



Instituto Politécnico Nacional

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

Departamento de Inmunología

**Contribución de las propiedades adyuvantes intrínsecas del antígeno en la
diversificación del repertorio de anticuerpos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA

PRESENTA:

QA. Noemí Alejandra Saavedra Ávila

DIRECTOR EXTERNO:

DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

DIRECTOR INTERNO:

DRA. IRIS ESTRADA GARCÍA

MÉXICO, D.F.

2008

Jurado

Director: Dr. Constantino III Roberto López Macías.

Codirectora: Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García

Tutor interno: Dr. Sergio Estrada Parra

Tutor interno: Dra. Luvia Enid Sánchez Torres

Tutor interno: Dra. Mayra Pérez Tapia

Tutor externo: Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano

El presente trabajo fue desarrollado en:

Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica

Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI,

Instituto Mexicano del Seguro Social.

Laboratorio de Inmunología Molecular II

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

Instituto Politécnico Nacional

Dr. Contantino III Roberto López Macías

Director de tesis

Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García

Director Interno de tesis

Noemí Alejandra Saavedra Ávila.

SUSTENTANTE.

Este trabajo fue desarrollado gracias a los siguientes financiamientos:

- Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para estudios de Maestría
- Beca de la Coordinación de Investigación en Salud. División de Promoción y Desarrollo. Residentes y Becarios de investigación. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. SEP-CONACyT Proyecto No. 2004 4526-1
- Instituto Mexicano del Seguro Social. Fondo de Apoyo para Programas Institucionales de Investigación en Salud (FOFOI)-FP 2003/020. No de Registro IMSS. 2003-716-0133. Por el Fondo en Investigación en Salud (FIS) IMSS. 2007.FIS/IMSS/PROT/C2007/049
- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Universidad Nacional Autónoma de México Proyecto: IN224907.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Isibasi por darme la oportunidad de participar en este trabajo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.

Al Dr. Constantino López por su confianza, apoyo e instrucción en mi formación como investigadora.

A la Dra. Lourdes Andrea Arriaga por su apoyo en las técnicas citométricas llevadas a cabo en este trabajo.

Al Dr. Rodolfo Pastelin por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunoquímica en especial a M. en C. Cristina Gil Cruz, a Rossana Ocampo, Raúl Montecillo e Ileana Hernández.

A la Dra. Iris Estrada, a la Dra. Mayra Pérez y a el Dr. Rommel por su apoyo e instrucción en mi formación como investigadora.

A la Dra. Ingeborg Becker del laboratorio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo para que se llevara a cabo el trabajo en el bioterio.

Al Sr. Ricardo Vargas Orozco y el MVZ. Daniel Sánchez Almaraz del Bioterio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su invaluable colaboración con el manejo de animales, sin la cual este trabajo no hubiera sido posible.

A Erik y Ajax.

A María Dominga, Margarita y Lulú.

A mis compañeros del laboratorio.

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ABS	Albúmina sérica bovina
AID	Desaminasa inducida por activación
APC	Células presentadoras de antígeno
BCR	Receptor de linfocitos B
BZM	Linfocitos B de zona marginal
CD	Marcador de diferenciación
CLP	Progenitor linfoide común
CXCL	Ligando de quimiosina CXC
CXCR	Receptor de quimiosina CXC
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
FDC	Células dendríticas foliculares

Fc	Fracción cristalizable
FcR	Receptor Fc
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GC	Centro germinal
HEL	Lisozima de huevo de gallina
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferón
IRF	Factor regulador del interferón
LAM	Lipoarabinomanana
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácidos lipoteicoicos
MadCAM	Adresina de adhesión celular de la mucosa
MALT	Tejidos linfoides asociados a mucosa
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88

NF	Factor nuclear
NK	Células asesinas naturales
Omp	Proteína de membrana externa
OPD	Orto-fenilendiamina
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PapMV	Virus del mosaico de la papaya
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Peptidoglicana
Poly I:C	Copolímero del ácido poliinosínico y policitidílico
PRR	Receptores de reconocimiento patrón
RAG	Gen activador de la recombinación
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHM	Hipermutación somática
SSI	Solución salina isotónica
SSR	Secuencias de señal de recombinación
TB	Tuberculosis

TBE	Regulador de tris-boratos-EDTA
TD	Timo dependiente
TdT	Transferasa terminal desoxinucleotidilo
TI	Timo independiente
TIR	Receptor Toll/IL-1
TIRAP	Proteína adaptadora que contiene un dominio TIR
TLR	Receptor tipo Toll
TRAM	Molécula adaptadora relacionada con Trif
TRIF	Adaptador que induce IFN β que contiene un dominio TIR
TNF	Factor de necrosis tumoral
VCAM	Molécula de adhesión vascular celular
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia humana

