de aquellas mutantes que presentan epítomos poco inmunogénicos y por lo tanto inmunoresistentes^{75,76}.

Sin duda una gran parte de las mutaciones virales provocan que el virus no sea viable para infectar nuevas células o bien generan una capacidad de replicación disminuida (*fitness cost*)⁷⁷. Sin embargo, si la presión ejercida por el sistema inmunológico lleva a la selección de alguna mutante inmunoresistente y de capacidad replicativa disminuida, existen 10^8 posibilidades diariamente de que se genere al azar una mutación “río abajo” o “río arriba” del genoma de VIH que pueda compensar la primera mutación. En ocasiones esto llega a ocurrir y cuando la capacidad de replicación es “recuperada” por la segunda mutación, la mutante viral posee una ventaja sobre otras que lleva a su selección y establecimiento en la población viral del individuo infectado⁷⁸.

Por ejemplo, Barouch y col. utilizaron en monos una vacuna con un inmunógeno basado en el epítomo LTC p11C del virus de la inmunodeficiencia de simios, una región de la proteína Gag importante para la maduración viral⁷⁹. Posteriormente, los monos fueron retados con una cepa del virus de la inmunodeficiencia de simios y la carga viral de los animales fue monitoreada revelando que aquellos animales previamente vacunados disminuían rápidamente su carga viral y la mantenían baja por más tiempo que los animales no vacunados. Demostraron que algunas cepas mutantes resistentes aisladas de los animales presentaban una menor replicación⁸⁰. Al continuar monitoreando los monos que presentaban estas mutaciones deletéreas, se observó que unas semanas después la carga viral aumentaba drásticamente. La mutación deletérea del epítomo seguía presente, por lo que decidieron buscar una explicación en otras partes del genoma. Reportaron que los virus con la mutación deletérea y que en cultivo celular presentaban una regeneración en la capacidad de replicación, también presentaban mutaciones en otras regiones del genoma⁸¹. Estas mutaciones llamadas compensatorias han sido reportadas en procedimientos de transferencia pasiva de células citotóxicas específicas, anticuerpos monoclonales y vacunas así como en el tratamiento con fármacos antirretrovirales^{80,82,83,84}.

La dinámica de presentación de antígenos podría ser un problema importante en la generación respuesta antiviral pues un estudio realizado por Halonna y col. en pacientes infectados sin tratamiento parece indicar que la generación de anticuerpos neutralizantes sólo va pasos atrás de la rápida y variable presentación de antígenos virales⁵⁹. En este estudio se realizaron ensayos de neutralización utilizando anticuerpos y virus aislados de los pacientes a diferentes tiempos (T0, T12, T17 y T20 en semanas). Estos virus al ser utilizados en ensayos de neutralización son conocidos como aislados primarios a diferencia de cuando se utilizan cepas de virus adaptadas al crecimiento en laboratorio. Se demostró como los anticuerpos de los pacientes eran incapaces de neutralizar a los virus presentes en el mismo tiempo (Acs T20 vs virus T20= 0% neut). Sin embargo, se observó que los anticuerpos podían neutralizar virus preliminares (Ac T20 vs virus T12 = 40% neut) e incluso que entre más preliminar fuera el virus el porcentaje alcanzado de neutralización era mayor (Ac T20 vs virus T0 = 80% neut), y en algunos casos los anticuerpos también podían neutralizar virus heterólogos⁵⁹.

Debido a que las mutaciones son generadas en cada ciclo de replicación, la cantidad de mutaciones en VIH incrementa conforme al tiempo de infección. Incluso, se ha demostrado que los virus aislados hace 20 años presentaban menos variabilidad que los aislados actualmente⁸⁵. En el estudio realizado por Halonna y col., podemos ver que el sistema inmunológico es capaz de generar AcN sin embargo al momento de ser generados ya no son suficientes para combatir la enorme diversidad que el virus ya ha generado.

Podemos sugerir entonces que la generación de una respuesta pronta y simultánea contra una gran cantidad de variantes podría prevenir el escape inmunológico y controlar la infección. Por lo que, es claro que anticuerpos neutralizantes dirigidos hacia un sólo epítipo o proteína viral no pueden controlar a largo plazo la infección. Es por esto que el desarrollo de inmunógenos se ha dirigido a generar anticuerpos ampliamente neutralizantes bAcN (*del inglés broadly neutralizing antibodies*)^{3,4,5,64}. Es decir, una respuesta en contra de tanto el epítipo nominal como en contra de variantes del mismo e incluso en contra de subgrupos diferentes de VIH. Además, si se adelantara la presentación de cualquier variante antigénica que el virus pudiese presentar en un futuro también se atacaría el problema de “retraso” derivado de la dinámica de presentación antigénica del virus.

La hipótesis de la cual se generó este proyecto de investigación va de acuerdo a estas ideas. Creemos que una biblioteca de variantes de un mismo epítipo generara Ac ampliamente neutralizantes. Nuestro inmunógeno es una biblioteca de variantes del epítipo de la cresta del loop V3 (RGPGRAFVTI), como ya habíamos comentado antes. Sin embargo, no somos los únicos que han tratado de conseguir una vacuna efectiva basada en generar anticuerpos ampliamente neutralizantes. A continuación hablaremos de las estrategias que se han empleado para atacar la variabilidad antigénica de VIH y de cómo nuestra estrategia es diferente.

Evaluación de la capacidad neutralizante de un inmunógeno

El desarrollo de una vacuna en general consta de tres etapas: básica, preclínica y clínica^{86,53}. La etapa básica comprende desde la idea del inmunógeno, desarrollo y evaluación de la respuesta inmunológica evocada mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* utilizando animales de laboratorio. En la etapa preclínica se prueba la eficacia del inmunógeno en algún modelo de la enfermedad en animales. La etapa clínica comprende el uso de este inmunógeno en humanos y a su vez comprende tres fases: I, II, III. Algunas características clave de cada una de las fases se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2. Fases del proceso de desarrollo de una vacuna.

Fase	Número de sujetos	Propósito	Características de la población
Básica	—	Búsqueda y diseño del inmunógeno.	Primeros ensayos <i>in vitro</i> . Animales de laboratorio.
Pre-clínica	—	Evaluar seguridad e inmunogenicidad.	Modelo de la enfermedad en animales de laboratorio.
Clínica I	5 a 50	Evaluar seguridad, inmunogenicidad y	Individuos de bajo riesgo de infección.
Clínica II	25 a 1 000	optimizar la dosis y el esquema de vacunación.	Puede incluir población de alto riesgo.
Clínica III	1 000 a 10 000	Evaluar seguridad en un mayor número de personas.	Debe incluir población en alto riesgo de infección.
Clínica IV	100 000 a millones	Evaluar efectividad y seguridad bajo ciertas condiciones y detectar efectos adversos.	Población vacunada después de que la vacuna obtuvo la licencia.

Cada una de estas etapas requiere de ciertos ensayos que validan al inmunógeno. Dado que nuestro trabajo está enfocado en demostrar la generación de Ac ampliamente neutralizantes de un nuevo concepto de inmunógeno a nosotros nos concierne la etapa básica. En un esfuerzo por establecer normas que validen óptimamente la respuesta humoral de un inmunógeno contra VIH desde la etapa básica se ha creado el consorcio de anticuerpos neutralizantes NAC (*de las siglas en inglés*)⁸⁷. El NAC es una red internacional que trabaja sobre la estandarización de técnicas y parámetros para considerar a un

inmunógeno como candidato a ser probado en ensayos clínicos y eliminar lo mejor posible los posibles fracasos en estos ensayos que involucran miles de individuos⁸⁸. Para hablar sobre las recomendaciones que ha hecho este organismo internacional hablaremos brevemente del ensayo de neutralización del virus.

El ensayo de neutralización del virus evalúa la capacidad neutralizante de un suero, anticuerpo o fármaco. Además de la sustancia a evaluar se requieren los virus a neutralizar que pueden ser cepas de referencia del virus o aislados primarios. Aislado primario se refiere a un virus recientemente obtenido de un paciente con infección crónica y que no han perdido sus características fenotípicas, las cuales se pierden después de un número limitado de pasajes y amplificaciones. La cepa de referencia del virus o cepa de laboratorio es aquella cepa viral que ha sido adaptada para su pasaje y amplificación indefinida en líneas celulares y por lo tanto ha perdido sus características fenotípicas. Debido a esto la susceptibilidad a la neutralización de las cepas de laboratorio es mayor a los aislados primarios^{89,90}.

En sí en ensayo de neutralización hace referencia a la inhibición de la infección del virus en cierta población celular blanco dada por alguna sustancia añadida al cultivo. Por lo que existen diversos tipos de ensayos de neutralización dependiendo tanto del tipo celular blanco (célula con los receptores CD4+ y CCR5+/CXCR4+) o el virus a neutralizar⁸⁸. Las células blanco empleadas pueden ser líneas celulares inmortales o cultivos primarios de células blanco. El virus puede ser como habíamos comentado un aislado primario o cepas de referencia pero también pueden emplearse las secuencias originales de éstos para generar pseudoviriones o quimeras con una mayor estabilidad para su uso en el laboratorio pero con la secuencia original de alguna región viral, como el gen *env*^{91,92}. El consorcio de anticuerpos neutralizantes recomienda el ensayo de neutralización de pseudoviriones⁸⁸ basado en la publicación de Fenyo y col. donde se demostró que éste ensayo tiene mayor reproducibilidad intra y entre laboratorios que otros, además de garantizar un solo ciclo de infección⁸⁹.

El resultado del ensayo de neutralización expresa la capacidad neutralizante medida en dos parámetros: potencia y amplitud. La amplitud de un anticuerpo es el porcentaje de virus neutralizados del total de virus utilizados en el ensayo. En ocasiones la amplitud de un

anticuerpo no es expresada debido a que el ensayo solo se realiza con una o dos cepas de referencia de VIH. La potencia puede expresarse como el porcentaje de inhibición de la infección del virus respecto a un control de 0 o 100%. Sin embargo se puede ser más específico indicando título o concentración del suero/anticuerpo necesario para lograr la neutralización del 50%, 80% o 95%⁸⁹. Lo que se define como concentración inhibitoria x% IC₅₀, IC₈₀, IC₉₅. También la amplitud puede ser ligada a una potencia específica. Por ejemplo la *amplitud* promedio del anticuerpo monoclonal b12 a un IC₅₀ promedio de 6.98 ug/ml es del 30% en un panel de virus del clado A⁹³. Esto significa que el anticuerpo a una concentración promedio de 6.98 µg/mL (*potencia IC₅₀*) neutraliza al 50% la infección del virus en 3 de cada 10 aislados del clado A.

El NAC ha publicado que para considerarse un buen inmunógeno, éste debe generar amplitud o potencia. Específicamente, el suero/Ac inducido debe generar 50% de la neutralización en un 10% de los aislados primarios probados (amplitud) o generar más del 80% de la neutralización si la amplitud es <10 % (potencia)⁸⁸. También se recomienda ir escalando en la neutralización al utilizar paneles virales que vayan aumentando su variabilidad y por consiguiente el reto de neutralización. Este escalamiento que incrementa la variabilidad de los virus a neutralizar consta de tres niveles. En el nivel 1 deben tratar de neutralizarse virus sensibles a la neutralización como cepas de referencia o cepas adaptadas al laboratorio del mismo subgrupo del cual proviene el inmunógeno, en nuestro caso sería el subgrupo B. De ser exitosa la neutralización se continuaría con el nivel 2 representado por aislados primarios del subgrupo del inmunógeno. Finalmente se debe probar la neutralización de aislados primarios pero de diferentes subgrupos y las CRF's que representan el mayor reto debido a su alta variabilidad y resistencia a AcN. Se recomienda hacer ensayos de neutralización con al menos 6-12 virus por nivel⁸⁸.

La comunidad científica del área de desarrollo de vacunas contra VIH empieza a homogeneizar sus ensayos siguiendo las recomendaciones del NAC. Sin embargo en ocasiones no es posible apegarse a las recomendaciones. El NAC continúa trabajando para poner cepas, líneas celulares y otros reactivos a disposición de una mayor cantidad de investigadores en todo el mundo⁹⁴.

Inmunógenos y vacunas enfocadas a la respuesta humoral

Desde el descubrimiento del VIH, hace ya casi 30 años, se han empleado diversas estrategias para la generación de inmunógenos que evoquen una respuesta inmunológica antiviral. A pesar de que se han desarrollado estrategias también para la generación de vacunas terapéuticas (inducir una respuesta antiviral para disminuir la carga viral en un paciente infectado), nosotros hablaremos sólo del enfoque profiláctico de las vacunas (inmunógenos que inducen respuesta inmune protectora en una exposición al virus posterior a la vacunación). Inicialmente se pensó que al igual que otras vacunas efectivas podría emplearse virus atenuados o con deleciones en su genoma que disminuyeran su capacidad de replicación e infección. Efectivamente, en un estudio se observó que la inmunización previa del virus de inmunodeficiencia de simios atenuado por deleciones en monos posteriormente infectados con el virus de la inmunodeficiencia de simios no atenuado generaba una carga viral menor hasta en $3 \log_{10}$ respecto a los monos no inmunizados⁹⁵. Sin embargo, en otro estudio posterior se demostró cómo el virus de la inmunodeficiencia de simios atenuado utilizado en la inmunización se recombinaba con la cepa que se inoculaba para conferir la infección en los monos y generaba hallazgos clínicos de SIDA más graves que en los monos que no habían sido inmunizados^{96,97}. Por tales motivos se descartó la posibilidad de utilizar el VIH atenuado como vacuna en humanos.

Debido a la inseguridad de generar una vacuna de virus completo se intentó la inmunización con monómeros de la proteína gp120. El fracaso en la generación de protección por parte de la primera vacuna en fase III basada en monómeros de gp120 fue adjudicado a la estrecha o respuesta humoral generada⁷³. Ahora se sabe que la inmunización con monómeros de gp120 no es capaz de inducir Ac ampliamente neutralizantes bAcN contra VIH^{73,98,99}. Esto generó una exhaustiva búsqueda de un inmunógeno que genere una respuesta amplia contra el virus o bAcN que pudieran ser empleados como inmunización pasiva.

Existen algunos AcN monoclonales con una gran potencia y amplitud que han sido obtenidos de sueros de pacientes con carga viral baja sostenida por años: los pacientes progresores lentos¹⁰⁰. Estos monoclonales principalmente tienen especificidad a la proteína gp120¹⁰¹ pero también a la proteína gp41¹⁰². La tabla 3 y figura 7 resumen los Ac

monoclonales más importantes y las regiones blanco donde actúan¹⁰³. Los anticuerpos b12, 2F5, 4E10 y 2G12 han sido ampliamente trabajados por su amplia neutralización. Inicialmente, la inmunización pasiva con mezclas de estos anticuerpos en macacos en gestación mostró una protección completa contra la infección por el virus de la inmunodeficiencia de simios¹⁰⁴. Otros estudios *in vitro* posteriores demostraron la selección de cepas mutantes resistentes en algunas de las líneas celulares infectadas y tratadas con altas concentraciones de estos Acs en tiempos de 3 a 22 semanas¹⁰⁵. La amplia y potente neutralización de estos anticuerpos logró la aprobación de su uso en ensayos clínicos. Los ensayos clínicos verificaron el hallazgo encontrado en las líneas celulares pues se logró disminuir la carga viral de los pacientes, sin embargo en algunos de ellos, después de 10 semanas se encontraron aislados virales con mutaciones resistentes cuya presencia correlacionaba con el aumento de la carga viral¹⁰⁵. La variabilidad genética del virus contribuyó en la selección de cepas resistentes posteriores a una “presión” ejercida por los anticuerpos.

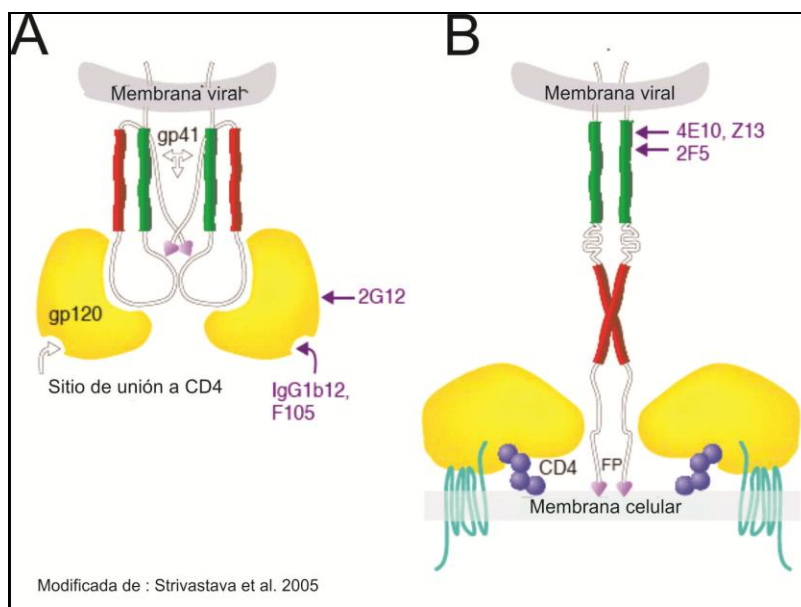


Fig. 7. Sitios de unión de algunos anticuerpos neutralizantes del VIH. La espícula viral está representada en su forma nativa (A) donde la principal proteína expuesta es gp120. La espícula viral sufre cambios conformacionales después de la interacción con el receptor y el correceptor, permitiendo la exposición completa de la proteína gp41 y de algunos sitios en gp120 previamente no expuestos (B).

Tabla 3. Regiones o proteínas blanco de anticuerpos neutralizantes.

Región o proteína blanco	Ejemplos	Características
Regiones variables de gp120	447-52D, 19b y 2182	Anticuerpos contra epítomos conformacionales conservados.
gp41	2F5, 4E10 y Z13	Interfieren en la fusión de las membranas viral y celular.
Regiones "CD4i" (inducibles por CD4)	17b, 48D, 23E, 49E, 21C, E51, X5 y CG10	Regiones expuestas después del cambio conformacional por lo que es necesaria la unión de gp120 con CD4 para que los epítomos estén expuestos.
Epítomos dependientes de carbohidratos.	2G12	Pobremente inmonogénicos y su unión es dependiente de una apropiada N-glicosilación.
Sitio de unión a CD4 CD4bs (<i>del inglés: CD4 binding site</i>)	F105, b12, b3, b6 y 830D.	Estos anticuerpos compiten con el sitio de unión a CD4.

La naturaleza conformacional de los sitios blanco de estos anticuerpos dificulta su identificación. Por lo tanto la generación de inmunógenos que induzcan estos anticuerpos ampliamente neutralizantes no ha sido exitosa por lo que el uso se limita a la administración pasiva en forma de Ac monoclonales. Es importante generar inmunógenos que los induzcan pues a pesar de su alta efectividad, no todos los pacientes pueden tener acceso al tratamiento por su elevado costo.

Por otro lado, se han desarrollado inmunógenos con mezclas de diferentes epítomos y de diferentes proteínas de VIH con el objetivo de inducir respuestas más amplias, pero aún no se tiene éxito. Por ejemplo, en un ensayo clínico fase I se vacunó a 88 sujetos sanos con una vacuna basada en proteínas recombinantes gp120, nef y tat (probada antes en macacos resultando en protección contra la infección¹⁰⁶) y los anticuerpos generados fueron capaces de neutralizar cepas de laboratorio, pero incapaces de neutralizar aislados primarios

del virus¹⁰⁷. Otro ejemplo es un inmunógeno que utilizó un vector adenoviral serotipo 5 que expresa los genes *gag-pol* y *env* de los subgrupos A, B y C de VIH; no se encontraron anticuerpos neutralizantes en ninguno de los 30 sujetos sanos vacunados¹⁰⁸.

Como puede verse la mayoría de estos inmunógenos clásicos, basados en el uso de un solo epítipo sin contemplar variantes del epítipo y antígenos definidos, solo son efectivos neutralizando ya sea cepas de VIH de laboratorio (las cuales son sensibles a neutralización) o aislados primarios únicamente del subtipo de donde provienen. A pesar de la amplia y potente neutralización de algunos AcN monoclonales, en ciertos pacientes presentan un problema al igual que los inmunógenos clásicos al momento de ser utilizados como componentes de vacunas y enfrentar el reto de la infección por VIH: El escape por selección de cepas mutantes resistentes a neutralización. El escape inmunológico es un gran problema en la generación de vacunas y una ventaja del virus contra el sistema inmune^{6,52,67}. La generación de una respuesta ya sea humoral o celular protectora debe ser amplia capaz de neutralizar diferentes aislados primarios del virus y diversa de tal manera que se evite la inmunodominancia hacia un solo epítipo.