Relación de Figuras

Figura 1. Esquema general de los rearrreglos V(D)J para el ensamblaje de los genes de receptor de antígeno

Figura 2. Ejemplo de tipificación de ratones MD4 por citometría

Figura 3. La inmunización con OVA no es capaz de diversificar el repertorio de anticuerpos en ratones MD4

Figura 4. La coinmunización con OVA no es capaz de diversificar el repertorio de anticuerpos, pero si esta es coinmuniza con ligandos de TLR 2, 3, 5 y 7 se produce de manera eficiente la diversificación del repertorio de anticuerpos en los ratones MD4

Figura 5. Las porinas OmpC y OmpF de S. typhi y PAPMV inducen la diversificación del respertorio de anticuerpos específicos en los ratones MD4

Figura 6. La coinmunización de OVA con PAPMV pero no de OVA con OmpC provoca la generación de anticuerpos específicos para el reconocimiento de OVA.

RESÚMEN

La memoria inmunológica es el mecanismo empleado por el sistema inmune para la generación de inmunidad contra la reinfección; la respuesta inmune celular como la respuesta de anticuerpos participan de manera importante en el establecimiento de inmunidad generando linfocitos T y anticuerpos protectores. Ambos tipos de respuesta son inducidas a través de la respuesta inmune innata que funciona como primera línea de defensa. Dentro de los receptores de la inmunidad innata, se han identificado a los receptores tipo Toll (TLR) los cuales pueden reconocer componentes microbianos que participan mediando el proceso inflamatorio inicial y contribuyen en el efecto adyuvante que ejercen un gran número de moléculas derivadas de microorganismos. La naturaleza adyuvante de una molécula puede modificar la calidad y la duración de la respuesta inmune adaptativa, sin embargo, permanecen poco explorados los mecanismos involucrados en la traducción de la respuesta inmune innata en memoria inmunológica y las características de las moléculas que inducen estos fenómenos.

Para entender qué propiedades deben tener las moléculas para generar anticuerpos de memoria en el presente estudio se empleó un modelo experimental de ratones transgénicos denominados ratones MD4 cuyo repertorio de anticuerpos está limitado al reconocimiento de lisozima de huevo de gallina (HEL). Ya que los mecanismos moleculares de la generación de anticuerpos de memoria hasta ahora descritos se basan en la diversificación del repertorio (hipermutación somática, cambio de isotipo) los ratones MD4 representan una herramienta útil

para observar la capacidad de diferentes antígenos para diversificar un repertorio de restringido.

Los ratones MD4 fueron inmunizados con ovoalbúmina (OVA) y no se observaron títulos de anticuerpos específicos, sin embargo, al coimmunizar a éstos ratones con OVA y diversos PAMP ligandos de TLR observamos la generación de anticuerpos específicos en la respuesta primaria y que estos títulos se elevaron después de la reinmunización. Estos datos muestran que la coimmunización de un antígeno sin propiedades adyuvantes intrínsecas con un PAMP puede activar los mecanismos de diversificación del repertorio y probablemente de ésta manera la generación de anticuerpos de memoria. Con el fin de investigar si las moléculas que son reconocidas tanto como antígenos como PAMPs activan los mecanismos de generación de memoria, inmunizamos ratones MD4 con porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi y con el virus del mosaico de la papaya (PapMV) que han sido descritos como antígenos con capacidad de activar a células del sistema inmune innato. Estos antígenos indujeron la producción de altos títulos de anticuerpos específicos en los ratones MD4 indicando que activaron de manera eficiente los mecanismos de diversificación del repertorio y por tanto de memoria inmunológica. Con estos datos concluimos que las moléculas que sólo son capaces de activar al sistema inmune adaptativo (antígenos) no son eficientes para generar memoria, no obstante, los antígenos que son reconocidos también por el sistema inmune innato son eficientes inductores de memoria, a estos antígenos con capacidad adyuvante intrínseca los hemos denominado "Pamptigens".

ABSTRACT

Immunological memory is the mechanism used by the immune system to generate immunity against reinfection. Cellular and antibody response significantly provides immunity generating effector T lymphocytes and protective antibodies. Both types of responses are induced by the innate immune response that serves as the first line of defense. Within the receptors of the innate immunity, the Toll like receptors (TLR) have been identified, these receptors can recognize microbial components and mediate the initial inflammatory process, in addition, contribute to the adjuvant effect on the antibody responses to molecules derived of microorganisms. The adjuvant nature of a molecule can change the quality and the length of the adaptive immune response, however, the mechanisms involved in the translation of the innate immune response in immunological memory and the features of the molecules that induce these phenomena remain unclear.

To understand the properties that molecules must have to generate memory antibodies. We used an experimental model of transgenic mice called MD4 mice, in these mice the antibody repertoire is limited to the recognition of hen egg lysozyme (HEL). Because the molecular mechanisms involved in the generation of antibody memory described so far are based on the diversification of the repertoire of antibodies, MD4 mice represent a useful tool to observe the capability of different antigens to diversify a restricted repertoire.

MD4 mice were immunized with ovalbumin (OVA), a poorly immunogenic antigen that haven't been reported as an inductor of innate immune response, no specific antibody titers were observed, however, the coinmunization of OVA and different TLR ligands, induced the generation of primary OVA-specific antibody response. After reimunization titers increased. These data shows that the coinmunization of an antigen that do not have intrinsic adjuvant properties together with a PAMP can activate the mechanisms of memory generation. In order to investigate if molecules are recognized as both, as antigen and as PAMPs, induce the generation of memory. MD4 mice were immunized with porins from *Salmonella enterica* serovar Typhi or papaya mosaic virus (PapMV). Both antigens have been described as antigens that also activate innate immune system as PAMPs. These antigens induced the production of high titers of specific antibodies in MD4 mice indicating that the mechanisms of diversification of the repertoire and therefore immunological memory were efficiently activated. With this data we concluded that the molecules that are only capable to activate the adaptive immune system (antigens) are not efficient to generate memory, in contrast, the antigens recognized also by the innate immune system are efficient inducers of memory. We propose that the term "Pamtigens" to antigens that have intrinsic adjuvant properties.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
a.Sistema inmune innato	1
b.Sistema inmune adaptativo.....	2
Especificidad	3
Diversidad	4
Memoria	4
c.Generación del repertorio de anticuerpos	5
Rearreglo V(D)J.....	6
Edición del receptor.....	8
d.Memoria inmunológica	9
e.Mantenimiento de la respuesta de memoria	13
f. Mecanismos de T y de B para generar memoria. Diversificación del repertorio de anticuerpos.....	15
g.Influencia de la inmunidad innata en la generación de memoria (TLR en LB y en LT).....	18
h. Modelos de estudio	21
Porinas	21
PapMV	22

Ovoalbúmina	24
Modelo experimental MD4.....	24
2.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
3.HIPÓTESIS.....	26
4.OBJETIVO GENERAL.....	27
Objetivos particulares	27
5.MATERIALES Y MÉTODOS	28
Ántígenos	28
Anticuerpos	28
Adyuvantes.....	28
Animales de laboratorio	29
Marcaje de lisozima con isotiocianato de fluoresceína.....	29
Tipificación de los ratones MD4.....	30
Inmunizaciones	32
Titulación de anticuerpos por el método de ELISA.	32
6.RESULTADOS	34

La OVA no es capaz de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos en los ratones MD4.	34
La inmunización con OVA junto con ligandos de TLR puede diversificar el repertorio de anticuerpos y generar títulos de anticuerpos específicos en ratones MD4	36
OmpC, OmpF y PapMV diversifican el repertorio de anticuerpos del ratón MD4	40
La coinmunización de OVA con PapMV pero no de OVA con OmpC diversifican el repertorio de anticuerpos	44
7.DISCUSIÓN	47
8.CONCLUSIÓN	52
9.BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXO. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	78

1.Introducción

a. Sistema inmune innato

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra patógenos y es capaz de reconocer microorganismos a través de un limitado número de receptores codificados en línea germinal denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR)[1]. Los PRR se encuentran tanto en forma soluble, como anclados a la membrana externa de las células o en compartimientos intracelulares[2;3].

Al conjunto de moléculas que son reconocidas por los PRR se les denomina patrones moleculares asociados a daño (DAMP)[4] y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP)[5;6]. Los DAMP son moléculas propias que tienen una función en la célula y generalmente se encuentran intracelularmente; cuando éstas se liberan al exterior debido a daño del tejido, éstas pueden ser reconocidas por diversos PRR; algunos ejemplos de éstas son ATP, ácido úrico[7], HMGB1[4] y componentes de la matriz extracelular como hialuronana y heparán sulfato[8]. Los PAMP son moléculas que provienen de microorganismos, se han identificado diferentes PAMP, algunos ejemplos son el lipopolisacárido (LPS), los ácidos lipoteicoicos (LT), la peptidoglicana (PG) de bacterias Gram-positivas, las porinas de bacterias Gram negativas[9] la lipoarabinomanana (LAM) de *Mycobacterium*, la flagelina, las CpGs no metiladas, y el RNA de doble cadena[5;10].