Las vacunas multiclado o polivalentes han demostrado que la inmunización de un pool de antígenos induce anticuerpos neutralizantes más potentes y amplios que la inmunización de antígenos únicos. Uno de los trabajos más claros que mostró esta evidencia fue el publicado por Azizi y colaboradores¹⁰⁹. En este trabajo se probó la capacidad para generar anticuerpos neutralizantes de 3 inmunógenos: 1) una proteína recombinante gp120, 2) un “pool” de 4 proteínas recombinantes y 3) un “pool” con 14 proteínas recombinantes. Se demostró que la inmunización con el pool de 14 proteínas generaba los anticuerpos neutralizantes más potentes y amplios en ensayos de neutralización en contra de diferentes cepas de referencia de VIH. Sin embargo la amplitud de neutralización en contra de cepas de referencia de VIH alcanzada por ésta y otras vacunas multiclado o polivalentes no ha podido ser trasladada en contra de aislados primarios de VIH^{109,110}.

El éxito limitado de estos inmunógenos multiclado o polivacunas puede ser debido al origen de las secuencias. Una vez que el virus entra al hospedero empieza un proceso de evolución por selección natural^{6,111}. Cuando se logra seleccionar una mutante viral capaz de

evadir el sistema inmunológico ésta se establece como predominante en la población viral del hospedero. Creemos que estas secuencias evolutivamente exitosas están a favor del virus y no del sistema inmunológico, pues si han sido seleccionadas es por que presentan características inmunoevasivas (pobremente inmunogenicas, subdominantes, poca afinidad, deficiente presentación antigenica, inaccesibilidad etc). Por lo que no sería lo más adecuado emplearlas en la vacuna.

Creemos que las variantes utilizadas para desencadenar una respuesta exitosa no deben ser seleccionadas, sino generadas completamente al azar, del mismo modo como el virus lo hace y asemejaría la infección natural. No con esto queremos decir que hay que inmunizar con las 10⁹ variantes diarias del virus; la respuesta inmune protectora puede darse con un pool de variantes mucho menor. El objetivo es preparar al sistema inmunológico para evitar que el virus evolucione y escape exitosamente. Para esto, la construcción de nuestras bibliotecas se basó en el uso de dos oligonucleótidos que codifican para la secuencia del epítipo RGPGRAFVTI pero con algunas posiciones mutadas al azar: RGPGRXXXXX y XGPXRFXFTX, donde X es uno de los 20 aminoácidos naturales.

En resumen, nuestra estrategia plantea que un inmunógeno exitoso contra VIH debe contemplar un pool de variantes o biblioteca de epítipos y que la variabilidad de los epítipos debe ser al azar evitando así un posible sesgo matemático de selección[§]. La construcción de la biblioteca de epítipos variantes fue basada en un epítipo del loop V3 de la proteína gp120 porque naturalmente está expuesto y es blanco de anticuerpos neutralizantes que impiden la entrada del virus a la célula. Además éste epítipo es altamente variable, lo cual permite probar nuestro concepto utilizando una mezcla de mutaciones al azar. Por otro lado, concordamos que una vacuna óptima contra VIH debe evocar la respuesta inmunológica tanto de células B como T por lo que nuestro inmunógeno está basado en un epítipo de LTC que permite evocar también la respuesta de células T.

[§]Sesgo de selección es un sesgo estadístico en el que hay un error en la elección de los individuos o grupos a participar en un estudio científico

JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA

Existen diferentes inmunógenos empleados para la generación de una respuesta inmune contra proteínas del VIH¹¹². Las vacunas están clasificadas en: a) vacunas de microorganismos completos (vivos, atenuados o muertos), b) vacunas de subunidades (proteínas recombinantes, carbohidratos, lípidos, partículas similares a virus etc), y c) vacunas en base de epítomos recombinantes^{53,86}. A su vez las vacunas recombinantes están clasificadas en: a) vacunas que utilizan virus o bacterias como vectores y b) vacunas de ADN. En el campo de VIH se están probando algunas vacunas recombinantes de las que utilizan virus o bacterias como vectores: vaccinia virus ankara modificado, canarypox virus, fowlpox y adenovirus, virus adeno-asociados, virus de encefalitis equina, etc¹¹². De las vacunas de subunidades se han probado lipopeptidos derivados de gp120 así como diferentes péptidos recombinantes de diversas proteínas virales. Nuestros inmunógenos caen dentro de la clasificación de vacunas de ADN y de las que utilizan virus de bacterias (fago M13) como vector: plásmido de ADN y fago M13 recombinante, respectivamente.

Inmunización génica

La inmunización génica o basada en ADN consiste en la administración de un plásmido de ADN (que codifica para un determinado antígeno) en un organismo, donde el antígeno expresado *in situ* desencadena una respuesta inmune antígeno específica¹¹³. La eficiencia de la respuesta inmune protectora que desencadenan las vacunas de ADN ha sido observada en una amplia variedad de virus, bacterias y parásitos de importancia clínica¹¹⁴. Actualmente se encuentran vacunas de ADN en fase de ensayos clínicos como lo son algunas contra VIH, Virus de la Hepatitis B (VHB), Dengue, Influenza y Malaria. Las vacunas actualmente aprobadas y en uso son contra el Virus del Nilo en caballos, contra el melanoma maligno canino y contra el Virus de necrosis hematopoyética infecciosa en salmón¹¹⁴.

Una variante de inmunización génica contra patógenos es la inmunización somática transgénica (STI *somatic transgene immunization*), la cual se basa en el concepto de “anticuerpos antigenizados”. Esto se refiere a la inmunización con un plásmido que codifica para un anticuerpo, donde se ha cambiado alguna de sus regiones determinantes de

la complementariedad (CDR) de la cadena pesada variable (VH) por secuencias que codifican para antígenos o epítomos de interés^{115,116}. Esta metodología se ha empleado con éxito en muchos trabajos. Uno de ellos generó un anticuerpo con epítomos que se sabían confieren protección contra encefalomielitis alérgica experimental EAE (modelo experimental de esclerosis múltiple), en los CDR 2 y 3 de la VH. Al inmunizar ratones con esta construcción se observó un alto nivel de resistencia o protección hacia la EAE¹¹⁷. Nuestro grupo de trabajo ha publicado la inducción de respuesta celular protectoras de cisticercosis en modelo murino mediante la inoculación de ADN plasmidico que expresa la cadena pesada de una inmunoglobulina y donde el CDR3 de la región variable había sido reemplazado por un epitopo de LTCs de *Taenia crassiceps*¹¹⁸. Esta técnica presenta las siguientes ventajas que justifican su uso:

1. Son altamente inmunogénicos y permiten no solo la presentación de epítomos en células B, sino también una carga eficiente de epítomos LTC por las células presentadoras de antígeno¹¹⁶.
2. En contraste con los péptidos sintéticos libres, los cuales tienen una vida media muy corta *in vivo*, los péptidos insertados en la Ig compartirán la vida media del acarreador, el cual es más estable y de vida media más larga¹¹⁶.
3. Las asas dentro de los dominios de las Ig son procesados eficientemente y presentan los epítomos/péptidos insertados, a células T¹¹⁶.

Despliegue en Fagos

La tecnología de despliegue en fagos es una técnica de expresión de moléculas en bacteriófagos y bioselección *in vitro* en la cual un péptido o proteína es fusionada genéticamente a una de las proteínas de superficie de un bacteriófago o fago filamentoso (Fig 8B). De esta manera el fago recombinante desplegará el epítomo, péptido o proteína de interés en su superficie¹¹⁹ pudiéndose utilizar para diversos fines. La bioselección utiliza una ventaja presente en esta técnica de expresión: puede conocerse por simple secuenciación de la cadena sencilla del fago, la secuencia del epítomo o proteína desplegada en fusión a la proteína de superficie del fago. Mediante bibliotecas de fagos que expresen epítomos al azar en fusión con alguna proteína de superficie se seleccionan aquellos que

sean reconocidos por anticuerpos fijados a una determinada superficie. Posteriormente el gen del fago seleccionado es secuenciado y de esta manera se conoce la secuencia del epítipo que está siendo reconocido por los anticuerpos de interés. La técnica se utiliza como un método de detección por lo que los epítipos seleccionados deben ser analizados y verificados en su capacidad de inducir una respuesta protectora mediante otras técnicas.

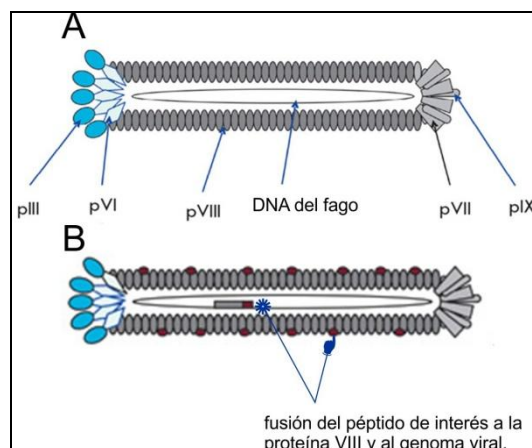


Fig. 8. Estructura del fago M13. El fago M13 (A) mide 6.5 nm de diámetro y 930nm de longitud, su masa total está constituida por un 87% de proteína y posee un genoma de ADN de cadena sencilla empaquetado en un cilindro flexible de proteínas: pIII, pV, pVI, pVII, pVIII y pIX. En (B) se muestra una caricatura de un fagoM13 recombinante, el cual expresa un péptido de interés (✱) fusionado a su proteína VIII. La secuencia del péptido expresado puede conocerse pues también se encuentra integrado al genoma viral (*).

Uno de los bacteriófagos utilizados en esta metodología es el M13, el cual mide 6.5 nm de diámetro y 930 nm de longitud, su masa total está constituida por un 87% de proteína y posee un genoma de ADN de cadena sencilla empaquetado en un cilindro flexible de proteínas: pIII, pV, pVI, pVII, pVIII y pIX^{119,120} (Fig. 8A). Esta metodología ha sido empleada en diversas áreas por su bajo costo y fácil manipulación. En el estudio del VIH/SIDA se ha utilizado en el mapeo de anticuerpos monoclonales anti-VIH, en la detección de epítipos propios reconocidos por anticuerpos inducidos en la infección natural, así como en la búsqueda de epítipos/mimótipos de gp120 reconocidos por sueros policlonales de pacientes infectados^{120,121,122}.

El uso de este fago como inmunógeno fue debido a que además de lo que hemos comentado presenta las siguientes ventajas:

1. La manipulación *in vitro* de los fagos es sencilla, rápida y de bajo costo por lo que permite la generación de una gran cantidad de la proteína de interés¹¹⁹.
2. A diferencia de los fagos líticos que destruyen la membrana celular del hospedero causando su lisis (p. ej. fago lambda), el fago M13 no lisa a su hospedero dando gran ventaja al proceso de obtención y purificación de las partículas virales¹¹⁹.
3. La fusión genética de las proteínas de interés al genoma del fago, da la ventaja de poder extraer la cadena sencilla de ADN de éste y conocer la secuencia de la proteína fusionada¹²¹.
4. Se ha comprobado que el fago por si mismo es un potente inmunógeno por lo que no es necesario el uso de adyuvantes al inmunizar¹¹⁹.

HIPÓTESIS

Los inmunógenos construidos con múltiples mutaciones dentro de un epítipo de gp120 del VIH inducirán respuesta inmune más amplia y diversa contra el virus que el inmunógeno del epítipo nominal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Construcción de inmunógenos con base en la región V3 de gp120 de VIH-1 en forma de ADN plasmídico y fago M13 recombinante.
- 2.- Inmunización de ratones con los inmunógenos construidos.
- 3.-Caracterización molecular de sueros inmunes generados y ensayos de neutralización del virus.

RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO EN EL ÁREA DE ESTUDIO

Nuestro trabajo es muy importante debido a que a la fecha no se han generado anticuerpos neutralizantes que prevengan o ataquen el problema de variabilidad antigénica del VIH. Además el proyecto comprobará un concepto de inmunógeno diferente a todo lo que se ha usado a la fecha, que no solo destaca en el área de VIH, sino en cualquier patógeno de alta variabilidad antigénica (VHC, VHB, Virus de la influenza, etc.).

METODOLOGÍA

Para comprobar la hipótesis de que la inmunización con una biblioteca de variantes al azar de un epítipo de VIH generará una respuesta humoral más amplia se utilizaron diferentes metodologías que a continuación se detallan. En la siguiente página se presenta un esquema general de la metodología que podría englobarse en las siguientes etapas: 1) ensamblaje de la región VH de una inmunoglobulina mediante ocho oligonucleótidos, 2) amplificación por separado, de éste fragmento de ADN ensamblado, mediante PCR utilizando dos diferentes pares de primers que introducen sitios de restricción, 3) clonación de los dos diferentes amplificados en sus respectivos vectores, 4) generación de ADN plasmídico y fago M13 recombinante a gran escala, 5) inmunización de ratones, obtención de suero preinmune e inmune, 6) ensayos inmunoenzimáticos: ELISAs, dot blot, y bioselección y 7) ensayos de neutralización del VIH. (Fig. 9).

Ensamblaje del epítipo en el CDR3 del V_H de una inmunoglobulina humana

Para construir nuestros inmunógenos primero se diseñaron los oligonucleótidos con las secuencias codificantes. El epítipo que se usó proviene del loop V3 de la proteína gp120 con la siguiente secuencia de aminoácidos ³¹⁸RGPGRAFVTI³²⁷. En esta tesis lo nombramos epítipo L. Esta secuencia fue utilizada para el diseño del oligonucleótido LN (tabla 4) empleado en la construcción del inmunógeno con la secuencia nominal del epítipo. Con base en esta secuencia nominal se diseñaron dos oligonucleótidos en donde 5 posiciones de la secuencia fueron mutadas al azar para la construcción de las bibliotecas: RGPGRXXXXX y XGPXRFXTX (X=cualquiera de los 20 aminoácidos). La secuencia codificante completa de los dos oligonucleótidos se encuentra en la tabla 4 referidos como LR5A y LR5B.

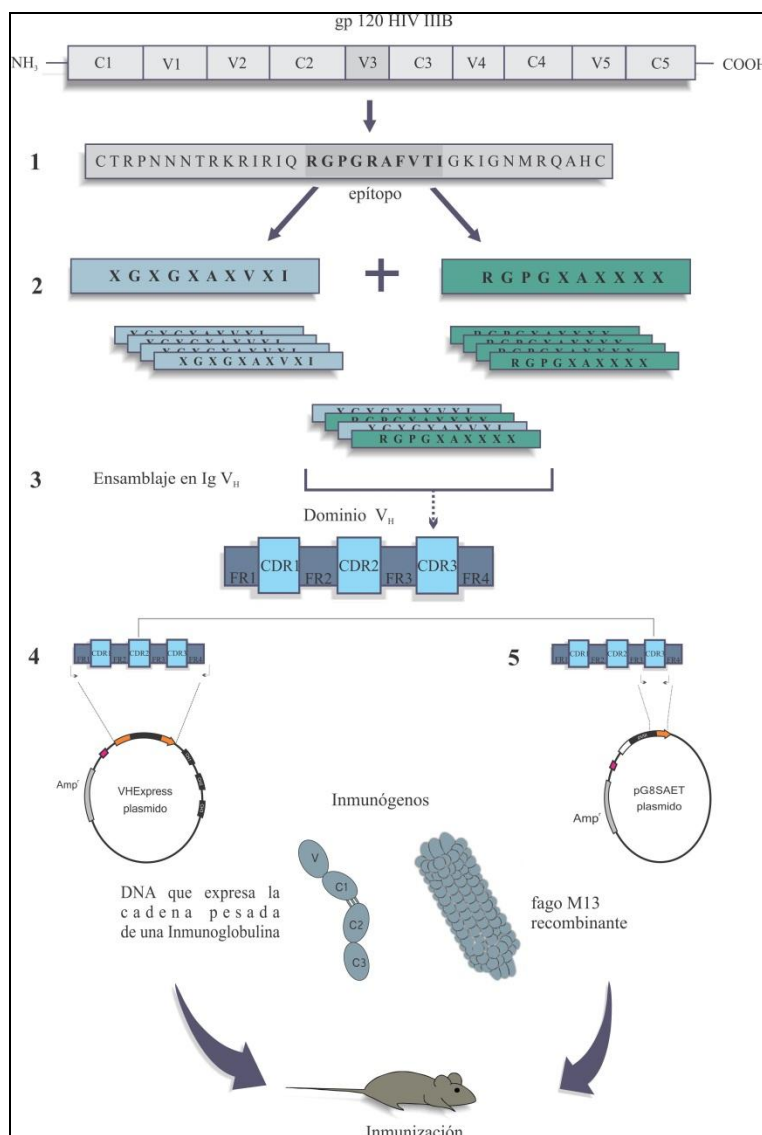


Fig. 9. Esquema general de la metodología. Partiendo de un epítipo del loop V3 de la proteína gp120 de VIH (1) se construyeron bibliotecas de epítipos variables. La biblioteca se generó al cambiar 5 de las 10 posiciones de aminoácidos de la secuencia nominal por aminoácidos al azar en el diseño de dos oligonucleótidos (2). Utilizando oligonucleótidos traslapados se realizó un ensamblaje de la región VH de una Ig humana, en donde la región CDR3 fue reemplazada por una mezcla equimolar de nuestros oligonucleótidos mutados (3). La región VH ensamblada con nuestra biblioteca de epítipos fue utilizada como templado para la amplificación de dos insertos clonados en el vector de expresión VHEXpress (4) para tener el inmunógeno en forma de DNA y en el vector pG8SAET (5) que permite la expresión de nuestra biblioteca en un fago M13 recombinante. Estos inmunógenos (DNA y fago) fueron inoculados a ratones, de los que se obtuvo el suero empleado en ensayos inmunoenzimáticos y de neutralización. De la misma manera fueron construidos los inmunógenos nominales y controles negativos.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en la metodología.

Nombre	Codifica para	Secuencia	Utilizados para
B1	Framework 1	5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCCTGTGCA3'	Ensamblaje de la región V _H de una Inmunoglobulina Humana Ig
B2	CDR 1	5'CCCTGGAGCCTGGCGGACCCAGCTCATGGCATAGCTGCTAAAGGTGAA TCCAGAGGCTGCACAGGAGTCTCAGGGA3'	
B3	Framework 2	5'TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA3'	
B4	CDR2	5'GAACCGGCCCTTCACGGAGTCTGCGTAGTATGTGCTACCACCTACC ACTAATAGCTGAGACCCACTCCAGCCCTT3'	
B5	Framework 3	5'GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAATGAAC3'	
B6	Framework 3	5'CGCACAGTAATATACGGCCGTGTCTCGGCTCTCAGGCTGTTCAATTGC AGATACAGCGT3'	
B7	CDR3	5'GCCGTATATTACTGTGCGAAAGGTAGTTACTTTGACTACTGGGGCCAG GGAACCTGGTC3'	
B8	Framework 4	5'TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCA 3'	
LN	Epítipo Nominal RGPGRFVTI	5'GTATATTACTGTGCGCGTGGTCTCGTGTCTTTGTTACTATTTGGG GCCAGGGAACC3'	En el ensamblaje de la región V _H de una Ig el oligo B7 fue substituido por cada uno de estos oligos. Cada oligo representa un inmunógeno construido.
L1	Biblioteca de epítipos RPGGXAXXXX	5'GTATATTACTGTGCGCGTGGTCTCGTGTNNKGTNNKNNKNNKNTGG GGCCAGGGAACC3	
L2	Biblioteca de epítipos XGXGXAXVXI	5'GTATATTACTGTGCGNNKGGTNNKGGTNNKGTNNKATTGG GGCCAGGGAACC3	
L4M	Biblioteca de epítipos RGPGRAXXXX	5'GTATATTACTGTGCGCGTGGTCTCGTGTNNKNNKNNKNTGG GGCCAGGGAACC3'	
L3M	Biblioteca de epítipos RGPGRAFXXX	5'GTATATTACTGTGCGCGTGGTCTCGTGTNNKNNKNNKNTGG GGCCAGGGAACC3'	
L2M	Biblioteca de epítipos RGPXRXFVTI	5'GTATATTACTGTGCGCGTGGTCTNNKCGTNNKTTTGTACTATTTGGG GCCAGGGAACC3'	
N5	Amplifica fragmento 396 pb	5'ATTCTAGCCATGGTGAATTCCTGCAGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCT3'	Para amplificar toda la región V _H e introducir sitios de enzimas de restricción <i>PstI/BstEII</i>
N3		5'CATGTACGTATGGATCCATTGAGGAGACGGTGACCAGGGT3'	
D5	Amplifica fragmento 100pb	5'TGATATTCGTACTCGAGCCATGGTGTATATTACTGTGCG3'	Amplificar solo la región CDR3 que contiene el epítipo e introducir sitios de enzimas de restricción <i>NcoI/BamHI</i>
D3		5'ATGATTGACAAAGCTTGGATCCCTAGGTTCCCTGGCCCCA3'	
V3	En combinación con N5	5'TGGATCCGTCGACAGGACTCACCTGAGGAGACGG3'	Para amplificar fragmento de clonas Cb resistentes
p5YSAET	En combinación con D3	5'TATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATGTC3'	

También fueron construidas bibliotecas con 4, 3 y 2 mutaciones al azar del epítipo, sin embargo nuestros resultados provienen de la biblioteca con 5 mutaciones al azar. Los oligonucleótidos codificantes de las bibliotecas con 4, 3 y 2 mutaciones están referidos en la tabla 4 como LR4, LR3 y LR2. De estas bibliotecas solo se presentará un resultado preliminar referente a ensayos de proliferación. Por esta razón y para evitar confusión, de aquí en adelante se explicará haciendo referencia solo a la biblioteca de 5 mutaciones.

Como se describió en la justificación, el mismo epítipo fue utilizado para construir dos tipos de inmunógenos: ADN y fago M13 recombinante. En una etapa inicial para ambos tipos de inmunógenos, se ensambló la región completa VH de una inmunoglobulina humana utilizando 8 oligonucleótidos que se traslapan entre sí¹²³. Estos oligonucleótidos son referidos en la tabla 4 como B1 a B8. El oligonucleótido B7 con la secuencia del CDR3 de la región V_H fue reemplazado por cada uno de los oligonucleótidos L. Los extremos 5' y 3' de los oligonucleótidos L contienen secuencias de traslape con la región FR3 y FR4 de la región VH. El oligo B8 codificante del CDR3 fue reemplazado por el oligo LN para construir el inmunógeno del epítipo nominal o por una mezcla equimolar de los oligos LR5A y LR5B para construir la biblioteca. Para construir un inmunógeno control sin epítipo de VIH, el oligo B8 no fue reemplazado en el ensamblaje. Por lo tanto se ensamblaron 3 construcciones: nominal, biblioteca y control.

La reacción de ensamblaje se llevó a cabo únicamente mediante la hibridación de los 8 oligonucleótidos empleados. Para esto se agregaron concentraciones equimolares de cada oligonucleótido y se añadió además 1U de enzima Taq ADN polimerasa, 0.2mM de DNTP's, 1x de buffer y 0.75mM de MgCl₂. La reacción se llevó a cabo aumentando la temperatura a 65°C para posteriormente disminuirla gradualmente hasta 25°C. Después se realizaron 7 ciclos de las siguientes temperaturas: 94°C 2 min, 56°C 2 min y 72°C 2 min.

Clonaciones

La construcción de los inmunógenos continuó con las clonaciones en diferentes vectores de expresión utilizando como base los 3 ensamblajes anteriores. Por un lado cada ensamblaje de V_H fue utilizado como templado para la amplificación y posterior clonación en el vector de expresión para células eucariotas VHexpress¹²⁴. El vector VHexpress codifica para la cadena pesada completa de una inmunoglobulina de ratón, región constante (CH1 CH2 CH3) y variable (V_H). La región variable fue reemplazada por nuestros ensamblajes de la región variable humana. El vector expresa la región pesada de una inmunoglobulina de ratón pero la secuencia de la región variable es humana. Éste vector permitió la inmunización génica. Por otro lado, para la construcción de los inmunógenos tipo fago M13 recombinante, el V_H ensamblado fue utilizado como templado para amplificar únicamente el CDR3, donde se encuentra la secuencia codificante del epítipo, para ser clonado en el fagémido pG8SAET. Este vector codifica únicamente para la proteína VIII de superficie del fago M13 y permitió la expresión del epítipo fusionado a ésta proteína. A continuación se detalla la metodología de clonación.

Para la construcción del ADN, los ensamblajes de V_H fueron amplificados con oligonucleótidos que además añaden sitios de corte para las enzimas de restricción *Pst I* y *Bst EII*. Los oligonucleótidos de amplificación son referidos en la Tabla 4 como N3 y N5. Este fragmento amplificado de ADN cuyo tamaño es de 373 pb fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa. Los insertos fueron purificados y digeridos con las enzimas de restricción, al igual que el vector VHexpress. Los insertos y vector digerido fueron separados por electroforesis y se cortaron las bandas de interés para su purificación. Los insertos y el vector digeridos y purificados fueron utilizados para las reacciones de ligación utilizando la enzima T4 Ligasa. Bacterias de *Escherichia coli* de la cepa TG1 electrocompetentes fueron transformadas con los ADNs de las ligaciones. El vector VHexpress contiene el gen de resistencia a ampicilina por lo que las bacterias que adquirieron el vector crecieron después de ser sembradas en cajas de LB agar con ampicilina. Las clonas que crecieron fueron utilizadas para corroborar por PCR de colonia que contienen el inserto de 373 pb y se designaron como positivas aquellas que presentaron el tamaño señalado. En el caso de la biblioteca se calculó la complejidad según las clonas

totales crecidas en la caja de LB agar, de la siguiente manera: complejidad de clonas = (número de clonas en caja LB agar/ml sembrados de medio con células transformadas) * (ml totales de medio con células transformadas). Posteriormente este número fue corregido según el porcentaje de clonas positivas por PCR obtenido de 10 clonas amplificadas al azar. Una vez más la complejidad fue corregida según el porcentaje de variabilidad de acuerdo a las secuencias de 10 clonas secuenciadas. Las bibliotecas, el epítipo nominal y el epítipo control fueron amplificados en medio líquido 2YT. Una porción fue almacenada en medio 2YT/glicerol a -20°C y lo demás fue utilizado para inocular más medio 2YT para su amplificación y extracción de ADN plasmídico. La biblioteca fue designada como VHB, el epítipo nominal como VHP y el vector control que no contiene el epítipo como VVH.

Para la construcción de los fagos M13 recombinantes, se utilizó el ensamblaje de VH únicamente como templado para la amplificación de la región CDR3 donde se encuentra la secuencia del epítipo¹²³. Para la amplificación se utilizaron oligonucleótidos que traslapan con la región FR3 y FR4 y que además insertan los sitios de corte para las enzimas de restricción *Nco I* y *Bam HI*. Estos oligonucleótidos son referidos como D5 y D3 en la tabla 4. Este fragmento de ADN que codifica únicamente para el epítipo tiene un tamaño de 109 pb y fue corroborado por electroforesis en gel de agarosa. La metodología a partir de este punto fue la misma que se describió para VHEXpress. Las bibliotecas, el nominal y el control fueron amplificados en medio líquido 2YT. Una porción fue almacenada en medio 2YT glicerol 30% a -20°C y otra porción fue utilizada para extraer ADN plasmídico y otra porción fue inoculada en más medio 2YT para el rescate y amplificación de fago M13 recombinante. La biblioteca fue referida como BFL, el epítipo nominal como ELN y un epítipo no relacionado o control como GK1. Este fago control fue previamente construido en nuestro laboratorio y nosotros solo lo amplificamos partiendo de una clona almacenada.

Extracción de ADN plasmídico

Se extrajo ADN plasmídico de todos los inmunógenos para almacenarlo como reserva y además se produjo en gran escala en el caso de los que serían utilizados para inmunización génica. Para la extracción de ADN se utilizaron ya sea kits comerciales (Quiagen) o el método de lisis alcalina seguida de una purificación fenol/cloroformo. A continuación se describe el método de lisis alcalina de forma detallada¹²⁵.

A partir de una colonia aislada se inoculo medio 2XYT con carbinicilina (Cb) (antibiótico al cual las bacterias adquirieron resistencia por la transformación; análogo de ampicilina) y se dejó crecer toda la noche a 37°C y en agitación constante de 250 revoluciones por minuto (rpm). Los siguientes pasos de la metodología se realizaron manteniendo el cultivo a temperatura de 4°C, incluso en la centrifugación. El cultivo que se dejó crecer toda la noche fue centrifugado a 5, 000 rpm y el precipitado fue resuspendido vigorosamente en 10 ml de solución I (Glucosa 50mM, Tris-HCl 25mM pH8.0, EDTA 10mM pH 8.0). Después, se añadió 10 mL de la solución II (NaOH 0.2N, SDS 10%) y se mezcló suavemente por inversión. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente después se añadió 10 mL de la solución III (Acetato de Potasio 5M pH 4.8) mezclando suavemente por inversión. Quince minutos después de incubar a 4°C fue centrifugado por 30 minutos a 14 000 rpm. El sobrenadante recuperado fue incubado 5 minutos a temperatura ambiente con 1.5 volúmenes de isopropanol. Posteriormente esta mezcla fue centrifugada por 30 minutos a 14 000 rpm y el precipitado resuspendido en 600 microlitros (μ l) de agua bidestilada estéril. Se añadió a la suspensión un volumen de fenol/cloroformo y se mezcló vigorosamente por 1 minuto. Esta mezcla fue centrifugada por 10 minutos a 14 000 rpm y se separó la fase acuosa. La fase acuosa fue mezclada con 2 volúmenes de etanol 100% y posteriormente centrifugada por 10 minutos a 14 000 rpm a temperatura ambiente. El precipitado se lavó dos veces con 1.5 volúmenes de etanol al 70%. El ADN precipitado fue finalmente resuspendido en 400 μ l de H₂O/ARNsa (20ug/mL). Para su cuantificación se realizaron diferentes diluciones y se leyó en un espectrofotómetro Nanodrop®. El ADN fue almacenado a -20°C .

Obtención de Fagos recombinantes

Las bibliotecas y controles clonados en el fagémido pG8SAET fueron amplificadas y rescatadas como fagos M13 recombinantes por la incorporación del fago ayudador o “helper” cuyo genoma codifica para todas las proteínas del fago M13. Este fago ayudador infecta a las bacterias *E. coli* transformadas y, para ensamblar nuevas partículas virales, toma proteínas VIII expresadas tanto por su genoma como las expresadas por el fagémido. De esta manera tendremos un fago M13 recombinante con proteínas pVIII silvestres y proteínas VII recombinantes fusionadas con el epítipo. A continuación se describe la técnica de forma detallada.

Después de su recuperación las células de *E. coli* transformadas para cada biblioteca fueron crecidas en 20 ml de medio 2XYT + Cb (50 µg/µl) por 4 horas (O.D. aproximada de 0.6) a 37°C y en agitación de 250rpm. Se tomó 1.5 mL del inóculo y se añadió 15µl de fago helper M13KO7 (Invitrogen) incubando 30 min sin agitación a 37°C seguidos de otros 30 min de incubación a la misma temperatura pero con agitación de 250 rpm. Se transfirió a matraces de 250 ml y se añadió 2XYT/cb/kn (kanamicina 50 µg/µl) hasta 50 mL. Se dejó incubando a 30°C toda la noche (maximo 16 horas) con agitación de 250 rpm. Al día siguiente se centrifugó 20 minutos a 8 000 rpm 4°C y se pasó el sobrenadante a tubos de policarbonato. Se añadió 1/5 parte de PEG/NaCl (Polietilenglicol-8000 20%, NaCl 5M) y se dejó incubando 2 hr a 4°C. Después se centrifugó por 15 min a 10 000 rpm 4°C y el precipitado se resuspendió en 1000µl de buffer TBS (Tris-HCl 50Mm, NaCl 150mM pH 7.5). La suspensión fue pasada a un tubo eppendorf de 2mL y nuevamente se centrifugó por 10 minutos más, para eliminar por completo restos celulares. El sobrenadante se paso a tubos eppendorf nuevos y se le añadió 200 µl de PEG/NaCl incubando 1 hr en hielo. Después de una incubación de 1 hora a 4°C, se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm 4°C para posteriormente resuspender en 400 µl de TBS. Los fagos obtenidos fueron titulados con bacterias *E. coli* de la cepa TG1 para poder ser utilizados en la inmunización. Para esto se hicieron 3 diluciones seriadas de 1:1000 del fago ($1000 \times 1000 \times 1000 = 1 \times 10^9$) y una cuarta dilución de 1:10 ($10^9 \times 10 = 1 \times 10^{10}$) a partir de la tercera. Se infectaron 200 µl de células TG1 de densidad óptica aproximada a 0.6 con 30 µl de la dilución 3 y 3 µl de la

dilución 4. Se incubo por 30 minutos a 37°C sin agitación y posteriormente el cultivo fue plaqueado en cajas Petri con medio LB agar/Cb. Después de incubarlas por toda la noche a 37°C las colonias crecidas fueron contadas y consideradas para el cálculo de titulación. Se siguió la fórmula : #colonias totales/# μ l de dilución plaqueados x factor de dilución x volumen total en que están resuspendidos los fagos (generalmente 400 μ l de TBS)¹²⁶.

Inmunización

Una vez purificados los dos tipos de inmunógenos fueron utilizados para la inmunización de ratones Balb/c. Se utilizaron ratones hembras Balb/c de 3 a 6 semanas de edad y fueron distribuidos en grupos de 6 individuos. Cada grupo fue inmunizado con cada uno de los tres inmunógenos de ADN (VHB, VHP y VVH) o con cada uno de los 3 inmunogenos tipo fago M13 recombinante (BFL, ELN y GK1). Se realizó una primera inmunización y cuatro refuerzos cada 15 días. Los ratones fueron inmunizados con 75 μ g cada uno por vía intradérmica o con 1×10^{11} ufc por vía intraperitoneal y subcutánea alternandas en cada refuerzo con ADN y fago respectivamente. El suero preinmune e inmune fue obtenido a tiempo cero y cada 15 días después de cada inmunización. Todos los ratones fueron sangrados mediante sangría del seno retroorbital bajo anestesia con sevoflurano, y en el caso necesario fueron sacrificados mediante dislocación cervical. El manejo de los ratones fue en estricto apego a las normas de bioética y de seguridad del bioterio del Instituto de investigaciones biomédicas¹²⁷.

Ensayos Inmunoenzimáticos

Nuestros inmunógenos fueron generados a partir de un epítipo que se encuentra en el loop V3 de la proteína gp120. Se evaluó la capacidad de reconocer una proteína gp120 recombinante en ensayos de ELISA y Dot blot de los sueros de los ratones inmunizados con bibliotecas, nominales y controles. También fue utilizado el ensayo de ELISA con virus completo con el fin de conocer la capacidad de reconocer a la proteína gp120 en su forma nativa. Como suero control positivo se utilizó un pool de suero policlonal de pacientes infectados con VIH. A continuación se detallan las metodologías empleadas.

Ensayo de ELISA

Para el ensayo de ELISA se depositaron 250ng de proteína recombinante diluida en 100 μ l de buffer de carbonatos en cada pozo de una placa Nunc Maxi Sorp de 96 pozos y se incubó toda la noche a 4°C. Entre cada uno de los pasos la placa fue lavada 3 veces con 300 μ l de buffer de lavado (PBS-Tween 0.2%). Después del lavado se agregó 200 μ l de buffer de bloqueo (PBS-Leche2%) a cada pozo y se incubó 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron diferentes diluciones del suero empleando la cantidad necesaria de buffer de dilución (PBS-Leche2%-Tween0.05%), se añadieron 100 μ l de cada dilución a los pozos y se incubó por 2 horas a 37°C. Una vez retirado y lavado el suero, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rabano. El anticuerpo secundario fue utilizado a una dilución de 1:2500 y se añadió 100 μ l por pozo para dejar incubando durante 1 hora a 37°C. Finalmente la placa fue lavada y se añadió 100 μ l del sustrato de la enzima peroxidasa, el ABTS. La reacción colorimétrica fue leída en un lector de ELISA a 405nm cada 15 minutos.

En el caso del ELISA de virus completo se utilizó un stock de la cepa de referencia VIH IIIB proporcionado por la Dra Mónica Viveros del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Subirán. El stock del virus fue centrifugado a 1500 rpm por 20 minutos y a 4°C para eliminar restos celulares. Se tomó una alícuota para realizar una cuantificación total de proteínas por el método de microLowry. Posteriormente se centrifugó por 4 horas a 17 500 rpm y a 4°C. El precipitado se resuspendió en 100 μ l de PBS1X. Se tomó una alícuota para realizar una cuantificación total de proteína y se calculó el porcentaje de pérdida de proteína total. Con este porcentaje se calculó la concentración final que se tendría respecto de la concentración de p24 inicial del stock. Se utilizó 400 ng de p24 por pozo para la sensibilización. Todos los pasos y reactivos empleados fueron los mismos que en el ELISA de proteína recombinante.

Ensayo de dot blot.

Se utilizaron 250ng de proteína gp120 recombinante diluida en buffer de carbonatos para producir los puntos/círculos en una membrana de PVDF. Posteriormente la membrana fue lavada (PBST), bloqueada (PBS1X Leche2% a 4°C toda la noche) y puesta en contacto

con los diferentes sueros en PBS1X leche 2% tritón 0.2% toda la noche a 4°C en agitación leve. Transcurrido el tiempo se lavó y se añadió un anti-IgG de ratón conjugado a HRP a una dilución 1:2500 en PBS1X leche 2% tritón 0.2%, se incubó 1 hr a temperatura ambiente y agitación suave. Se lavó y se añadió una solución de diaminobencidina H₂O₂ 1% en PBS1x como sustrato de la enzima y se dejó revelando por 20 min a temperatura ambiente y en agitación suave.

Ensayo de neutralización

Siguiendo las recomendaciones del consorcio de anticuerpos neutralizantes decidimos realizar a nuestros sueros el ensayo de neutralización de pseudoviriones y se utilizaron virus de los niveles 1 y 2. El ensayo fue realizado por una compañía internacionalmente reconocida, Monogram Biosciences¹²⁸. Nuestro manuscrito publicado solo contiene resultados realizados con el ensayo basado en pseudoviriones, sin embargo esta tesis presenta resultados adicionales obtenidos con ensayo de neutralización en PBMC utilizando virus de los tres niveles realizados por el grupo de la Dra. Victoria Polonis (colaborador en US Military VIH Research Program, Washington, DC, EUA).

El ensayo de neutralización de pseudoviriones se le llama así debido a que el virus utilizado en el ensayo es un pseudovirus construido a partir del gen *env* de un aislado primario de VIH y, los genes virales restantes provienen de un vector. Brevemente, se inicia realizando una amplificación del gen *env* de aislados primarios de VIH o cepas del laboratorio del virus, la cual es clonada en un vector de expresión. Esta construcción en forma de ADN se co-transfecta junto con un vector genómico de VIH en una línea celular (células 293T derivada de fibroblastos de riñón) para generar las partículas virales. Una vez cuantificadas se incuba una cantidad específica de pseudovirus con diferentes diluciones del suero una hora a 37°C y después se añade esta mezcla en otra línea celular CD4+ CCR5/CXCR4 + que provee de células blanco y que además tiene un gen reporte de luciferasa inducible por *tat* (TZM-bl derivada de la línea celular HeLa). La infectividad se calcula 72 hrs después midiendo la actividad de la luciferasa en las células. La inhibición es expresada en porcentaje en relación a las células infectadas con virus sin la incubación con anticuerpos. La compañía Monogram nos envió sus resultados como Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀), la cual es definida como el recíproco de la dilución necesaria para

inhibir 50% la replicación viral. Para que el IC_{50} de un suero sea considerado positivo, su valor debe ser 3 veces más que el valor del IC_{50} de la neutralización de un virus no relacionado (aMLV) obtenido por el mismo suero. Esto evita dar como falso positivo una neutralización inespecífica del suero. El grupo de la Dra. Polonis nos envió sus resultados como porcentaje de inhibición respecto a un control positivo y negativo de inhibición.

El ensayo de neutralización en PBMC fue realizado por la metodología descrita por el grupo de la Dra. Polonis¹²⁹. Brevemente, el ensayo se realiza aislando diferentes virus de pacientes infectados y como células blanco se utilizan células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos. Las PBMC utilizadas para el cultivo son tratadas para de ellas obtener una población $CD4^+$ enriquecida/ $CD8^+$ depletada (CD4E/CD8D). Estas PBMC CD4E/CD8D son cultivadas y estimuladas para su crecimiento y así lograr una alta producción de partículas virales en sobrenadante. El virus obtenido se titula y una cantidad específica es incubada con las diluciones del suero igualmente por 1 hr a $37^{\circ}C$. La mezcla se añade a un nuevo cultivo de PBMC CD4E/CD8D. Pasadas 72-96 horas se cuantifica mediante diferentes técnicas la presencia del virus en sobrenadante o el número de células infectadas (en nuestros ensayos se empleo un ELISA cuantitativo del antígeno p24). El porcentaje se calcula con base en los cultivos de PBMC infectados con el virus sin la presencia del suero.

Bioselección (*Biopanning*)

Este ensayo se realizó con el objeto de conocer las secuencias de los epítomos reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados con la biblioteca del tipo ADN. Utilizando la reacción antígeno anticuerpo, a partir de una biblioteca de epítomos se eligen aquellos que sean reconocidos por los anticuerpos presentes en un suero (Fig 10). La unión anticuerpo/epítomo-fagoM13recombinante se disuelve utilizando un pH ácido y los fagos son eluidos. Los fagos eluidos se utilizan en rondas posteriores con el fin de obtener aquellos fagos que presenten los epítomos reconocidos con mayor sensibilidad y especificidad por los anticuerpos presentes en el suero. Los fagos M13 recombinantes tienen la ventaja que su ADN de cadena sencilla puede ser extraída y obtener la secuencia exacta del epítomo seleccionado. En este ensayo se utilizó un pool del suero de los ratones inmunizados con VHB. Se realizaron 3 rondas de bioselección con el

siero inmune contra dos bibliotecas comerciales de fagos M13 recombinantes de 12 aa al azar y de 7 aa al azar flanqueado por dos cisteínas (Ph.D.-C7C y ph.D.-12 Phage Display Peptide Library Kit New England Biolabs), y contra la biblioteca de fago M13 recombinante BFL generada a la par que la biblioteca de ADN VHB. La metodología detallada se describe a continuación.