Los PAMP y DAMP al ser reconocidos por los PRR inducen mecanismos de activación en el interior de la célula y esta activación tiene como consecuencia el

inicio de la respuesta inmune contra el patógeno[5;6]. Dentro de los PRR hay un grupo de receptores muy estudiado que son los TLR. Los TLR son una familia de proteínas transmembranales, se conocen actualmente 11 miembros en humanos y 13 en ratones. Los TLR del 1 al 9 son conservados entre humanos y ratones mientras que, TLR10 es funcional en humanos pero no en ratones y TLR11 es funcional en ratón pero no en humano. La porción citoplásmica de los TLR muestran alta similitud a la de la familia del receptor de IL-1 y es llamado dominio de Toll/receptor de IL-1[11].

Los TLR son capaces de reconocer a un gran número de PAMP y DAMP. Esta unión inicia una rápida transducción de señales para la activación de factores nucleares como NF- κ B para la producción de citocinas proinflamatorias o IRF para la producción de interferones[3;11;12]. Los productos derivados de la señalización alertan al sistema inmune de la presencia de infección y también ayudan a iniciar la respuesta inmune adaptativa a través de la activación y maduración de células presentadoras de antígeno (en especial en células dendríticas[3]) actuando como potenciadores o también llamados adyuvantes de la respuesta inmune adaptativa ya que estas células son una conexión entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo[13].

b. Sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo se encuentra en los organismos cordados, monta una respuesta tardía y el reconocimiento molecular está mediado por los linfocitos B y T a través de sus receptores. Los linfocitos B cuentan con la inmunoglobulina

de superficie como receptor para el reconocimiento del antígeno, conocido también como BCR o mlg, mientras que los linfocitos T cuentan con el receptor de linfocito T (TCR). El repertorio de estos receptores es muy amplio, debido a que la generación de éstos receptores es a partir de rearreglos génicos; de esta manera el sistema inmune adaptativo puede reconocer a un gran número de antígenos[14].

La estimulación de los linfocitos B genera la producción de anticuerpos y la de los linfocitos T genera la producción de citocinas, moléculas de coestimulación y activación de linfocitos T citotóxicos, de esta manera el sistema inmune adaptativo es capaz de reconocer a los microorganismos patógenos y actuar en contra de éstos y sus productos[14-17].

Las respuestas inmunitarias adaptativas tanto humorales como celulares poseen características fundamentales que reflejan las propiedades de los linfocitos que median las respuestas.

Especificidad

Los linfocitos son capaces de reconocer y eliminar de manera selectiva microorganismos y moléculas extrañas. Ésta especificidad permite reconocer diferencias sutiles entre los antígenos. Los linfocitos T reconocen moléculas en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) con una especificidad; los anticuerpos provenientes de una célula plasmática pueden distinguir entre dos moléculas proteínicas que difieren en solo un aminoácido[14].

Diversidad

Cada linfocito expresa receptores de membrana que son capaces de distinguir diferencias estructurales mínimas entre los distintos antígenos. El número total de especificidades de reconocimiento de un organismo se denomina repertorio. Se calcula que puede haber 10^{16} diferentes especificidades; ésta propiedad del repertorio se denomina diversidad. La generación de este repertorio está dada por procesos que se llevan a cabo en órganos linfoides primarios (se llevan a cabo en la médula ósea para la generación de linfocitos B con BCR funcional o en el timo para la generación de linfocitos T con TCR funcional) y los procesos que están implicados son el rearreglo V(D)J o recombinación somática y la edición del receptor[14].

Memoria

Ante la exposición del sistema inmune a una molécula extraña, hay un aumento en la capacidad de respuesta ante un nuevo contacto con el antígeno. Los linfocitos B generan inmunoglobulinas que se unen a los antígenos con una afinidad mayor que las células B que no han sido previamente estimuladas, debido a que se lleva un proceso llamado hipermutación somática en donde hay mutaciones puntuales en el DNA que codifica para la fracción variable de las inmunoglobulinas y repercute en la generación de anticuerpos con ciertas variaciones en la secuencia de aminoácidos con una mayor fuerza de unión a su antígeno[14].