El ensayo se realizó sensibilizando 4 pozos de una placa de ELISA (Nunc-immunoplate maxisorp surface) con 500ng/pozo de anti IgG de ratón en buffer de carbonatos pH~9.0 por una hora a 37°C, se lavó (PBST: PBS1X Tween 0.2%) y se bloqueó con PBS1X Leche 2% por 1 hr a 37°C. Transcurrido el tiempo se lavó y se añadió el suero a una dilución 1:50 diluido en PBS1X Leche2% tritón 0.2% incubándolo por 1 hr a 37°C. Posteriormente se lavó y se añadió la biblioteca de fagos 1×10^{11} fagos/pozo incubando toda la noche a 4°C. La biblioteca de fagos fue pre incubada en su diluyente (PBS1X Leche2% tritón0.2%) media hora antes de añadirse a los pozos para bloquear los sitios inespecíficos del fago. Al día siguiente se lavaron los fagos que no fueron seleccionados y se eluyeron los fagos, que fueron reconocidos/seleccionados por los anticuerpos presentes en el suero, con 100ul/pozo de trietanolamina 100mM incubando 30 min a temperatura ambiente. El contenido de los 4 pozos fue recolectado y neutralizado con 200ul de Tris-Base 1M pH 7.4. De esta elución se reservaron 50 µl para el aislamiento de clonas y su titulación para, de esta manera, tener al final del experimento títulos de entrada y de salida de cada una de las rondas. El resto de los fagos eluidos se utilizaron para infectar E. coli TG1 y ser amplificados por 6-8 hr a 37°C 250rpm. Los fagos fueron rescatados con una doble precipitación de PEG/NaCl y resuspendidos en 200 µl de buffer TBS, de los cuales se tomaron 10ul para la titulación. Al mismo tiempo que el rescate de los fagos, 4 nuevos pozos de la placa de ELISA fueron sensibilizados, bloqueados e incubados con el suero como ya se describió. Después de la incubación con el suero, se lavó y se añadió los fagos amplificados/rescatados de la primera ronda y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se siguió el mismo procedimiento para realizar esta segunda ronda y una tercera. Se aislaron clonas de los eluidos de las tres rondas, se amplificaron por separado, se extrajo cadena sencilla y se secuenciaron.

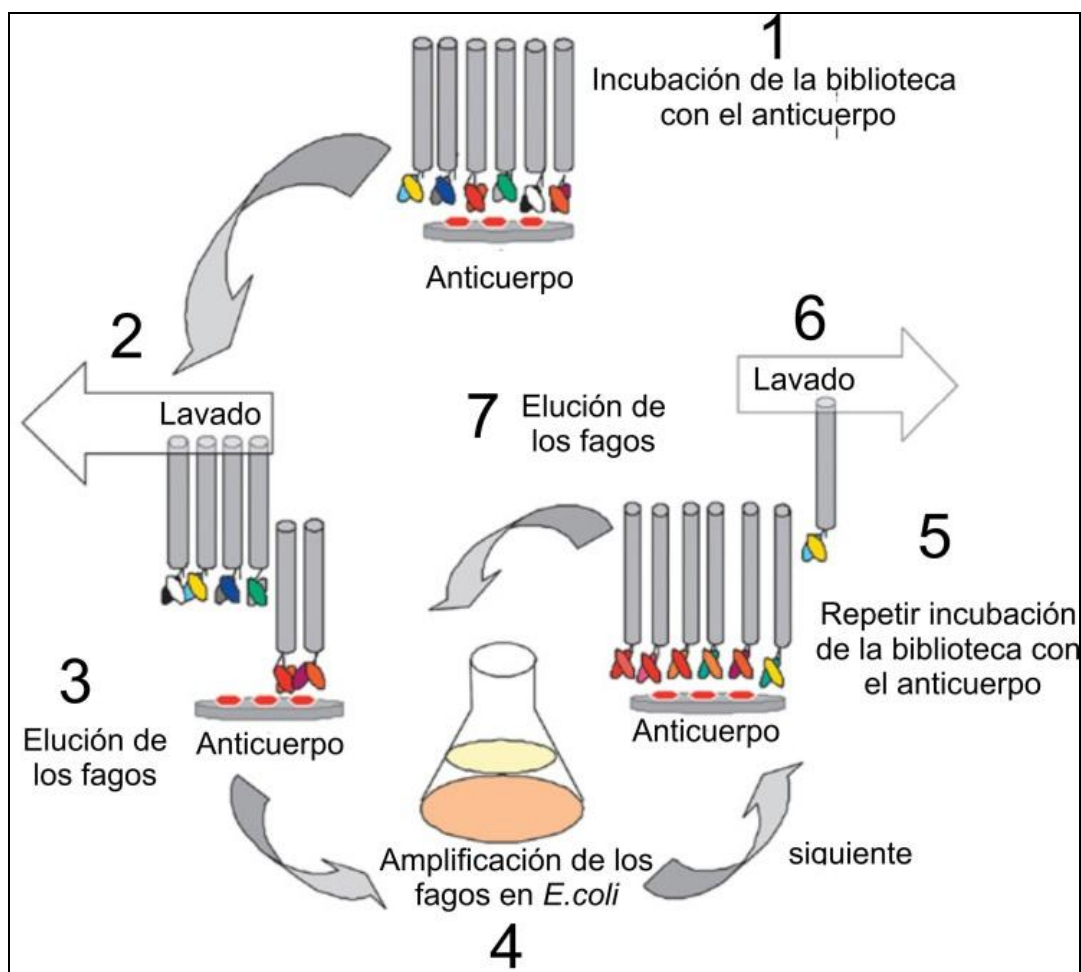


Fig. 10. Ensayo de Bioselección. A partir de una biblioteca de epítomos expresada en fagos M13 recombinantes se seleccionan aquellos que sean reconocidos por anticuerpos previamente fijados en la superficie (1). Los fagos que no son reconocidos son eliminados mediante lavados (2) y los fagos que se encuentran en unión a los anticuerpos de la placa debido al epítomo expresado en superficie permanecen. Estos fagos son recuperados al ser eluidos (3) utilizando un pH ácido que rompe la unión Ag/Ac. Estos fagos son amplificados (4) y purificados para una segunda y tercer ronda (5,6,7) nuevamente contra los anticuerpos para aumentar la especificidad y avidéz de los fagos recuperados.

Cuantificación de citocinas en suero

Con el objetivo de saber si nuestros inmunógenos generaban alguna respuesta antiviral de citocinas, se realizó la cuantificación de algunas citocinas antivirales en los sueros preinmunes e inmunes tanto de las bibliotecas, nominales así como de los controles. Se cuantificaron los niveles séricos de las citocinas con efecto antiviral RANTES, MIP 1 α y MIP 1 β ¹³⁰ así como interferón gamma e IL4 como indicadores de respuesta tipo T_{H1} y

T_{H2}, respectivamente. La cuantificación de las citocinas se realizó mediante un kit de ELISA comercial (PeproTech ®) siguiendo el protocolo del fabricante sin ninguna modificación. Una vez titulado el suero, se concluyó que la dilución 1:2 era la más adecuada para la cuantificación.

Ensayos de Proliferación Celular e Incorporación de ³H-Timidina.

Grupos de 3-5 ratones hembra BALB/c AnN de 4 a 6 semanas fueron inmunizados en una sola ocasión con los inmunógenos en fago: las bibliotecas de 5, 4, 3 y 2 mutaciones al azar, el epítipo nominal ELN y el epítipo no relacionado GK1. Se administraron 1×10^{11} UFC vía intra-peritoneal. Quince días después los ratones fueron anestesiados por inhalación de sevoflurano (sevorane) y sacrificados por dislocación cervical; sus bazos fueron extraídos para la obtención de los esplenocitos como se describe a continuación.

Los bazos de los ratones fueron extraídos mediante cirugía y perfundidos con 5 ml de medio de cultivo RPMI. Las células perfundidas en el medio de cultivo fueron colocadas en tubos de 15 ml y centrifugadas a 1500 rpm por 10 min. Al paquete celular se le agregó 1.5 ml de solución de lisis de eritrocitos y se incubó por 5 minutos agitando suavemente. Pasados los 5 minutos se agregó 10 ml de medio RPMI y se centrifugó nuevamente. El paquete se resuspendió en 5 ml de medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio, 1% de β -mercaptoetanol y 1% de penicilina-estreptomina. Posteriormente se realizó el conteo de células viables en un hemocitómetro. Los cultivos se realizaron colocando 5×10^5 células por pozo y 1×10^{10} ufc de los antígenos (fagos recombinantes) aislados y secuenciados previamente en un volumen final de 200 μ l de medio o 10 μ M de péptidos sintéticos. Los fagos M13 recombinantes que sirvieron como antígenos fueron 20 clonas al azar seleccionadas después de la clonación de la biblioteca BFL, pero antes de la amplificación, por lo que esas 20 secuencias no se encuentran representadas en la biblioteca BFL. También se emplearon 10 péptidos sintéticos como antígenos en los ensayos de proliferación celular. Las secuencias de los péptidos sintéticos corresponden con 10 de las

20 secuencias presentes en los fagos. Los cultivos se incubaron por 72 hrs cuando se utilizó fago o 5 días cuando se utilizó péptido como antígeno en una incubadora humidificada a 37°C y 5% de CO². Dieciséis horas antes de la cosecha se agregó 0.5 µCi de ³H-timidina por pozo. Posteriormente se realizó la cosecha de las placas en membranas de fibra de vidrio y selladas con 10 ml de líquido de centelleo. Se realizó la lectura de la incorporación de timidina en un lector betaplate (Wallac) en un formato de cuentas por minuto (cpm). Los índices de estimulación se determinaron utilizando la siguiente fórmula: cpm de células estimuladas con antígeno/ cpm de células sin estimular¹²³.

Análisis Estadístico.

Los valores son mostrados como la media ± desviación estándar. Las pruebas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis fueron desarrolladas usando el software GraphPad Prism en su versión 4.0 para Windows. Los valores de *P* menores a 0.05 fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Como hemos estado comentando, se generaron dos inmunógenos variables o bibliotecas de epítomos VHB (ADN) y BFL (fago) y cuatro inmunógenos control VHP, ELN (epítomo nominal ADN y fago), VVH y GK1 (epítomo no relacionado ADN y fago). La construcción de los inmunógenos inició con el ensamblaje de la región V_H , en donde la región CDR3 fue reemplazada por el epítomo nominal, control o biblioteca de epítomos. Esto dió como resultado una banda de aproximadamente 400 pb visible por electroforesis (Fig. 11A). La amplificación de los insertos que se clonaron en VHEXpress da como resultado una banda de aproximadamente 400pb (Fig. 11B carriles 3 y 5). Los insertos amplificados para la clonación en pG8SAET son de aproximadamente 100 pb (Fig. 11B carriles 2 y 4).

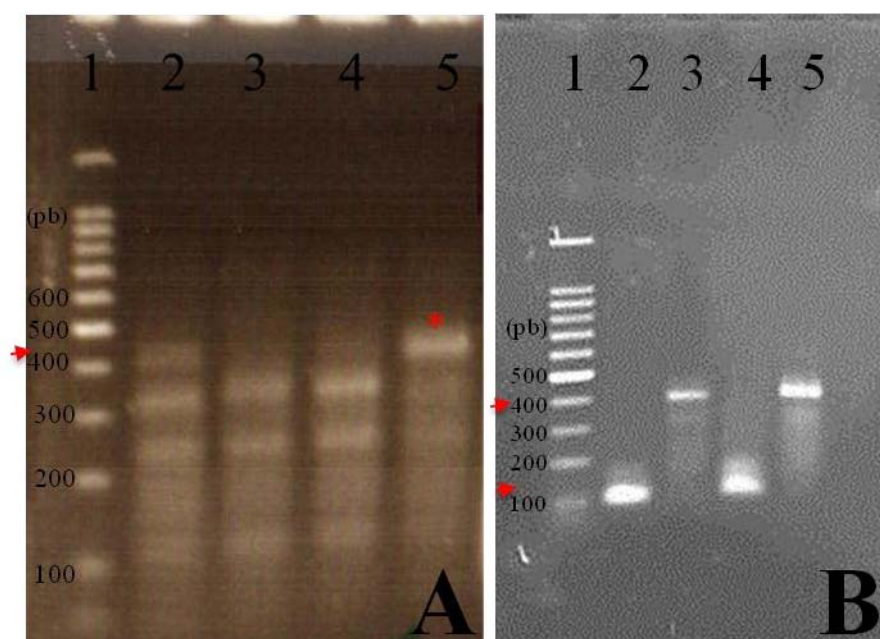


Fig. 11. Ensamblaje de la región V_H y amplificación por PCR. Se muestra una figura representativa (A) de la estandarización de la temperatura de alineamiento para el ensamblaje de la región V_H a temperaturas de 60°C, 58°C, 56° y 54°C (carriles 2-5). Utilizando la temperatura de 54°C (carril 5 *) se obtuvo la banda deseada (400 pb). Utilizando como templado la región V_H ensamblada se amplificó mediante PCR con primers específicos un fragmento de 100 pb que se muestra en (B) en los carriles 2 y 4 y otro de 400 pb en los carriles 3 y 5 para la clonación en pG8SAET y VHEXpress , respectivamente.

Se evaluó la eficiencia de transformación de las bibliotecas mediante la amplificación por PCR del inserto clonado a partir del ADN de 10 clonas ampicilina-resistentes seleccionadas al azar (Fig. 12). En el carril 8 se observa un fragmento que no corresponde al tamaño adecuado, por lo que la clona fue considerada negativa y descartada. A partir de la eficiencia de transformación (9 clonas positivas de 10 clonas seleccionadas) se corrigió el valor de la complejidad de las bibliotecas. La complejidad final de la biblioteca BFL en fago fue de 12,687 y la de VHB en ADN fue de 10,605. Mediante la secuenciación de clonas positivas por PCR y seleccionadas al azar de la biblioteca, se determinó que el 95 % (19 de 20) expresaba correctamente el epítipo clonado y eran secuencias diferentes entre sí, por lo cual la variabilidad final de las bibliotecas fue de 12,052 para BFL y 10,074 para VHB (se redondeó a 12000 y 10000 respectivamente). En la Tabla 5 se muestran las secuencias de 10 clonas de la biblioteca BFL en fago. Las complejidades de las otras bibliotecas de 4, 3 y 2 mutaciones construidas se muestran en la tabla 6.

Tabla 3. Secuencias de 10 clonas tomadas al azar de la biblioteca BFL.

Clona	Secuencia del Epítipo									
	R	G	P	G	R	A	F	V	T	I
Nominal	R	G	P	G	R	A	F	V	T	I
Biblioteca	X	G	X	G	X	A	X	V	X	I
	R	G	P	G	X	A	X	X	X	X
1	F	-	D	-	I	-	G	-	F	-
2	D	-	I	-	S	-	G	-	G	-
3	F	-	D	-	T	-	A	-	F	-
4	T	-	T	-	T	-	C	-	S	-
5	I	-	G	-	V	-	M	-	M	-
6	S	-	G	-	G	-	G	-	G	-
7	D	-	R	-	C	-	A	-	R	-
8	S	-	E	-	S	-	G	-	L	-
9	R	-	G	-	G	-	P	-	G	-
10	-	-	-	-	G	-	S	V	L	E

(-): Indica aminoácidos fijos desde el diseño de la biblioteca, las posiciones mutadas al azar que presentan el aminoácido idéntico a la secuencia nominal se muestran en gris.

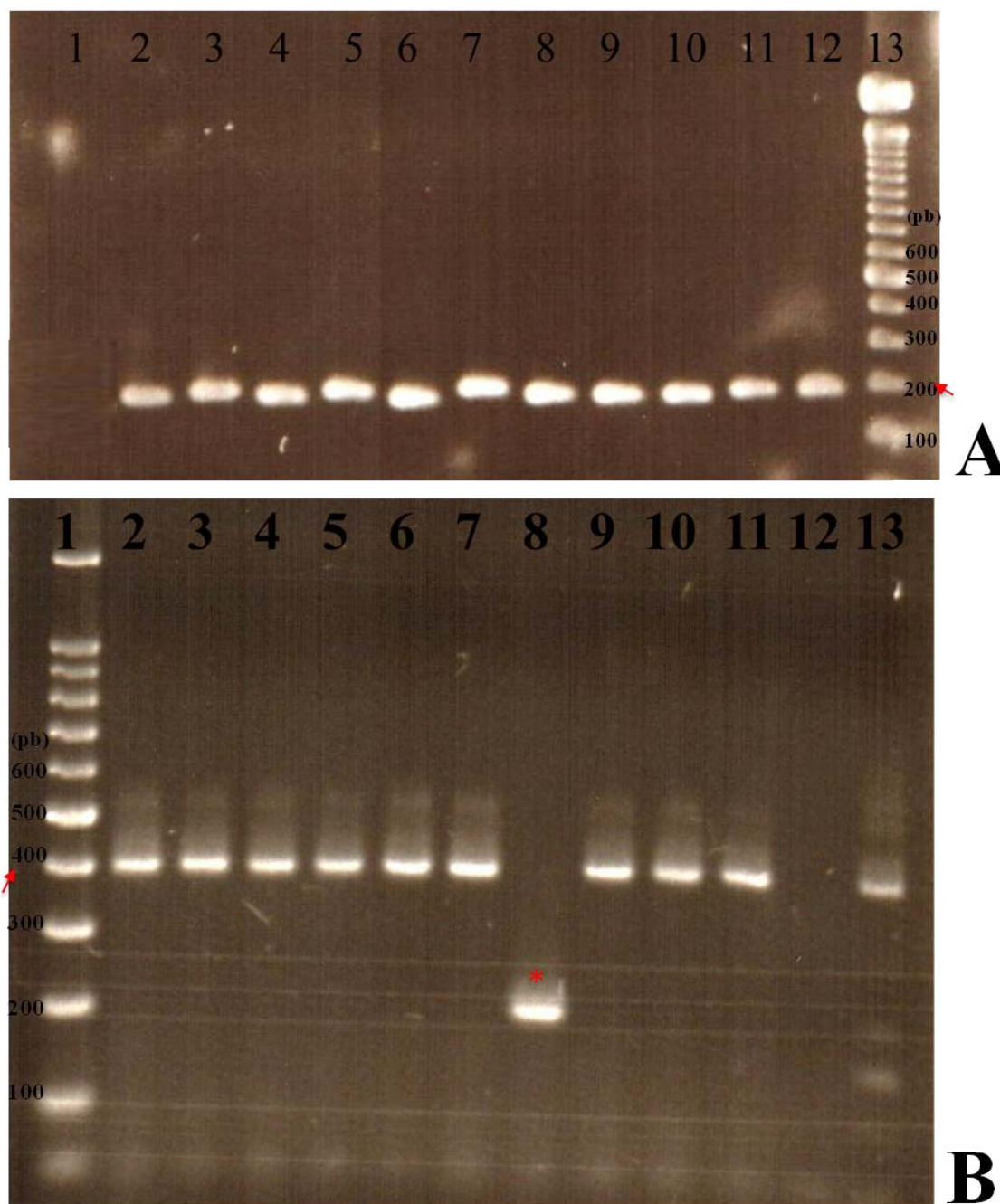


Fig. 12. Confirmación de clonación por PCR en 10 colonias Ampicilina resistentes seleccionadas al azar. (A) En los carriles 3-12 se muestran fragmentos de 200 pb amplificados (primers P5YSAET y D3) a partir de 10 colonias ampicilina resistentes obtenidas después de la clonación en el vector pG8SAET que confirman la presencia del inserto. Los controles negativo y positivo se muestran en los carriles 1 y 2. (B) En los carriles 2-11 se muestran los fragmentos de 400 pb amplificados (primers V3 y D5) a partir de 10 colonias ampicilina resistentes obtenidas después de la clonación en el vector VHEXpress que confirman la presencia del inserto en 9 de las 10 colonias seleccionadas. En el carril 9 se observa un fragmento de aproximadamente 200 pb (*) que no corresponde al inserto, por lo que la clona fue descartada. Los controles negativo y positivo se muestran en los carriles 12 y 13.

Una vez amplificados y purificados, los inmunógenos fueron utilizados para la inmunización de ratones Balb/c. La Tabla 6 muestra un resumen de los inmunógenos construidos y cuáles de éstos fueron utilizados para la inmunización. Los ratones fueron sangrados para obtener el suero preinmune antes de la primera inmunización y los sueros inmunes se recolectaron 15 días después de cada refuerzo.

Tabla 4. Resumen de los inmunogenos construidos.

	Nombre que recibió el inmunógeno		Variabilidad teórica	Secuencia en aminoácidos que expresa	Observaciones
	ADN	Fago M13 recombinante			
Nominal	VHP	ELN	---	RGPGRAFVTI	Epítipo nominal de VIH
Biblioteca 5 mut (variabilidad)	VHB 10 000	BFL 12 500	3.2 x 10 ⁶	RGPGXAXXXX y XGXGXAXVXI	Bibliotecas de epítopos basadas en la secuencias del nominal. Se generaron bibliotecas con 5, 4, 3 y 2 mutaciones al azar.
Biblioteca 4 mut (variabilidad)	VHB4 10 000	BFL4 10 000	160 000	RGPGRAAXXXX	
Biblioteca 3 mut (variabilidad)	VHB3 8 000	BFL3 8 000	8 000	RGPGRAFXXX	
Biblioteca 2 mut (variabilidad)	VHB2 800	BFL2 800	400	RGPXRXFVTI	
No relacionado	VVH	---	---	KGSYFDY	Epítipo codificante del oligonucleótido B7 al no ser reemplazado en el ensamblaje de V _H . Utilizado como control negativo para inmunógenos tipo ADN.
No relacionado	---	GK1	---	GYYYPSDPNTF FYAPPYSA	Epítipo de <i>tenia crassiceps</i> utilizado como control negativo para inmunógenos tipo fago M13 recombinante.

*Los inmunógenos utilizados para la inmunización de ratones y posterior obtención de sueros se muestran en gris: Biblioteca de 5 mutaciones, nominal y control negativo tanto en ADN como en fago. Las bibliotecas en fago de 5, 4, 3 y 2 mutaciones así como el nominal y control negativo en fago fueron utilizados para la inmunización de ratones y posterior obtención de esplenocitos para ensayos de proliferación celular.

Los sueros obtenidos fueron evaluados en su capacidad para reconocer a la proteína gp120, de la cual proviene nuestro epítipo expresado en las bibliotecas y nominal, mediante ensayos *in vitro*. El reconocimiento de la proteína gp120 recombinante (rgp120) solo se encontró en el quinto (último) suero inmune. En la Figura 13A se muestra el reconocimiento de la proteína rgp120 en ensayo de ELISA por los sueros de cada grupo de ratones, todos a una dilución de 1:100. Los resultados obtenidos por el suero de los ratones inmunizados con la biblioteca en fago M13 (suero anti-BFL) muestran un pobre reconocimiento de la proteína gp120 recombinante (rgp120) muy cercano al nivel del suero preinmune, sin embargo el suero de los ratones inmunizados con el epítipo nominal en fago M13 (suero anti-ELN) muestra un mayor reconocimiento. Un dato importante de señalar es el reconocimiento inespecífico hacia la proteína rgp120 por parte del suero generado por el inmunógeno control o epítipo no relacionado GK1 (suero anti-GK1). Respecto a los inmunógenos de ADN puede verse cómo, en comparación al suero de los ratones inmunizados con el control (suero anti-VVH) o al suero preinmune, el suero de los ratones inmunizados con la biblioteca (suero anti-VHB) y el suero de los ratones inmunizados con el epítipo nominal (suero anti-VHP) fueron incapaces de reconocer a la proteína rgp120 en el ELISA.

Tomando en cuenta que el reconocimiento *in vitro* de la proteína rgp120 no está relacionado directamente con la neutralización de VIH⁹³ debido a que naturalmente se encuentra formando trímeros y no monómeros, decidimos evaluar en nuestros sueros la capacidad de reconocer a la proteína en su forma nativa en un ensayo de ELISA utilizando virus completos. En la figura 13B podemos ver los resultados del ensayo a una dilución 1:200 de todos los sueros. El reconocimiento inespecífico de gp120 que presentaba el suero control anti-GK1 es menor al utilizar virus completo en el ensayo. Un resultado muy alentador fue ver cómo el reconocimiento se daba en una mayor intensidad del suero anti-BFL casi al igual que el suero nominal anti-ELN. En este ensayo sí se observó un reconocimiento por los sueros anti-VHP y anti-VHB, en comparación al suero preinmune y suero control anti-VVH.

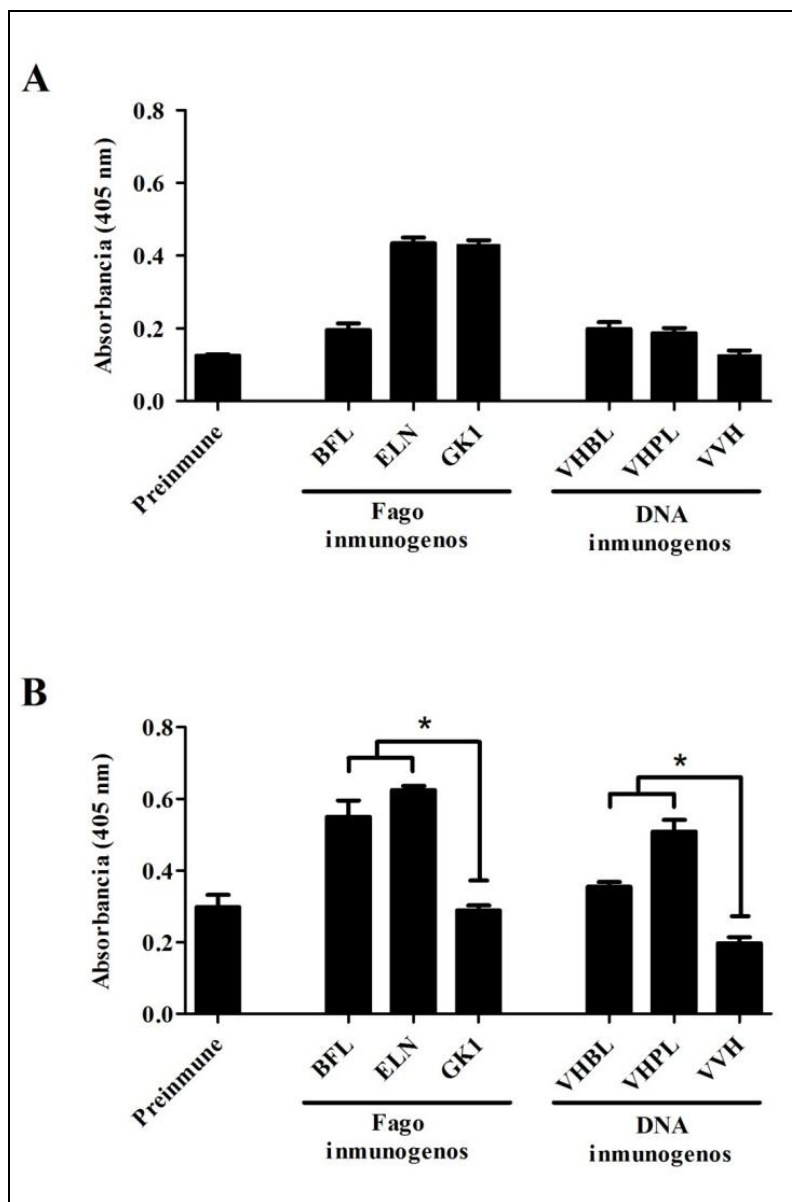


Fig. 13. Reactividad de los sueros hacia la proteína gp120 mediante ensayo de ELISA.

Las placas fueron sensibilizadas en (A) con proteína gp120 recombinante y en (B) con virus completo con el objetivo de tener a gp120 en forma nativa. Los sueros fueron incubados por 2 horas a 37°C a diluciones de 1:100 (A) y 1:200 (B) y posteriormente se añadió anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rabano. Una vez añadido el sustrato de la enzima las absorbancias fueron leídas a 405 nm. Los sueros inmunes se agruparon en 1) Fago Inmunógenos : Biblioteca BFL, Nominal ELN y Control negativo GK, y 2) DNA Inmunógenos : Biblioteca VHB, Nominal ELN y Control Negativo VVH. Los datos presentados representan la media \pm S ; * P <0.05.

Posteriormente, como confirmación se realizó un ensayo de dot blot dado que éste permite una mayor sensibilidad, es decir se puede seguir observando un reconocimiento, si existe, a diluciones mayores. En este ensayo también se utilizó la proteína gp120 recombinante. Los resultados muestran que a diluciones mayores (1:400) el reconocimiento de la proteína gp120 por los sueros preinmune y el suero control anti-VVH desaparece y se mantiene por los sueros nominales anti-VHP y anti-ELN. El reconocimiento por parte de los sueros de las bibliotecas anti-BFL y anti-VHB es débilmente detectado en la dilución mayor (1:400). Puede observarse también que existe hasta la dilución 1:400 un reconocimiento inespecífico de gp120 por el suero anti-GK1 (Fig. 14).

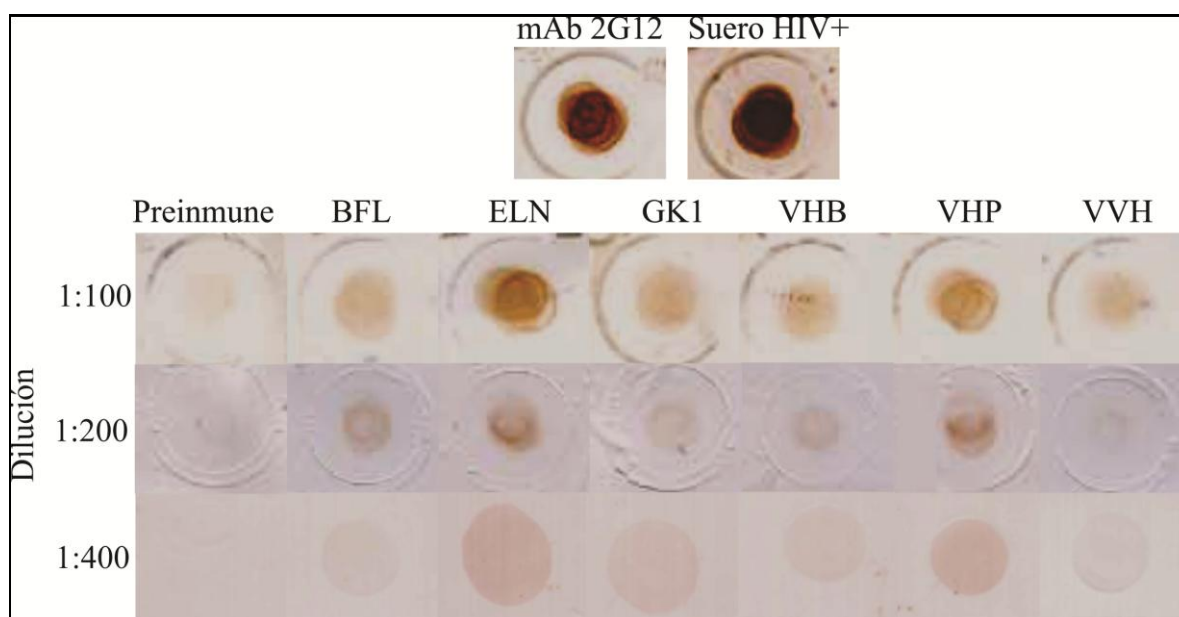


Fig. 14 Ensayo de dot blot. Se sensibilizó una membrana PVDF en forma de pequeños círculos con la proteína recombinante gp120. Los sueros fueron incubados toda la noche a 4°C. La detección se realizó empleando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa y una solución de diaminobencidina.

Después, decidimos probar la capacidad de nuestros sueros de neutralizar al VIH en ensayos de neutralización. Los sueros fueron utilizados en dos diferentes ensayos de neutralización y dichos ensayos fueron realizados en dos laboratorios diferentes: ensayo de neutralización de pseudoviriones y ensayo de neutralización en PBMC (ver sección de metodología para más detalles). En general la capacidad neutralizante de los sueros fue determinada contra al menos 30 aislados primarios de VIH-1. Los diferentes sueros generados fueron probados de manera independiente en tres ensayos de neutralización. Los sueros control anti-VVH y anti-GK1 inicialmente fueron probados y al dar negativos en todos los ensayos fueron omitidos en algunos ensayos posteriores.

En el primer ensayo de neutralización de pseudoviriones realizado por la compañía Monogram se utilizaron 3 cepas de laboratorio NL43, JRCSF y NSC (nivel 1) y 10 aislados primarios todos del subtipo B (nivel 2). La neutralización fue expresada como el recíproco de la dilución a la que se alcanzó un IC_{50} (como ya se explicó en la metodología). El suero anti-BFL logró neutralizar 5 de 10 aislados primarios, teniendo así un 50% de amplitud en la neutralización del nivel 2. El suero anti-ELN (nominal) que logró la neutralización de los tres virus del nivel 1 es incapaz de neutralizar aislados primarios. Por otro lado y para nuestra sorpresa, el suero nominal anti-VHP logró neutralizar 2 aislados primarios mientras que el suero anti-VHB (biblioteca) no lo hizo. Los sueros control anti-VVH y anti-GK1 no neutralizaron ninguno de los virus utilizados. Cabe señalar cómo el suero anti-GK1 que presentó un reconocimiento inespecífico hacia rgp120 en ensayos de ELISA presenta títulos altos de neutralización para VIH. Sin embargo, no son considerados positivos porque presenta también títulos altos con el control negativo viral aMLv, considerándose entonces una neutralización inespecífica. Los resultados de este ensayo se pueden ver en la Tabla 7.

Tabla 5. Títulos IC₅₀ del primer ensayo de neutralización.

Virus		Secuencia del epítipo derivado del loop V3 de gp120	Inmunógenos en Fago			Inmunógenos en ADN			Control Positivo
Nombre	GenBank Accession Number	³¹¹ R G P G R A F V T I ³²⁰	BFL	ELN	GK1	VHBL	VHPL	VVH	Z23
APV-2	DQ869026.1	I G P G R P W Y A T	<10	<10	26	<10	<10	<10	571
APV-4	DQ869028.1	V G T - R R F Y T T	17	18	74	<10	10	16	184
APV-5	DQ869029.1	M G P G K A F Y A T	<10	<10	15	<10	<10	<10	667
APV-6	DQ869030.1	I G P G R A W Y A T	<10	14	28	<10	<10	11	212
APV-8	DQ869032.1	I A P G R A F Y A T	<10	<10	20	<10	<10	<10	<100
APV-9	DQ869033.1	I G P G R A F Y A T	10	11	23	<10	<10	<10	<100
APV-10	DQ869016.1	I A P G R A W Y A T	10	13	28	<10	<10	10	129
APV-14	DQ869020.1	I G P G R A W Y A T	13	17	49	<10	<10	16	625
APV-16	DQ869022.1	I G P G R A W Y A T	13	20	25	<10	13	12	379
APV-18	DQ869024.1	M G P G K T L Y A T	<10	<10	<10	<10	<10	<10	140
NSC	-----	M G P G R A F Y T T	85	66	ND	74	52	ND	450
JRCSE	-----	I G P G R A F Y T T	11	16	26	<10	10	12	467
NL43	-----	R G P G R A F V T I	93	156	15	100	161	<10	3590
aMLV	-----	----	<10	<10	47	11	<10	<10	<100

Para realizar este ensayo se aísla el VIH de un paciente infectado (aislado primario). Solo el gen *env* del VIH, que codifica para las proteínas de envoltura, se utiliza para la generación de un pseudovirión. Posteriormente se utilizan líneas celulares CD4+ CCR5/CXCR4+ para la amplificación y titulación del pseudovirión. El suero es incubado 1 hr a 37°C con el pseudovirión. El virus quedará bloqueado e inhabilitado para infectar células blanco si existen AcN en el suero. Transcurrido el tiempo, la mezcla es añadida a células blanco (CD4+ CCR5/CXCR4+). El ensayo utiliza dos sueros control: negativo y positivo (pool de sueros humanos anti-VIH) y para descartar posible neutralización inespecífica de los sueros utiliza un virus control (aMLV). Los valores presentados son recíprocos de la dilución del suero que generó un 50% de neutralización del virus (IC₅₀). Un suero es considerado positivo (marca gris) cuando su VIH-IC₅₀ sea tres veces más que la aMLV-IC₅₀.

Posteriormente, se realizó un segundo ensayo también basado en pseudoviriones pero realizado por otro laboratorio. En este ensayo se utilizaron 2 cepas de referencia y 2 aislados primarios del subtipo B (nivel 2) y 9 aislados primarios de otros subtipos (A:2, C:3, D:1 y FRC:3) (nivel 3) (Fig. 15). No se observó neutralización mediada por los sueros generados por la inmunización con ADN: anti-VHB, anti-VHP y anti-VVH (datos no

mostrados). El suero anti-BFL logró neutralizar 5 de 11 aislados primarios (45% de amplitud) en comparación con el suero anti-VHP (nominal) o el suero control anti-GK1.

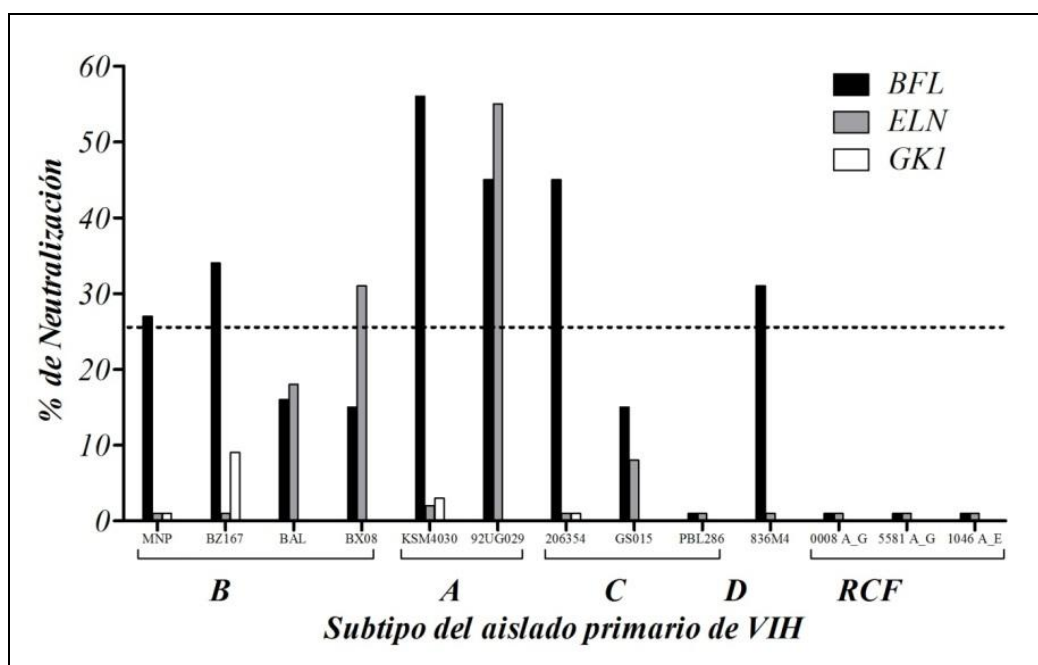


Fig. 15. Segundo ensayo de neutralización. Para realizar este ensayo se aísla el VIH de un paciente infectado (aislado primario). Solo el gen *env* del VIH, que codifica para las proteínas de envoltura, se utiliza para la generación de un pseudovirión con el gen reportero de la luciferasa. Posteriormente, se utilizan líneas celulares CD4+ CCR5/CXCR4+ para la amplificación y titulación del pseudovirión. El suero es incubado 1 hr a 37°C con el pseudovirión. El virus quedará bloqueado e inhabilitado para infectar células blanco si existen AcN en el suero. Transcurrido el tiempo, la mezcla es añadida a células blanco (CD4+ CCR5/CXCR4+). En este ensayo se utilizaron dos sueros control: negativo y positivo (pool de sueros humanos anti-VIH) para tomarlos como referencia del 0% y 100% de neutralización. Se presentan los porcentajes de neutralización de 13 aislados primarios de diferentes subgrupos de VIH obtenidos por los sueros anti- biblioteca BFL, nominal ELN y control negativo GK1. Se consideró positiva la neutralización $\geq 25\%$ (línea punteada).

De manera independiente se realizó el tercer ensayo de neutralización utilizando la metodología de PBMC descrita en material y métodos. En este ensayo se utilizaron 10 aislados primarios de diferentes subgrupos de VIH (A:2, C:3, D:1, FRC:4) (nivel 3). El suero anti-BFL logró neutralizar la cepa de referencia y 2 de 10 aislados primarios y, el suero anti-VHB neutralizó 5 de 10 así como la cepa de referencia. De tal modo que se tiene

un 20% y 50% de amplitud en la neutralización mediada por el suero anti-BFL y anti-VHB, respectivamente (Fig. 16). Cabe destacar que dos de los aislados primarios de las FRC's, que han sido reportados como resistentes a neutralización¹³¹, fueron neutralizados más del 50% por el suero anti-VHB y fueron corroborados en un segundo ensayo de manera independiente.