c. Generación del repertorio de anticuerpos

El repertorio de anticuerpos se genera a partir de información que se tiene almacenada en los genes que es rearmada al azar, de ésta forma se generan un gran número de especificidades. La selección y proliferación de las clonas que reconocen por primera vez al antígeno mediante éstos receptores, son útiles ante una nueva exposición del antígeno. Para originarse este amplio repertorio, células hematopoyéticas pluripotenciales se diferencian en Progenitores Linfoides Comunes (CLP), las cuales dan a lugar a precursores linfoides y posteriormente a células pro-B, pre-B y linfocitos B [14;18;19], durante este proceso, los linfocitos B generan BCR funcionales, la generación de estos se debe a dos procesos descritos llamados rearmado V(D)J y edición del repertorio. Cuando ya se ha generado este repertorio de anticuerpos, los linfocitos B salen de la médula ósea expresando inmunoglobulinas unidas a membrana con especificidad antigénica única. Estas células B que aún no reconocen antígeno circulan en la sangre y en la linfa y migran a los órganos linfoides secundarios, en especial al bazo y los ganglios linfáticos. Cuando el antígeno es reconocido a través del BCR activa al linfocito B, éste prolifera y algunas de las células que proliferaron se diferencian en células plasmáticas que secretan anticuerpos y después en células B de memoria. Dos tipos de cambios genéticos ocurren durante la diferenciación. Primero se llevan a cabo mutaciones que cambian las propiedades de unión por lo que los linfocitos B llevan a cabo un proceso de maduración de la afinidad y posteriormente se llevan a cabo cambios en la fracción constante que dan lugar al cambio de isotipo [20;21].

Rearreglo V(D)J

El rearreglo V(D)J se lleva a cabo en las uniones entre secuencias de señal de recombinación (SSR) y las secuencias de codificación. Este proceso es catalizado por enzimas que en conjunto se denominan recombinasa V(D)J. Las proteínas RAG-1, RAG-2 y la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) son los principales productos génicos que se han descrito que lo componen.

En términos generales el rearreglo es iniciado por la recombinasa V(D)J compuesta por las proteínas del gen activador de la recombinación 1 y 2 (RAG-1 y RAG-2). Juntas RAG-1 Y RAG-2 se unen a SSR que sitian a cada segmento génico e introducen un corte de doble cadena entre SSR y la secuencia de DNA que lo rodea. Los fragmentos de DNA terminales generados por el rompimiento son asimétricos, con la codificación terminal covalentemente sellada en forma de una horquilla y la señal terminal presente como un fragmento terminal como 5' fosforilado. La primer etapa del rearreglo V(D)J es el punto en el cual se impone la mayor parte, si no es que toda, la regulación de la reacción de recombinación[17;22-25].

El DNA fragmentado generado por el rompimiento producido por RAG puede ir mediante diferentes rutas. El primero es la unión V(D)J estándar, en la cual las horquillas se abren y se unen entre si al azar para formar una unión codificante, mientras las dos señales terminales se ligan heptámero a heptámero para generar una unión señalizadora que codifica para la Ig. La unión es mediada por los componentes de la ruta de reparación de unión final de DNA no homólogo (NHEJs). Alternativamente, dos productos no estándar de la recombinación V(D)J

pueden ser generados mediante la unión de segmentos terminales con codificación terminal. La regeneración de la unión de una señal con su marca de codificación original da lugar a una unión abierta y cerrada, mientras que la unión de una señal con la marca de codificación de su compañero de reacción genera una unión híbrida, produciendo diversos cambios en la secuencia final y de esta forma en las proteínas a las que dan lugar dando lugar a un repertorio diversificado al azar que tiende por ello a ser más selectivo. Finalmente el complejo RAG-1 y RAG-2 unido a las señales terminales catalizan el ataque que provoca el cambio de sitio de las señales terminales sobre un DNA blanco no relacionado[17;23-26](Figura 1). Este proceso promueve la diversidad de las especificidades que tienen las inmunoglobulinas en el reconocimiento de epitopos ya que en línea germinal se encuentran codificados regiones con múltiples exones que son unidos al azar por medio de diferentes procesos de recombinación provocando la generación de anticuerpos con una mayor afinidad al antígeno pero también anticuerpos con una afinidad menor[24;26].