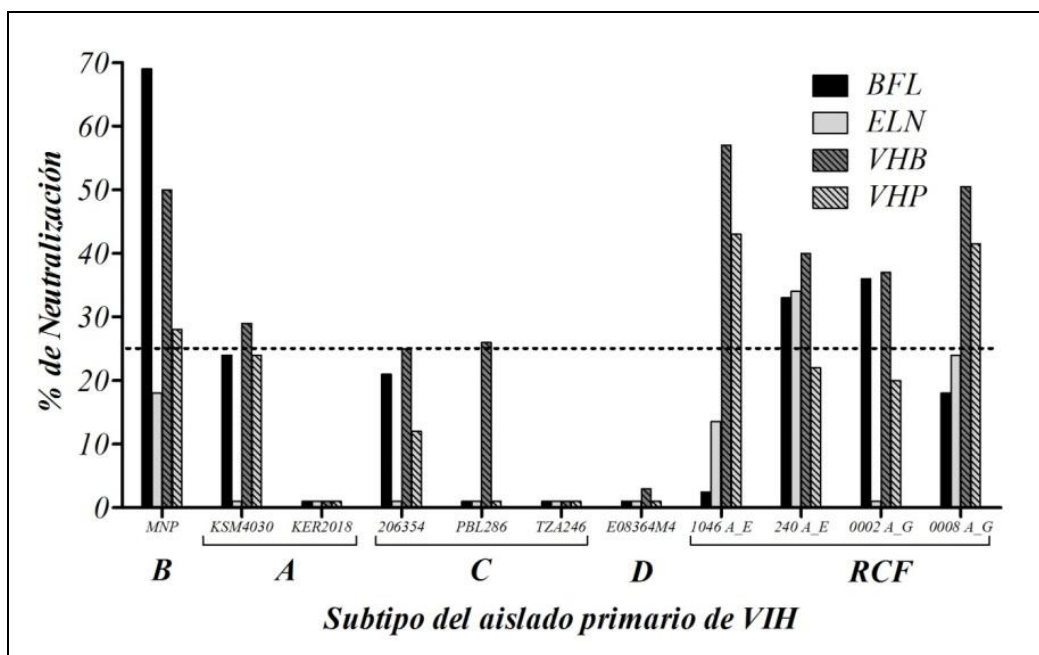


Fig. 16. Tercer ensayo de neutralización. Para la realización de este ensayo se aísla el VIH de un paciente infectado (aislado primario). El aislado es amplificado y titulado utilizando un cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donador sano. El suero es incubado por una hora a 37°C con un título específico de virus amplificado. El virus quedará bloqueado e inhabilitado para la infección de células blanco si existen AcN en el suero. Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla es añadida a un nuevo cultivo de PBMC. En este ensayo se utilizó un suero positivo y uno negativo para tomarlos como referencia del 0 y 100% de neutralización. Se presentan los porcentajes de neutralización de once aislados primarios de diferentes subgrupos de VIH obtenidos por los sueros anti- bibliotecas VHB y BFL y nominales VHP y ELN. Se consideró positiva la neutralización $\geq 25\%$ (línea punteada).

Tomando en cuenta los resultados de una manera global, los sueros generados con nuestros inmunógenos BFL y VHB presentan una amplia capacidad de neutralización logrando neutralizar hasta un 50% de los aislados primarios de VIH. Además, los sueros anti-biblioteca lograron neutralizar aislados primarios de diferentes subgrupos de VIH no solo del B e incluso se ha llegado a neutralizar aislados primarios resistentes a la neutralización.

Con el objetivo de saber si existían citocinas o quimiocinas antivirales presentes en los sueros que pudieran interferir en la neutralización, se realizó una cuantificación de éstas. Se cuantificaron los niveles de las citocinas de efecto antiviral RANTES, MIP 1 α y MIP 1 β así como INF- γ e IL4, un par de marcadores asociados a respuesta TH1 y TH2, respectivamente. Los niveles de citocinas RANTES y MIP1- α no fueron significativos con respecto a los sueros controles o el suero preinmune. A pesar de que los niveles encontrados de MIP1- β fueron mayores, estos valores no son biológicamente significativos, pues las concentraciones reportadas como antivirales son de la orden de nanogramos¹³⁰. Los niveles en suero de las citocinas IL4 e INF- γ solo fueron significativas al compararlas con el suero preinmune, sin embargo no hubo diferencia entre el tipo de inmunógeno empleado. El nivel de IL4 encontrado en todos los sueros inmunes fue significativamente mayor al de INF- γ , corroborando la respuesta TH2 inducida por el régimen de inmunización independientemente del inmunógeno. Los resultados de la cuantificación de citocinas se muestran en la Figura 17.

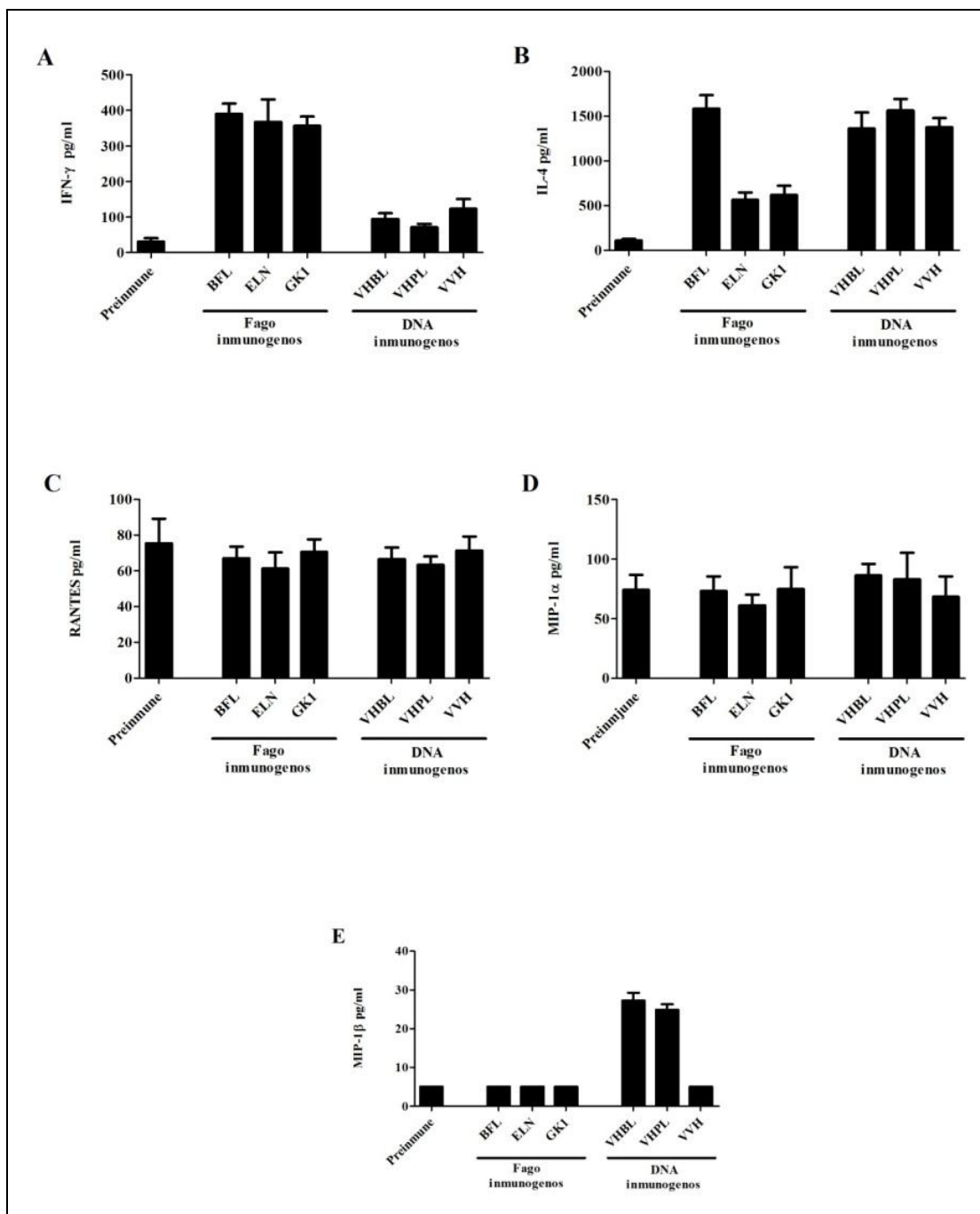


Fig. 17. Niveles de citocinas y quimiocinas antivirales en suero de ratones inmunizados. Se determinaron los niveles de las citocinas INF- γ (A) e IL-4 (B) características de la respuesta TH1 y TH2, respectivamente, así como de las quimiocinas antivirales RANTES (C), MIP-1 α (D) y MIP-1 β (E) presentes en los sueros mediante kits comerciales de ELISA cuantitativo. Los datos presentados representan la media \pm S.

Como paso final se realizaron ensayos de bioselección que tienen como objetivo conocer las secuencias a las cuales reconocen los anticuerpos presentes en el suero. Para estos ensayos se utilizan bibliotecas de epítomos al azar fusionados a la proteína III de un fago M13 recombinante. Utilizando esta estrategia es imposible caracterizar las secuencias relacionadas al epítomo VIH del suero BFL pues en él también existen anticuerpos contra las proteínas del fago que seleccionarían a todos los fagos de la biblioteca no importando el epítomo expresado en su superficie. Por tal motivo, este ensayo se hizo con el suero del inmunógeno VHB y como posibles antígenos de reconocimiento se utilizaron las bibliotecas comerciales de péptidos al azar de 7 aa y 12 aa, además de nuestra propia biblioteca BFL. Las secuencias de las clonas seleccionadas en los distintos ensayos de bioselección se muestran en las tablas 6 y 7.

Al analizar las secuencias de las clonas seleccionadas podemos observar lo siguiente:

1) Se recuperan aminoácidos nativos o se establecen aminoácidos con propiedades bioquímicas similares en algunas posiciones y la secuencia nominal (**RGPGRAFVTI**) del epítomo fue seleccionada⁴⁷ (Tabla 9 bioselección del suero anti-VHB contra la biblioteca en fago BFL)

2) Se encontró una clona con la secuencia **FYAT**, secuencia ampliamente encontrada en aislados primarios de VIH (Tabla 8 bioselección del suero anti-VHB contra bibliotecas comerciales en fago, secuencia 24).

3) Se encontraron motivos previamente no reportados: **FNSRP Y TK(C/M)X** (Tabla 8 bioselección del suero anti-VHB contra bibliotecas comerciales en fago).

4) Se encontró parte de un mimótopo de gp120 (**LRTTXKL**) previamente reportado¹²² (Tabla 9 bioselección del suero anti-VHB contra bibliotecas comerciales en fago, secuencias 18 y 19).

Tabla 6. Secuencias de las clonas seleccionadas por el suero anti-VHB en ensayo de bioselección.

1	-	-	-	T	T	S	L	Y	R	S	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	P	S	P	T	R	S	A	-	-	-	-
3	-	-	L	T	P	S	V	W	S	S	K	S	H	N	-
4	-	-	-	-	-	H	S	W	L	-	-	I	H	N	-
5	-	-	T	H	Q	K	P	S	D	L	P	I	G	H	-
6	-	-	-	-	-	-	P	L	T	L	P	A	T	-	-
7	-	-	-	A	Q	V	P	Y	F	S	N	H	P	S	G
8	-	C	C	K	Q	Q	P	Y	L	Y	-	-	-	-	-
9	-	-	T	K	C	Q	K	M	A	-	-	-	-	-	-
10	-	-	T	K	C	R	N	N	A	-	-	-	-	-	-
11	-	-	T	K	M	S	R	H	A	-	-	-	-	-	-
12	-	-	T	K	M	S	P	H	A	-	-	-	-	-	-
13	-	-	F	N	R	S	P	A	H	-	-	-	-	-	-
14	-	-	F	N	R	S	P	V	V	-	-	-	-	-	-
15	-	-	F	N	R	S	P	L	F	-	-	-	-	-	-
16	-	-	G	D	I	D	S	Q	G	V	R	P	H	E	-
17	W	L	G	D	I	T	Q	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	F	D	P	F	L	R	T	L	Q	G	T	H	-
19	-	-	C	L	I	R	L	R	T	-	-	-	-	-	-
20	-	-	L	P	W	A	Q	H	M	-	-	-	-	-	-
21	-	W	T	A	A	S	S	V	P	S	K	S	S	-	-
22	-	-	-	V	S	L	P	H	R	T	-	-	-	-	-
23	-	-	G	I	R	R	T	P	T	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	N	G	F	Y	A	T	T	-	-	-	-	-
25	-	-	Y	K	K	P	L	L	M	D	Q	I	L	K	-
26	-	-	N	A	G	A	L	L	A	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	P	L	S	K	F	H	V	-	-	-	-	-
28	-	-	I	P	D	Q	G	N	K	P	K	S	R	L	-

En el ensayo se utilizaron bibliotecas de fago M13 comerciales de 7 (ph.D. C7C) y 12 aa (ph.D. 12) al azar para conocer las secuencias que son reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero anti-VHB. Los motivos encontrados se muestran en gris.

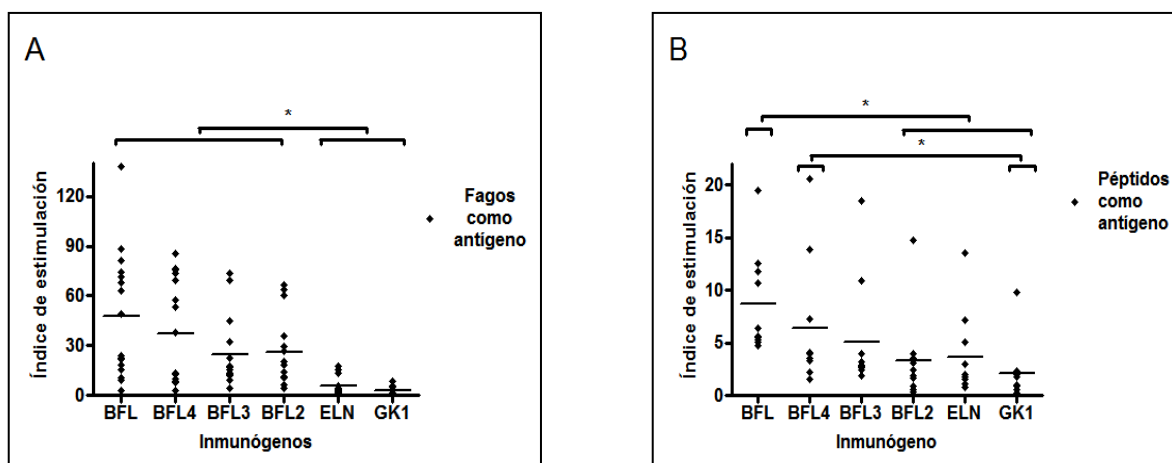
Tabla 7. Secuencias de las clonas seleccionadas por el suero anti-VHB en ensayo de bioselección utilizando la biblioteca en fago BFL.

1	S	G	A	G	N	A	K	V	S	I
2	S	G	G	G	G	A	S	V	K	I
3	S	G	T	G	A	A	Q	V	V	I
4	N	G	C	G	Q	A	P	V	R	I
5	H	G	V	G	Q	A	Q	V	Q	I
6	H	G	S	G	C	A	N	V	F	I
7	T	G	S	G	C	A	A	V	P	I
8	A	G	H	G	C	A	D	V	A	I
9	L	G	P	G	C	A	G	V	D	I
10	Y	G	N	G	C	A	Q	V	R	I
11	R	G	P	G	A	A	T	R	G	D
12	R	G	P	G	G	A	K	V	Q	A
13	R	G	P	G	R	A	F	V	T	I

Se muestran en gris aquellas posiciones donde el aminoácido de la secuencia nominal se recuperó o se presenta alguno de propiedades bioquímicas similares

Finalmente, presentamos los resultados obtenidos en ensayos de proliferación celular considerados de relevancia para el enfoque global de nuestros inmunógenos. Previamente, demostramos mediante ensayos de proliferación celular utilizando esplenocitos de ratones inmunizados que la inmunización con las bibliotecas BFL y VHB (de forma independiente) permite la estimulación y reconocimiento de un 50% de variantes del epítipo nominal L además de permitir la generación de una respuesta de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ ¹²³ (87). Este resultado aunado al 50% de amplitud en la neutralización de aislados primarios del virus obtenido en el presente trabajo, nos llevó a preguntarnos si el reconocimiento de variantes era debido a la utilización de una biblioteca compleja como inmunógeno. Para contestar a dicha pregunta decidimos evaluar la capacidad de reconocimiento de variantes de las bibliotecas de menor complejidad : 4, 3, y 2 mutaciones (únicamente se evaluó mediante ensayos de proliferación celular).

Para evaluar la capacidad del reconocimiento de variantes se inmunizaron en grupos independientes de ratones las bibliotecas en fago BFL, BFL4, BFL3, BFL2, además del epítipo nominal ELN y el control GK1. Se realizaron ensayos de proliferación celular utilizando los esplenocitos de los ratones inmunizados y como antígenos de estimulación: a) 20 fagos recombinantes que expresan secuencias de variantes del epítipo nominal (Fig 18 A) o, b) 10 péptidos sintéticos también con secuencias variantes del epítipo nominal (Fig 18 B). Se encontró que conforme se disminuye la complejidad de la biblioteca (BFL(5) → BFL2) el número de variantes con índices de estimulación mayor al control disminuye y, por lo tanto, la capacidad de generar respuesta contra variantes. Puede observarse cómo la capacidad de reconocer las variantes generada por la inmunización del nominal ELN es limitada en el ensayo con péptidos sintéticos y prácticamente nula en el ensayo con fagos recombinantes. Estos resultados demuestran que la capacidad de las bibliotecas de epítipos variables para inducir respuesta contra variantes depende de la cantidad de posiciones degeneradas dentro del epítipo.



DISCUSIÓN

El desarrollo de vacunas contra VIH necesita de nuevas estrategias. Esta necesidad se hizo más evidente después del fracaso de las vacunas AIDSVAX¹³² y STEP (Merck®)¹³³. Se sugirió que ambos fracasos se debieron a que no se generó una amplia respuesta inmune^{3,4,5,64}. Diversas estrategias basadas en la inmunización con un pool de variantes generan una respuesta amplia, sin embargo los anticuerpos neutralizantes inducidos están limitados a la neutralización de cepas de referencia con poca variabilidad^{107,108,110,109}. Nuestro grupo de trabajo recientemente ha reportado una nueva estrategia para el desarrollo de vacunas, la cual se basó en la hipótesis de que se induciría una respuesta inmune amplia si se presentaban epítomos al sistema inmunológico simultáneamente, como pool de variantes generados al azar en ciertas posiciones del epítomo¹²³. Este trabajo demostró que la inmunización con bibliotecas de epítomos variables al azar indujo un amplio repertorio de células T específicas contra un 50% de variantes¹²³.

En este trabajo nos hemos enfocado en generar una respuesta inmune humoral amplia contra VIH empleando una biblioteca de epítomos variables derivada de un epítomo del loop V3 de la proteína gp120. De acuerdo con las recomendaciones del consorcio de anticuerpos neutralizantes (NAC) un buen inmunógeno debe generar una amplitud superior al 10% con un 50% de neutralización o en el caso de amplitudes <10% la potencia debe ser superior al 80% de la neutralización⁸⁸. Nuestro inmunógeno generó una potencia limitada presentando IC₅₀ con títulos máximos de 12, sin embargo tuvo una amplitud del 50%, la cual es más alta que la reportada por otros. Al comparar con otros grupos de trabajo, los títulos de neutralización reportados por otros no son muy lejanos a los nuestros. Aquí enlistamos algunos ejemplos de acuerdo al inmunógeno empleado: a) ADN + Proteína recombinante: títulos de 10 a 40¹³⁴, b) vectores recombinantes adenovirales rAd : títulos de 5¹³⁵, c) ADN + rAd5 : títulos de 5¹³⁵ y d) proteína recombinante : títulos de 5 a 15¹³⁶.

Por otro lado podemos observar que la amplitud de neutralización del 50% que nosotros estamos reportando es más alta que la de estos autores, la cual es de un 16% a 40%^{110,134,135}. Por ejemplo, Mascola y col. reportaron que usando una primera dosis con ADN y refuerzos con un vector recombinante adenoviral (esquema de inmunización: ADN primera + rAd5 refuerzo) ambos codificantes de la proteína de envoltura de VIH generaba

anticuerpos neutralizantes contra VIH. Sin embargo la amplitud de la neutralización alcanzada por los sueros generados en macacos fue del 27% logrando la neutralización de 3 aislados primarios de un panel de 11 virus del subtipo B¹³⁵. Utilizando el mismo esquema de vacunación (ADN+rAd5), Seaman y col. inmunizaron monos con una vacuna que codifica para una poliproteína Gag-Pol-Nef en combinación con una mezcla de las proteínas Env de los subtipos A, B y C. Ellos obtuvieron sueros que neutralizaban 3 aislados primarios (dos del subtipo A y uno del B) de un panel de 22 virus de los subtipos A, B y C (ocho del subtipo A, seis de B y ocho del C)¹¹⁰.