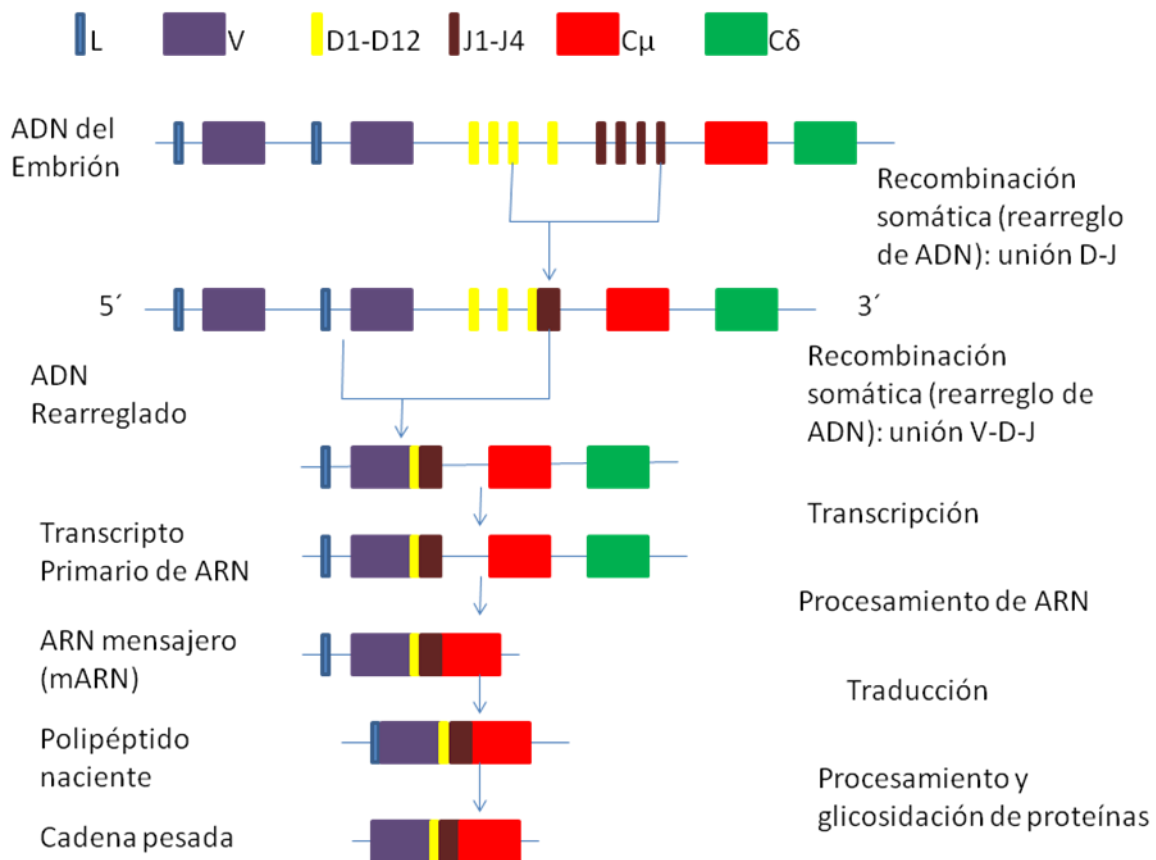


Figura 1. Esquema general de los rearrreglos V(D)J para el ensamblaje de los genes de receptor de antígeno

Edición del receptor

La edición del receptor es probablemente una adaptación que es necesaria debido a la probabilidad de autorreactividad del receptor. En los Linfocitos B, los genes que codifican para las dos cadenas del receptor de antígeno parece que son especialistas en promover la generación de diversas especificidades y la regulación de esas especificidades a través de una edición eficiente. La edición del receptor es un proceso que altera los receptores del antígeno permitiendo que

se lleven a cabo rearrreglos de los elementos del gen que codifican el receptor. Este proceso es el mecanismo de tolerancia dominante para desarrollar linfocitos B y ocurre en la etapa de maduración de linfocitos B en médula ósea. Cuando estos linfocitos B encuentran un antígeno propio que induce la señalización mediante el BCR su proceso de desarrollo es bloqueado y el rearrreglo V(D)J continúa. Si su desarrollo continúa y con la recombinación en el loci que codifica para la cadena IgL y posiblemente el loci IgH entonces se llevan a cabo modificaciones en los genes de la Ig y por lo tanto en la especificidad del BCR lo cual provoca que las células no sean más autoreactivas[27].

También hay estudios en donde se han descrito procesos de edición del receptor posteriores al reconocimiento antigénico. Se observaron que ratones con repertorio limitado diversifican su especificidad antigénica generando anticuerpos con reconocimiento a antígenos como virus de la estomatitis vesicular (VSV), porinas de *S. typhi*, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)[25;28].

Estos mecanismos son importantes para generar un amplio repertorio de linfocitos B con BCR funcionales.

d. Memoria inmunológica

La memoria inmunológica es la capacidad del sistema inmune para responder más rápida y eficazmente ante los agentes patógenos con los que se ha encontrado previamente y refleja la preexistencia de linfocitos antígeno-específicos.

Los linfocitos B de memoria generan al diferenciarse en células plasmáticas inmunoglobulinas que se unen a los antígenos con una afinidad mayor que las células B que no han sido previamente estimuladas.

Los anticuerpos de alta afinidad son los efectores de la rama humoral de la respuesta inmune adaptativa. Éstos son producto de la diferenciación de los linfocitos B, dirigida por los linfocitos T, en el proceso denominado reacción de centro germinal (GC). Los centros germinales, son estructuras que se forman en los folículos de los órganos linfoides secundarios, y es donde se lleva a cabo la expansión clonal de los linfocitos B, la hipermutación somática (SHM), el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas (CSR), la maduración de la afinidad, apoptosis, y la diferenciación de las células plasmáticas y el compromiso de los linfocitos B a células de memoria[29].

La formación y el mantenimiento de los GC depende de las interacciones entre los linfocitos B, linfocitos T y células dendríticas foliculares (FDC)[30-32]. Las FDC participan en la proliferación, selección y diferenciación de los linfocitos B a través de mecanismos dependientes e independientes de antígeno[33;34] mientras que los linfocitos T activados inducen la diferenciación de los linfocitos B de GC a través de interacciones célula-célula tipo CD40/CD40L y a través de citocinas[35].

Cuando los anticuerpos son producidos durante la respuesta primaria, los complejos inmunes (IC) son retenidos por largos lapsos en las FDC, debido a su alta expresión de receptores Fc y receptores de complemento, siendo CR1 y CR2 los más abundantes en los folículos primarios[31;36].

Las FDC proporcionan antígeno para su reconocimiento por el linfocito B, se cree que esta interacción es crucial para el desarrollo de anticuerpos de alta afinidad y que han llevado a cabo cambio de isotipo, así como para el establecimiento de la respuesta de memoria mediada por linfocitos B[31;33;34;36;37]. Además del aporte de antígeno, las FDC ofrecen numerosos estímulos no específicos durante la reacción de centro germinal que contribuyen a la óptima respuesta de B[38]. Las FDC expresan moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1, MadCAM-1, que proveen a los linfocitos B de GC de señales para prevenir la apoptosis y ayudan a la selección de los linfocitos B durante la maduración del BCR[39-42].

La expansión clonal de los linfocitos B activados (centroblastos), ocurre en el contexto de las FDC[43]. Posteriormente, se da inicio al proceso de SHM[44]. Los centroblastos se diferencian a centrocitos, dejando de proliferar y expresan una nueva inmunoglobulina en su superficie. Histológicamente pueden diferenciarse en los GC dos zonas la clara y la oscura[45].

La zona oscura, está conformada por centroblastos que proliferan y llevan a cabo SHM y una pequeña población de FDC [43]. La zona clara, está conformada principalmente por la red de FDC, centrocitos y linfocitos T. La diferenciación de células pre-plasmáticas y de memoria comienza alrededor del segundo día después de que ha iniciado la SHM, este retraso garantiza la alta afinidad de las inmunoglobulinas [46].

Otro componente importante en estos procesos son las quimiosinas pues se ha observado que son centrales en el desarrollo, organización y mantenimiento de la

arquitectura de los órganos linfoides secundarios, incluyendo la de los folículos. Para que el GC se desarrolle, es esencial que la estructura del folículo esté intacta. Particularmente, la quimiocina CXCL13 y su receptor CXCR5 son los responsables de la organización del folículo así como de la migración de las células B y T en los GC primarios [47;48].

En este sentido, la organización del GC está regulada tanto por CXCL12 y su receptor CXCR4 como por CXCL13 y su receptor CXCR5 [49]. Las quimiocinas, además de ser importantes para el tráfico y organización de los linfocitos B en el GC, también lo son para reclutar a los linfocitos T. Los linfocitos T CD4⁺ CXCR5⁺ migran a los folículos y a los GC en respuesta a CXCL13 [50-52]. La presencia de células T en el GC es importante para dar señales de diferenciación de los linfocitos B.

Se reconoce que CD28/B7 y CD40/CD40L son necesarios para la óptima activación de linfocitos B y T CD4⁺ en la formación de los GC [53;54]. Recientemente, se ha demostrado que también ICOS, un homólogo de CD28, es importante para el desarrollo de GC y que su señalización regula la diferenciación Th1/Th2[55;56].

Se ha reportado que algunas citocinas regulan la diferenciación de los linfocitos B en el GC. La IL-4 es producida por los linfocitos T y se asocia con la diferenciación de los linfocitos B [57]. Tanto IL-2 como IL-4 promueven *in vitro* la diferenciación a células B de memoria [58]. IL-6 que es secretada por FDC promueve la proliferación de linfocitos B[57]. La IL-10 se requiere para la diferenciación a célula

plasmática[57;58]. CD40L promueve la proliferación de linfocitos B, regula la apoptosis mediada por Fas [59] y favorece la diferenciación a células de memoria [60]. Tanto las FDCs como los linfocitos T expresan FasL y en este modo promueven la selección negativa a través de la apoptosis inducida por Fas [61].