La mayoría de estos autores concuerdan en que la amplitud es más importante que la potencia y nosotros estamos de acuerdo con esta aseveración. Esta aseveración es apoyada por algunas evidencias previamente reportadas^{92,104,137}. Por ejemplo, se reportó que el suero obtenido tras la inmunización pasiva en macacos con el anticuerpo monoclonal 2G12, el cual posee una amplitud de más del 80%, obtuvo un título de neutralización IC₅₀ *in vitro* de 1:1, el cual fue suficiente para que después de la inmunización pasiva, la carga viral disminuyera en aquellos monos infectados y confiriera protección a aquellos no infectados y retados con el virus de la inmunodeficiencia de simios¹³⁷. Por otro lado, los altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra una variante de VIH son efectivos por periodos muy cortos, pues la presión inmunológica lleva a una selección de mutantes del virus. Es claro que la potencia y la amplitud como componentes únicos no son la respuesta, pero creemos que la evidencia respalda que es difícil generar un suero con buena amplitud y que es relativamente sencillo aumentar la potencia de un suero que ya presenta amplitud como el nuestro.

Por otro lado, estamos conscientes de que, siendo este un nuevo concepto de inmunógeno, podría tener algunas deficiencias y que puede ser modificado para mejorar su respuesta. Por ejemplo, si bien mostramos que la amplitud puede darse en ambos tipos de inmunógenos ADN y fago recombinante, fue mejor la alcanzada por la biblioteca en fago recombinante BFL. Una estrategia para aumentar la potencia de los Ac ampliamente neutralizantes generados sería utilizar un esquema de inmunización ADN + fago M13 recombinante, pues se ha reportado que éste esquema genera AcN de mayor potencia que los generados por la inmunización con uno solo de los inmunógenos¹³⁴. Un reporte sobre

esto se encuentra en el trabajo anteriormente mencionado de Mascola y col., quienes utilizan un esquema de inmunización ADN+rAd5. La decisión de emplear este esquema vino de estudios preliminares que mostraban cómo el título de neutralización IC_{50} , de la cepa de referencia VIH89.6 de la cual provenía su vacuna, aumentó de 5 a 162 al utilizar el esquema combinado que sólo la inmunización con ADN¹³⁵. La biblioteca VHB en ADN podría ser transfectada en cultivo celular y obtenerla como proteína recombinante. El uso de ciertos adyuvantes¹³⁶ en la inmunización con proteínas recombinantes aumenta la potencia de la respuesta humoral. Li y col. reportaron que el uso del adyuvante GSKAS02A, un adyuvante que se ha usado en ensayos clínicos¹³⁸ compuesto de liposomas y componentes derivados de saponinas y agonistas del receptor toll-4, en la inmunización de la proteína recombinante gp120 inducía AcN con un porcentaje promedio de neutralización del 61%¹³⁹. Un porcentaje mayor comparado con el 35% de neutralización alcanzado por el uso del adyuvante Ribí, un adyuvante compuesto de un agonista del receptor toll-4 (monofosforil lipido A) y componentes microbianos mezclados en aceite. También podría cambiarse los vectores de expresión por otros más inmunogénicos (adenovirus, vacciniavirus etc)¹⁴⁰. Como podemos ver existen muchas alternativas para mejorar la potencia de nuestros AcN inducidos, sin embargo el concepto central de nuestro inmunógeno se mantendría, siendo esto lo más importante.

Regresando a la amplitud de neutralización como un resultado importante de nuestros trabajo, es importante señalar que el suero generado por nuestro inmunógeno fue retado en contra de cepas de referencia nivel 1, aislados primarios del subtipo B de VIH nivel 2 y aislados primarios de otros subgrupos A, C, D y formas recombinantes circulantes nivel 3. Como comentábamos antes, solo pudieron ser publicados los resultados del ensayo de neutralización de pseudoviriones por ser el recomendado por los organismos internacionales. En este ensayo se utilizaron 10 aislados primarios de VIH que habían sido caracterizados de acuerdo a su sensibilidad de neutralización a los 5 anticuerpos monoclonales más potentes contra VIH conocidos (2G12, 2F5, b12, 4E10 y CD4IgG2)¹⁴¹. Según este trabajo, los aislados APV-9 y APV10 son considerados como resistentes a la neutralización y nuestro suero fue capaz de neutralizar a ambos. La resistencia del aislado APV-9 puede corroborarse en nuestro ensayo donde claramente se ve que el control positivo fue incapaz de neutralizarlo.

Aunque no todos los resultados obtenidos por el suero VHB en los ensayos de PBMC pudieron ser corroborados, la neutralización de las formas recombinantes circulantes fueron corroboradas por segunda ocasión. Esto podría sugerir que resultados muy similares podrían haber sido obtenidos con los demás aislados primarios de haberlos corroborado. La neutralización de formas recombinantes circulantes es de suma importancia pues éstas son conocidas por su resistencia a la neutralización¹³¹.

Diferencias en los resultados de neutralización obtenidos usando diferentes metodologías han sido previamente reportadas, tanto así que la creación del NAC fue debida a que se observó que las diferentes metodologías imposibilitaba la comparación de resultados^{88,89,142}. Por ejemplo Zolla-Pazner y colaboradores utilizando un inmunógeno basado en gp120 generaron sueros inmunes en conejos que evaluaron con tres diferentes ensayos de neutralización (quimeras y pseudoviriones utilizando diferentes líneas celulares) y obtuvieron resultados diferentes en cada uno de ellos¹⁴³. Tomando en cuenta la disparidad de resultados se realizó una comparación entre diferentes metodologías de ensayos de neutralización y se reportó que la reproducibilidad de los ensayos de neutralización en PBMC entre laboratorios fue sumamente difícil y que incluso, la reproducibilidad intra laboratorios fue de menos del 60 %⁸⁹. Esto podría explicar algunas diferencias que encontramos en nuestros resultados de neutralización según el tipo de metodología utilizada, sin embargo la amplitud de neutralización en general se demostró en casi todos los ensayos realizados.

No se tienen bien claros los motivos por los que un método no sea comparable con la otra, pero cada una de ellas presenta tanto ventajas como desventajas. Por su parte, una de las ventajas de la metodología de PBMC es que asemeja más a las condiciones naturales⁸⁸. En la metodología basada en pseudoviriones los sueros solo se enfrentan a un pseudovirion con una sola secuencia mientras que en PBMC el suero es enfrentado a todo el pool de virus presente en un paciente. Sin embargo, los virus totales de un paciente solo pueden ser cultivados en dos o tres ocasiones antes de perder su fenotipo y volverse sensibles a la neutralización, mientras que los pseudoviriones construidos conservaran siempre el fenotipo resistente/sensible de su virus de origen⁸⁸. Por tal motivo la metodología basada en pseudoviriones es más fácil de reproducir y manejar. Estas

diferencias aunadas a los siguientes datos pueden explicar la neutralización del 80% de aislados de las FRCs obtenida en ensayos en PBMC y una casi nula neutralización en uno de los ensayos basado en pseudoviriones.

Nosotros creemos que no podemos dejar de lado todos estos resultados que sugieren la amplitud de neutralización del suero anti-VHB, sin embargo pudiese ser que la inmunización génica no es tan efectiva como la inmunización con fago M13 recombinante. Pues esta reportado que la inmunización génica favorece la respuesta celular y que por el contrario la inmunización proteica (el fago está constituido por un 87% de proteína) favorece la respuesta humoral. La reproducción del resultado de neutralización de las formas recombinantes circulantes nos hablan de una confirmación del concepto de variantes al azar y la falta de neutralización en uno de los ensayos de pseudoviriones nos habla de que el tipo de inmunógeno pudiera no estar generando una adecuada respuesta humoral y que posiblemente al modificar el inmunógeno se pueda mejorar.

Otra posible explicación a los datos contrastantes obtenidos por el suero anti-VHB en los ensayos de neutralización es la siguiente. Durante la respuesta inmune contra patógenos se seleccionan anticuerpos capaces de unirse con gran afinidad a antígenos extraños. En ocasiones, la afinidad de los Ac está relacionada con su capacidad de unión a ligandos homogéneos o unión bivalente homotípica. Es decir, anticuerpos capaces de unirse a dos moléculas del mismo antígeno¹⁴⁴. Sin embargo, en el caso de la espícula del VIH, la unión bivalente se dificulta debido a la escasa representatividad y por lo tanto, baja densidad de la espícula en el virión²⁹. Recientemente, se reportó que el 75% de 134 AcN de buena potencia (aislados de pacientes) no son bivalentes sino polireactivos¹⁴⁵. Es decir, los AcN presentaban capacidad de unión a ligandos heterogéneos o heteroligación; un sitio de alta afinidad anti-gp120 y otro sitio de baja afinidad sobre alguna otra molécula en la superficie del HIV. Utilizando una superficie con bajas cantidades de gp120 y grandes cantidades de una proteína hacia la cual los anticuerpos presentaban una afinidad moderada, se demostró que la afinidad de los AcNs polireactivos aumentó hasta 25 veces en comparación a la afinidad del AcN presente en superficies con bajas cantidades de gp120 pero sin la presencia de la segunda proteína. Se sugiere que algunos AcN del VIH pueden ser seleccionados por su polireactividad y que su escasa presencia en la infección o

su presencia “retrasada” se deba a que solo un 5% del repertorio total de células B son de naturaleza polireactiva¹⁴⁶.

La polireactividad de algunos AcN podría explicar la discrepancia encontrada en los diferentes ensayos de neutralización. La presencia de ciertas moléculas en la superficie del virus, que podrían aumentar la afinidad de los anticuerpos polireactivos según lo reportado por Mouquet y col., puede variar según el virus utilizado en el ensayo de neutralización. Podría decirse que la superficie de los pseudoviriones es homogénea pues solo se emplea el gen *env* de un aislado viral para su construcción y su amplificación ocurre en una línea celular que proviene de una clona. En cambio, la superficie de los virus no manipulados y empleados en la neutralización en PBMC es más heterogénea pues se utiliza el pool de virus aislado del paciente para su amplificación en un cultivo primario. Existe una mayor posibilidad de encontrar moléculas que puedan servir como un segundo sitio de baja afinidad en virus no manipulados. Por lo que, si la afinidad de un AcN polireactivo aumenta al unirse a segundos sitios de baja afinidad presentes solo en un tipo específico de virus/ensayo de neutralización, la cantidad de μg necesarios para la neutralización es menor y por lo tanto su potencia de neutralización sería mayor generando una discrepancia en los resultados.

Si la polireactividad de algunos AcN puede influir en las discrepancias encontradas en los diferentes ensayos de neutralización, por un lado podemos sugerir que, los AcN generados por nuestro inmunógeno BFL pudieran ser bivalentes. La expresión de los epítomos en fusión con la pVIII, la cual está altamente representada en la superficie del fago M13, puede favorecer la selección de Ac bivalentes. Por lo que la baja potencia neutralizante del suero anti-BFL podría deberse a la improbable unión bivalente a la espícula en el VIH disminuyendo así su afinidad. Por otro lado, posiblemente existan anticuerpos polireactivos en el suero anti-VHB que permanezcan indetectables por su baja afinidad en los ensayos de neutralización de pseudoviriones. En cambio, la buena potencia de neutralización del suero anti-VHB presente en los ensayos de neutralización en PBMC puede ser debida al aumento en la afinidad a la espícula viral gracias a la presencia de moléculas que actúen como segundo sitio de baja afinidad en virus no manipulados y ausentes en los pseudoviriones.

Por otro lado, nuestros sueros presentaron muy poco reconocimiento hacia el monómero de gp120 en ensayos de ELISA, proteína de la cual proviene nuestro inmunógeno. Esto puede explicarse debido a que si bien el reconocimiento de la proteína en ensayos de ELISA sugiere la presencia de anticuerpos, no siempre es señal de presencia de anticuerpos neutralizantes. En la infección natural por VIH la presencia de anticuerpos aparece entre las 6 y 8 semanas, pero la mayoría son anticuerpos no neutralizantes¹⁴⁷. Recientemente, se ha reportado la actividad ampliamente neutralizante de los sueros obtenidos de dos individuos africanos infectados con VIH subtipo A⁹³. Del total de sobrenadantes de cultivos de células B extraídas de estos pacientes que eran capaces de neutralizar al virus en ensayos de neutralización, hasta el 97% eran incapaces de reconocer a la proteína gp120 monomérica en ensayos de ELISA y sólo cuando el virus completo era utilizado en el ensayo se obtenía reactividad. Este hallazgo viene a demostrar lo que ya se había sugerido por algún tiempo; el reconocimiento del monómero de gp120 *in vitro* no corresponde a lo que ocurre naturalmente⁹³. En el virión la proteína gp120 se encuentra formando trímeros³⁰ y se sugiere que los sueros positivos en ELISA no generan neutralización debido a que el monómero no está presente *in vivo* en el virus. Nosotros demostramos cómo nuestro suero, que presentaba muy poco reconocimiento hacia el monómero de gp120 en ensayos de ELISA, fue capaz de reconocer mediante el mismo ensayo partículas completas del virus, sugiriendo que la neutralización está dada por el reconocimiento de la proteína gp120 en su forma nativa. Por lo tanto, nuestros resultados concuerdan con los estudios anteriores y sugieren poco valor biológico al ELISA.

Por otro lado, se sabe que la respuesta inmune evocada en un individuo es dependiente de la presentación antigénica de péptidos en complejo con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) propio^{148,149,150}. El surco del CPH destinado a albergar el péptido presenta preferencia por aquellos que tengan ciertos aminoácidos en determinadas posiciones, llamados residuos de anclaje¹⁵⁰. Ésta preferencia cambia según el haplotipo del CPH propio. Por un lado, la modificación de los aminoácidos de anclaje de un péptido nominal puede llevar al incremento en su afinidad con el CPH y potenciar así su inmunogenicidad¹⁵¹. Por el otro, la utilización de una mezcla de péptidos donde la secuencia del péptido ha sido modificada únicamente en los residuos de anclaje lleva a la reactividad cruzada *intraespecie e interespecie*^{152,153}. La diversidad de

epítomos/péptidos generados mediante la estrategia de bibliotecas de epítomos variables puede ser de utilidad en la creación de vacunas universales pues al ser un pool de epítomos al azar de un mismo epítomo es posible que pueda evocar una respuesta inmune independientemente del haplotipo específico del CPH presente en cierta raza o individuo.

De manera similar a lo explicado anteriormente, existen ciertos residuos en determinadas posiciones que son frecuentemente reconocidos por Ac ampliamente neutralizantes. Los resultados de las secuencias que son reconocidas por el suero anti-VHB revelaron la presencia de anticuerpos que reconocen la secuencia nominal y la conservación de residuos en ciertas posiciones. Las secuencias reconocidas por los anticuerpos del suero parecen conservar o presentar aminoácidos con características bioquímicas similares en la posición dos del epítomo. El motivo GPG ha sido previamente reportado como necesario para la correcta presentación del epítomo¹⁵⁴. Dos de las secuencias seleccionadas contiene parte (**LRT**) de un mimótopo (LRTTXKL) previamente reportado al ser encontrado por ensayos de bioselección contra suero de pacientes progresores lentos¹²². También fue encontrada la secuencia FYAT la cual es predominantemente encontrada en las secuencias de VIH aisladas de pacientes⁴⁷, sin embargo no creemos que sea la razón de la neutralización. La relevancia de esta secuencia sólo es en el sentido de que pudiésemos sugerir que la inmunización con nuestro inmunógeno asemeja la infección por VIH. Por otro lado encontramos los motivos FNSRP y TK(C/M)X, los cuales no han sido previamente reportados y que no representan ninguna secuencia primaria de las proteínas de envoltura. Estos motivos podrían ser nuevos motivos de neutralización que reconozcan secuencias secundarias o terciarias de la proteína gp120.

La presencia de anticuerpos que reconocen la secuencia nominal es de suma importancia pues se ha reportado la reversión de cepas mutantes hacia el nominal. Barouch y col. reportaron en macacos que la respuesta inmunológica ejercida hacia el epítomo p11 restringido al haplotipo Mamu-A*01 del CPH-I, necesario para la presentación antigénica a linfocitos T CD8⁺¹⁵⁵, generó cepas con mutaciones dentro del epítomo que impedían su correcto anclaje al CPH-I y posterior presentación antigénica generando escape inmunológico. Estas cepas mutantes fueron aisladas y utilizadas para la infección de macacos Mamu-A*01 negativos y en poco tiempo las mutaciones ya no se encontraban en

la población viral predominante, sino que había revertido a la secuencia del epítipo nominal¹⁵⁶. Como podemos ver la ausencia de respuesta inmunológica tanto hacia variantes como hacia la secuencia nominal puede ser motivo de escape inmunológico. Por lo que la presencia de anticuerpos que reconozcan la secuencia nominal en nuestros sueros puede evitar el escape inmunológico incluso si el virus revirtiera a la secuencia nominal.

Los resultados obtenidos de los ensayos de proliferación celular y las bibliotecas de 5, 4, 3 y 2 mutaciones sugieren que la amplitud de la respuesta está directamente relacionada con la complejidad de la biblioteca. Esto es relevante pues la inmunización indiscriminada de epítopos puede causar un agotamiento de la respuesta inmunológica^{50,157}. La progresión a SIDA ha sido relacionada entre muchos otros factores con el agotamiento de la respuesta inmunológica especialmente generada por una fuerte respuesta hacia epítopos irrelevantes⁵⁰. Además, a pesar de que no se han reportado casos en la infección por VIH, existe la posibilidad de causar autoinmunidad al inmunizar con tal cantidad de variantes. Es por esto que se puede buscar la complejidad mínima suficiente para generar una respuesta inmunológica amplia sin el riesgo de generar una respuesta autoinmune.

Podemos concluir que nuestro inmunógeno en base de bibliotecas de epítopos variables fue capaz de generar una respuesta amplia contra variantes. La amplitud del 50% en la neutralización de virus del nivel 2 es una de las más altas reportadas a la fecha. Los resultados de ELISA con la proteína recombinante, ELISA con virus completo y los nuevos motivos encontrados en nuestros sueros pudieran hablar de que se generaron anticuerpos ampliamente neutralizantes que reconocen secuencias secundarias y terciarias de la proteína nativa. La baja potencia de los anticuerpos puede ser fácilmente mejorada sin perder la base del inmunógeno que le confiere la inducción de Ac ampliamente neutralizantes. Creemos que esto no es solo relevante en el campo del VIH, sino en el desarrollo de vacunas como tal aplicando esta nueva estrategia para combatir otros patógenos de alta variabilidad antigénica como lo son VHC, Virus del dengue, Virus de la Influenza, entre otros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anon. UNAIDS Global report 2010 | UNAIDS Report on the global AIDS epidemic 2010. Available at: http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm. Accedido Mayo 2011.
2. Anon. mexico_2010_country_progress_report_es.pdf. Available at: http://www.unaids.org/en/dataanalysis/monitoringcountryprogress/2010progressreportsubmittedbycountries/mexico_2010_country_progress_report_es.pdf. Accedido Mayo 2011.
3. McMichael AJ, Hanke T. HIV vaccines 1983-2003. *Nat. Med.* 2003;9(7):874-880.
4. Johnston MI, Fauci AS. An HIV vaccine--evolving concepts. *N. Engl. J. Med.* 2007;356(20):2073-2081.
5. Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 2008;455(7213):613-619.
6. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(7):4144-4149.
7. McMichael AJ, Phillips RE. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:271-296.
8. Wang WK, Chen MY, Chuang CY, Jeang KT, Huang LM. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Immunol Infect.* 2000;33(3):131-140.
9. McCutchan FE. Global epidemiology of HIV. *J. Med. Virol.* 2006;78 Suppl 1:S7-S12.
10. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 2009;15(8):871-872.
11. Rivera-Morales LG, Novitsky VA, Trujillo JR, et al. The molecular epidemiology of HIV type 1 of men in Mexico. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2001;17(1):87-92.
12. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 1998;67:1-25.
13. Permanyer M, Ballana E, Esté JA. Endocytosis of HIV: anything goes. *Trends Microbiol.* 2010;18(12):543-551.
14. Kuritzkes DR. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr Opin HIV AIDS.* 2009;4(2):82-87.
15. Fantini J, Cook DG, Nathanson N, Spitalnik SL, Gonzalez-Scarano F. Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90(7):2700-2704.
16. Wu Y, Yoder A. Chemokine Coreceptor Signaling in HIV-1 Infection and Pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2009;5(12).
17. Suresh P, Wanchu A. Chemokines and chemokine receptors in HIV infection: role in pathogenesis and therapeutics. *J Postgrad Med.* 2006;52(3):210-217.
18. Sharon M, Kessler N, Levy R, et al. Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic beta hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity. *Structure.* 2003;11(2):225-236.
19. Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS.* 2009;23(2):147-160.
20. Cavarelli M, Scarlatti G. Phenotype variation in human immunodeficiency virus type 1 transmission and disease progression. *Disease Markers.* 2009;27(3):121-136.
21. Hoffmann C. The epidemiology of HIV coreceptor tropism. *Eur. J. Med. Res.* 2007;12(9):385-390.
22. Goujard C, Bonarek M, Meyer L, et al. CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clin. Infect. Dis.* 2006;42(5):709-715.
23. Wu Y. The co-receptor signaling model of HIV-1 pathogenesis in peripheral CD4 T cells. *Retrovirology.* 2009;6(1):41.
24. Roux KH, Taylor KA. AIDS virus envelope spike structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007;17(2):244-252.
25. Markovic I, Stantchev TS, Fields KH, et al. Thiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry. *Blood.* 2004;103(5):1586-1594.
26. Pantophlet R, Burton DR. GP120: Target for Neutralizing HIV-1 Antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 2006;24(1):739-769.
27. Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, et al. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989;86(17):6768-6772.
28. Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J. Gen. Virol.* 2003;84(Pt 7):1649-1661.
29. Zhu P, Liu J, Bess J Jr, et al. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature.* 2006;441(7095):847-852.

30. Zhu P, Winkler H, Chertova E, Taylor KA, Roux KH. Cryoelectron tomography of HIV-1 envelope spikes: further evidence for tripod-like legs. *PLoS Pathog.* 2008;4(11):e1000203.
31. Moore PL, Crooks ET, Porter L, et al. Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2006;80(5):2515-2528.
32. Gandhi RT, Walker BD. Immunologic control of HIV-1. *Annu. Rev. Med.* 2002;53:149-172.
33. Humbert M, Dietrich U. The role of neutralizing antibodies in HIV infection. *AIDS Rev.* 2006;8(2):51-59.
34. Wyatt R, Moore J, Accola M, et al. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J. Virol.* 1995;69(9):5723-5733.
35. Moore JP, Willey RL, Lewis GK, Robinson J, Sodroski J. Immunological evidence for interactions between the first, second, and fifth conserved domains of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1994;68(11):6836-6847.
36. Wyatt R, Sullivan N, Thali M, et al. Functional and immunologic characterization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins containing deletions of the major variable regions. *J. Virol.* 1993;67(8):4557-4565.
37. Bagnarelli P, Fiorelli L, Vecchi M, et al. Analysis of the functional relationship between V3 loop and gp120 context with regard to human immunodeficiency virus coreceptor usage using naturally selected sequences and different viral backbones. *Virology.* 2003;307(2):328-340.
38. Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science.* 1993;259(5102):1749-1754.
39. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, et al. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature.* 2005;434(7037):1093-1097.
40. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS.* 2003;17(13):1871-1879.
41. O'Connell KA, Brennan TP, Bailey JR, et al. Control of HIV-1 in Elite Suppressors Despite Ongoing Replication and Evolution in Plasma Virus. *J. Virol.* 2010;JVI.00548-10.
42. Poropatich K, Sullivan DJ Jr. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J. Gen. Virol.* 2011;92(Pt 2):247-268.
43. Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses. *Ann. Intern. Med.* 2001;134(9 Pt 1):761-776.
44. Galvani AP, Novembre J. The evolutionary history of the CCR5-Delta32 HIV-resistance mutation. *Microbes Infect.* 2005;7(2):302-309.
45. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 1995;332(4):228-232.
46. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 1994;68(9):6103-6110.
47. Corti D, Langedijk JPM, Hinz A, et al. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS ONE.* 2010;5(1):e8805.
48. Huang K-HG, Bonsall D, Katzourakis A, et al. B-cell depletion reveals a role for antibodies in the control of chronic HIV-1 infection. *Nat Commun.* 2010;1(7):102.
49. Barouch DH, Powers J, Truitt DM, et al. Dynamic immune responses maintain cytotoxic T lymphocyte epitope mutations in transmitted simian immunodeficiency virus variants. *Nat. Immunol.* 2005;6(3):247-252.
50. Cadogan M, Dalglish AG. Pathogenesis of HIV: non-specific immune hyperactivity and its implications for vaccines. *Clin Med.* 2008;8(3):267-271.
51. Harari A, Petitpierre S, Valleliau F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood.* 2004;103(3):966-972.
52. Soudeyans H, Pantaleo G. The moving target: mechanisms of HIV persistence during primary infection. *Immunology Today.* 1999;20(10):446-450.
53. Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat. Med.* 2004;10(8):806-810.
54. Musey L, Hughes J, Schacker T, et al. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in

- early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 1997;337(18):1267-1274.
55. Fauci AS, Johnston MI, Dieffenbach CW, et al. HIV vaccine research: the way forward. *Science.* 2008;321(5888):530-532.
56. Altfeld M, Goulder PJ. The STEP study provides a hint that vaccine induction of the right CD8+ T cell responses can facilitate immune control of HIV. *J. Infect. Dis.* 2011;203(6):753-755.
57. Frost SDW, Wrin T, Smith DM, et al. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(51):18514-18519.
58. Gaufin T, Pattison M, Gautam R, et al. Effect of B-Cell Depletion on Viral Replication and Clinical Outcome of Simian Immunodeficiency Virus Infection in a Natural Host. *J. Virol.* 2009;83(20):10347-10357.
59. Kelly HR, Urbanski M, Burda S, et al. Neutralizing antibody patterns and viral escape in HIV-1 non-B subtype chronically infected treatment-naïve individuals. *Hum Antibodies.* 2005;14(3-4):89-99.
60. Baba TW, Liska V, Hofmann-Lehmann R, et al. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat. Med.* 2000;6(2):200-206.
61. Holl V, Peressin M, Decoville T, et al. Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. *J. Virol.* 2006;80(12):6177-6181.
62. Gómez-Román VR, Patterson LJ, Venzon D, et al. Vaccine-elicited antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity correlated with significantly reduced acute viremia in rhesus macaques challenged with SIVmac251. *J. Immunol.* 2005;174(4):2185-2189.
63. Gilbert P, Wang M, Wrin T, et al. Magnitude and breadth of a nonprotective neutralizing antibody response in an efficacy trial of a candidate HIV-1 gp120 vaccine. *J. Infect. Dis.* 2010;202(4):595-605.
64. Walker BD, Burton DR. Toward an AIDS Vaccine. *Science.* 2008;320(5877):760-764.
65. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, et al. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature.* 1998;393(6686):705-711.
66. Fouts TR, Binley JM, Trkola A, Robinson JE, Moore JP. Neutralization of the human immunodeficiency virus type 1 primary isolate JR-FL by human monoclonal antibodies correlates with antibody binding to the oligomeric form of the envelope glycoprotein complex. *J. Virol.* 1997;71(4):2779-2785.
67. Wei X, Decker JM, Wang S, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature.* 2003;422(6929):307-312.
68. Bocharov G, Ford NJ, Edwards J, et al. A genetic-algorithm approach to simulating human immunodeficiency virus evolution reveals the strong impact of multiply infected cells and recombination. *J. Gen. Virol.* 2005;86(Pt 11):3109-3118.
69. Dauber DS, Ziermann R, Parkin N, et al. Altered Substrate Specificity of Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease. *J. Virol.* 2002;76(3):1359-1368.
70. Tobin GJ, Trujillo JD, Bushnell RV, et al. Deceptive imprinting and immune refocusing in vaccine design. *Vaccine.* 2008;26(49):6189-6199.
71. Webster RG, with Fazekas de St Groth. Disquisitions of Original Antigenic Sin. I. Evidence in man. *J. Exp. Med.* 1966;124(3):331-345.
72. Webster RG, with Fazekas de St Groth. Disquisitions on Original Antigenic Sin. II. Proof in lower creatures. *J. Exp. Med.* 1966;124(3):347-361.
73. Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, et al. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 2005;191(5):654-665.
74. Garrity RR, Rimmelzwaan G, Minassian A, et al. Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. *J. Immunol.* 1997;159(1):279-289.
75. Lubaki NM, Ray SC, Dhruva B, et al. Characterization of a polyclonal cytolytic T lymphocyte response to human immunodeficiency virus in persons without clinical progression. *J. Infect. Dis.* 1997;175(6):1360-1367.
76. Ross HA, Rodrigo AG. Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *J. Virol.* 2002;76(22):11715-11720.
77. Dykes C, Demeter LM. Clinical Significance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Fitness. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007;20(4):550-578.
78. Myint L, Matsuda M, Matsuda Z, et al. Gag Non-Cleavage Site Mutations Contribute to Full Recovery of Viral Fitness in Protease Inhibitor-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(2):444-452.

79. Liang C, Li X, Quan Y, et al. Sequence elements downstream of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat are required for efficient viral gene transcription. *J. Mol. Biol.* 1997;272(2):167-177.
80. Barouch DH, Kunstman J, Kuroda MJ, et al. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 2002;415(6869):335-339.
81. Liang C, Rong L, Laughrea M, Kleiman L, Wainberg MA. Compensatory point mutations in the human immunodeficiency virus type 1 Gag region that are distal from deletion mutations in the dimerization initiation site can restore viral replication. *J. Virol.* 1998;72(8):6629-6636.
82. Banke S, Lillemark MR, Gerstoft J, Obel N, Jorgensen LB. Positive Selection Pressure Introduces Secondary Mutations at Gag Cleavage Sites in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Harboring Major Protease Resistance Mutations. *J. Virol.* 2009;83(17):8916-8924.
83. Nakahara K, Wakasa-Morimoto C, Kobayashi M, et al. Secondary mutations in viruses resistant to HIV-1 integrase inhibitors that restore viral infectivity and replication kinetics. *Antiviral Res.* 2009;81(2):141-146.
84. Manrique A, Rusert P, Joos B, et al. In vivo and in vitro escape from neutralizing antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. *J. Virol.* 2007;81(16):8793-8808.
85. Bunnik EM, Euler Z, Welkers MRA, et al. Adaptation of HIV-1 envelope gp120 to humoral immunity at a population level. *Nat Med.* 2010;16(9):995-997.
86. Anon. AVAC | Download materials | AIDS Vaccine Handbook: Global Perspectives (2nd edition). Available at: <http://www.avac.org/ht/d/sp/i/2311/pid/2311>. Accedido Mayo 2011.
87. Anon. NAC | IAVI R&D Programs. Available at: <http://www.iavi.org/research-development/IAVI-RD-Programs/Pages/NAC.aspx>. Accedido Mayo 2011.
88. Mascola JR, D'Souza P, Gilbert P, et al. Recommendations for the Design and Use of Standard Virus Panels To Assess Neutralizing Antibody Responses Elicited by Candidate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vaccines. *J. Virol.* 2005;79(16):10103-10107.
89. Fenyö EM, Heath A, Dispinseri S, et al. International Network for Comparison of HIV Neutralization Assays: The NeutNet Report. *PLoS ONE.* 2009;4(2):e4505.
90. Means RE, Greenough T, Desrosiers RC. Neutralization sensitivity of cell culture-passaged simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 1997;71(10):7895-7902.
91. Derdeyn CA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, et al. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science.* 2004;303(5666):2019-2022.
92. Shibata R, Igarashi T, Haigwood N, et al. Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat. Med.* 1999;5(2):204-210.
93. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui P-Y, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science.* 2009;326(5950):285-289.
94. Anon. NIH AIDS Research & Reference Reagent Program. Available at: <https://www.aidsreagent.org/Index.cfm>. Accedido Mayo 2011.
95. Johnson RP, Desrosiers RC. Protective immunity induced by live attenuated simian immunodeficiency virus. *Curr. Opin. Immunol.* 1998;10(4):436-443.
96. Baba TW, Liska V, Khimani AH, et al. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat Med.* 1999;5(2):194-203.
97. Gundlach BR, Lewis MG, Sopper S, et al. Evidence for recombination of live, attenuated immunodeficiency virus vaccine with challenge virus to a more virulent strain. *J. Virol.* 2000;74(8):3537-3542.
98. Connor RI, Korber BT, Graham BS, et al. Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines. *J. Virol.* 1998;72(2):1552-1576.
99. Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J. Infect. Dis.* 2006;194(12):1661-1671.
100. Choudhry V, Zhang M-Y, Sidorov IA, et al. Cross-reactive HIV-1 neutralizing monoclonal antibodies selected by screening of an immune human phage library against an envelope glycoprotein (gp140) isolated from a patient (R2) with broadly HIV-1 neutralizing antibodies. *Virology.* 2007;363(1):79-90.
101. Gao F, Scarce RM, Alam SM, et al. Cross-reactive monoclonal antibodies to multiple HIV-1 subtype and SIVcpz envelope glycoproteins. *Virology.* 2009;394(1):91-98.
102. Montero M, van Houten NE, Wang X, Scott JK. The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine

- design. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008;72(1):54-84, table of contents.
103. Srivastava IK, Ulmer JB, Barnett SW. Role of neutralizing antibodies in protective immunity against HIV. *Hum Vaccin.* 2005;1(2):45-60.
104. Mascola JR, Lewis MG, Stiegler G, et al. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* 1999;73(5):4009-4018.
105. Nakowitsch S, Quendler H, Fekete H, et al. HIV-1 mutants escaping neutralization by the human antibodies 2F5, 2G12, and 4E10: in vitro experiments versus clinical studies. *AIDS.* 2005;19(17):1957-1966.
106. Voss G, Manson K, Montefiori D, et al. Prevention of disease induced by a partially heterologous AIDS virus in rhesus monkeys by using an adjuvanted multicomponent protein vaccine. *J. Virol.* 2003;77(2):1049-1058.
107. Goepfert PA, Tomaras GD, Horton H, et al. Durable HIV-1 antibody and T-cell responses elicited by an adjuvanted multi-protein recombinant vaccine in uninfected human volunteers. *Vaccine.* 2007;25(3):510-518.
108. Catanzaro AT, Koup RA, Roederer M, et al., Vaccine Research Center 006 Study Team. Phase 1 Safety and Immunogenicity Evaluation of a Multiclade HIV-1 Candidate Vaccine Delivered by a Replication-Defective Recombinant Adenovirus Vector. *Journal of Infectious Diseases.* 2006;194(12):1638 - 1649.
109. Azizi A, Anderson DE, Ghorbani M, Gee K, Diaz-Mitoma F. Immunogenicity of a polyvalent HIV-1 candidate vaccine based on fourteen wild type gp120 proteins in golden hamsters. *BMC Immunol.* 2006;7:25.
110. Seaman MS, Xu L, Beaudry K, et al. Multiclade human immunodeficiency virus type 1 envelope immunogens elicit broad cellular and humoral immunity in rhesus monkeys. *J. Virol.* 2005;79(5):2956-2963.
111. Feeney ME, Tang Y, Roosevelt KA, et al. Immune Escape Precedes Breakthrough Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viremia and Broadening of the Cytotoxic T-Lymphocyte Response in an HLA-B27-Positive Long-Term-Nonprogressing Child. *J Virol.* 2004;78(16):8927-8930.
112. Anon. AIDS Vaccine Trials Database | Trials Database. Available at: <http://www.iavireport.org/trials-db/Pages/default.aspx>. Accedido Febrero 2011.
113. Liljeqvist S, Ståhl S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J. Biotechnol.* 1999;73(1):1-33.
114. Faurez F, Dory D, Le Moigne V, Gravier R, Jestin A. Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine.* 2010;28(23):3888-3895.
115. Xiong S, Gerloni M, Zanetti M. Engineering vaccines with heterologous B and T cell epitopes using immunoglobulin genes. *Nat. Biotechnol.* 1997;15(9):882-886.
116. Lunde E, Rasmussen IB, Eidem JK, et al. «Troy-bodies»: antibodies as vector proteins for T cell epitopes. *Biomol. Eng.* 2001;18(3):109-116.
117. Musselli C, Daverio-Zanetti S, Zanetti M. Antigenized antibodies expressing Vbeta8.2 TCR peptides immunize against rat experimental allergic encephalomyelitis. *J Immune Based Ther Vaccines.* 2004;2(1):9.
118. Cano A, Fragoso G, Gevorkian G, et al. Intraspleen DNA inoculation elicits protective cellular immune responses. *DNA Cell Biol.* 2001;20(4):215-221.
119. Anon. Phage display y su aplicación en el diagnóstico clínico. Available at: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=18928&id_seccion=619&id_ejemplar=1950&id_revista=2. Accedido Febrero 2011.
120. Malik P, Perham RN. New vectors for peptide display on the surface of filamentous bacteriophage. *Gene.* 1996;171(1):49-51.
121. Burton DR. Phage display. *Immunotechnology.* 1995;1(2):87-94.
122. Humbert M, Antoni S, Brill B, et al. Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *Eur. J. Immunol.* 2007;37(2):501-515.
123. Pedroza-Roldan C, Charles-Niño C, Saavedra R, et al. Variable epitope library-based vaccines: Shooting moving targets. *Molecular Immunology.* 2009;47(2-3):270-282.
124. Manoutcharian K, Acero G, Munguia ME, et al. Human single chain Fv antibodies and a complementarity determining region-derived peptide binding to amyloid-beta 1-42. *Neurobiol. Dis.* 2004;17(1):114-121.
125. Sambrook J y Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.; 2001.
126. Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, et al. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect. Immun.* 1999;67(9):4764-4770.

127. Anon. REGLAMENTO_DEL_BIOTERIO.pdf. Available at: http://www.biomedicas.unam.mx/_administracion/reglamentos_y_contractos/archivos_pdf/REGLAMENTO_DEL_BIOTERIO.pdf. Accedido Febrero 2011.
128. Anon. Monogram Biosciences. Available at: <http://www.monogrambio.com/>. Accedido Febrero 2011.
129. Brown BK, Wiczorek L, Sanders-Buell E, et al. Cross-clade neutralization patterns among HIV-1 strains from the six major clades of the pandemic evaluated and compared in two different models. *Virology*. 2008;375(2):529-538.
130. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995;270(5243):1811-1815.
131. van Gils MJ, Schuitemaker H. Correlations between HIV-1 clades and HIV-1 antibody neutralization sensitivity: significant for vaccine development? *Curr. HIV Res*. 2010;8(8):579-586.
132. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *N Engl J Med*. 2009;361(23):2209-2220.
133. Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *The Lancet*. 2008;372(9653):1881-1893.
134. Law M, Cardoso RMF, Wilson IA, Burton DR. Antigenic and immunogenic study of membrane-proximal external region-grafted gp120 antigens by a DNA prime-protein boost immunization strategy. *J. Virol*. 2007;81(8):4272-4285.
135. Mascola JR, Sambor A, Beaudry K, et al. Neutralizing antibodies elicited by immunization of monkeys with DNA plasmids and recombinant adenoviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J. Virol*. 2005;79(2):771-779.
136. Burke B, Gómez-Román VR, Lian Y, et al. Neutralizing antibody responses to subtype B and C adjuvanted HIV envelope protein vaccination in rabbits. *Virology*. 2009;387(1):147-156.
137. Hessel AJ, Rakasz EG, Poignard P, et al. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS Pathog*. 2009;5(5):e1000433.
138. Lalvani A, Moris P, Voss G, et al. Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant Plasmodium falciparum malaria vaccine. *J. Infect. Dis*. 1999;180(5):1656-1664.
139. Li Y, Svehla K, Mathy NL, et al. Characterization of antibody responses elicited by human immunodeficiency virus type 1 primary isolate trimeric and monomeric envelope glycoproteins in selected adjuvants. *J. Virol*. 2006;80(3):1414-1426.
140. Barouch DH. Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(5):386-390.
141. Schweighardt B, Liu Y, Huang W, et al. Development of an HIV-1 reference panel of subtype B envelope clones isolated from the plasma of recently infected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2007;46(1):1-11.
142. Polonis VR, Brown BK, Borges AR, et al. Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. *Virology*. 2008;375(2):315-320.
143. Zolla-Pazner S, Cohen S, Pinter A, et al. Cross-clade neutralizing antibodies against HIV-1 induced in rabbits by focusing the immune response on a neutralizing epitope. *Virology*. 2009;392(1):82-93.
144. Stites Daniel P, Parslow Tristram G. *Inmunología básica y clínica*. 9th ed. México: Manual moderno; 2000.
145. Mouquet H, Scheid JF, Zoller MJ, et al. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heteroligation. *Nature*. 2010;467(7315):591-595.
146. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, et al. Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science*. 2003;301(5638):1374 -1377.
147. Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS*. 2009;23(2):147-160.
148. Dustin ML. The cellular context of T cell signaling. *Immunity*. 2009;30(4):482-492.
149. Casares S, Bona CA, Brumeanu TD. Modulation of CD4 T cell function by soluble MHC II-peptide chimeras. *Int. Rev. Immunol*. 2001;20(5):547-573.
150. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(8):607-618.
151. Zhao R, Collins EJ. Enhancing cytotoxic T cell responses with altered-peptide ligands. *Arch. Immunol*.

Ther. Exp. (Warsz.). 2001;49(4):271-277.

152. Sette A, Sidney J, Bui H-H, et al. Characterization of the peptide-binding specificity of Mamu-A*11 results in the identification of SIV-derived epitopes and interspecies cross-reactivity. *Immunogenetics*. 2005;57(1-2):53-68.

153. Sidney J, Assarsson E, Moore C, et al. Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immunome Res*. 2008;4:2.

154. Jiang X, Burke V, Totrov M, et al. Conserved structural elements in the V3 crown of HIV-1 gp120. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(8):955-961.

148. Anon. hiv_management-chapter_2.pdf. Available at: http://www.ashm.org.au/images/Publications/Monographs/HIV_Management_Australasia/hiv_management-chapter_2.pdf. Accedido Mayo 2011.

156. Barouch DH, Powers J, Truitt DM, et al. Dynamic immune responses maintain cytotoxic T lymphocyte epitope mutations in transmitted simian immunodeficiency virus variants. *Nat. Immunol*. 2005;6(3):247-252.

157. Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Clin. Microbiol. Rev*. 2001;14(4):753-777.