Se considera que los complejos inmunes (IC) en las FDC juegan un papel importante en la selección de linfocitos B con alta afinidad, debido a que las células B que expresan receptores con alta afinidad tienen una mayor probabilidad de reconocer los epítopos de los antígenos secuestrados por las FDC. Las células B que son capaces de reconocer al antígeno se seleccionan, proliferan y se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad. Se ha reportado que la maduración de la afinidad se puede detectar en presencia de FDC que han unido IC, observándose que existe mínima o nula maduración de la afinidad en ausencia de FDC[62]. La maduración de las células B es seguida por la expresión de la enzima desaminasa inducida por activación (AID), seguida del cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y la producción de anticuerpos[62].

e. Mantenimiento de la respuesta de memoria

En cuanto al mantenimiento de la respuesta de memoria mediada por linfocitos B se han postulado los siguientes mecanismos:

1. Generación de linfocitos B con fenotipo de memoria [63;64].
2. Generación de células plasmáticas productoras de anticuerpos de larga vida[65-68]

3. Mantenimiento de la respuesta de memoria a través de la formación de depósitos de antígeno en células dendríticas foliculares, favoreciendo el constante estímulo antigénico [69-73].
4. Mantenimiento de la respuesta de memoria a través de la infección crónica o recurrente con el agente patógeno [74;75].

Recientemente, se ha propuesto un quinto mecanismo de mantenimiento de la respuesta de memoria de linfocitos B que sugiere que es mediado por activadores policlonales, por ejemplo el agonista de TLR9 CpG [76].

Se ha descrito en modelos de infecciones virales e incluso después de la administración de antígenos inertes que las células plasmáticas pueden migrar hacia la médula ósea en donde mantienen su capacidad de producción de anticuerpos [77-83]. En contraste, se ha identificado que las células B de memoria residen de manera preferente en bazo y ganglios y que también se encuentran recirculando en sangre periférica [68;84].

En ausencia de linfocitos B de memoria, la transferencia de células plasmáticas da lugar a una prolongada y sostenida producción de anticuerpos, lo que sugiere que las células plasmáticas pueden producir anticuerpos por periodos prolongados en ausencia de antígeno [68].

Se ha propuesto también que el mantenimiento de los títulos de anticuerpos en suero requiere de la continua proliferación y diferenciación de los linfocitos B de memoria a células plasmáticas productoras de anticuerpos [33;70;72;75;85].

Sin embargo, no se ha definido si el mantenimiento de la respuesta de memoria se debe a la participación de sólo uno de estos mecanismos o si es a consecuencia de la cooperación entre ellos.

f. Mecanismos de T y de B para generar memoria. Diversificación del repertorio de anticuerpos

Los linfocitos B que reconocen su antígeno se dirigen a los centros germinales en donde pueden llevar a cabo diferentes procesos de diversificación de los genes de las inmunoglobulinas como son el cambio de isotipo e hipermutación somática. El cambio de isotipo altera la región C de las cadenas pesadas de Ig, la parte que lleva a cabo la parte efectora. En contraste la hipermutación somática induce generalmente mutaciones puntuales en la región V de los genes de la cadena pesada y ligera de la Ig [23].

Cambio de Isotipo

Este proceso está limitado a linfocitos B activados y se inicia debido a la unión al antígeno específico de estas células. Este proceso permite la expresión de cadenas pesadas las cuales desencadenan nuevas funciones efectoras. El cambio de isotipo ocurre en las áreas de proliferación de células B especializadas de los tejidos linfoides secundarios que se encuentra en la zona clara de los centros germinales. El cambio de isotipo aparentemente es regulado por la naturaleza de los ligandos al BCR, el tipo de ayuda del Linfocito T y del entorno de citocinas

[17;23;26;27]. Sin embargo, se ha descrito que este proceso también ocurre en menor frecuencia ante antígenos timo independientes[86].

El proceso inicia cuando la enzima deaminasa inducida por activación (AID) provoca una lesión en dos regiones del gen de la Ig. El rompimiento de estas regiones es mediado por las vías de uracil DNA glicosilasa (UNG) y factor reparador de uniones mal hechas(MMR), después son ligadas por los componentes de la ruta de reparación de unión final de DNA no homólogo (NHEJs). Finalmente el resultado es que la región constante μ , que es proximal a la región V funcional, es reemplazada por una región α , γ ó ϵ conservando intacta la región V[17;23;26;87].

Hipermutación Somática

No se ha podido describir molecularmente a detalle como es que se lleva a cabo el mecanismo de hipermutación somática, sin embargo existe una idea de cómo los linfocitos B utilizan factores específicos de tipo celular para iniciar un ataque en el locus variable de Ig por lo que emplean rutas de reparación y recombinación comunes para modificar la secuencia del DNA. La hipermutación se lleva a cabo en las regiones variables de los genes de las Ig en los linfocitos que han tenido contacto primario con su antígeno, los linfocitos se dirigen a las zonas oscuras de los centros germinales en donde se lleva a cabo este proceso.

Inicialmente se propuso que la función de AID es editando el RNA[87] cambiando la cascada de señalización original de generación de proteínas del DNA original.

Sin embargo, actualmente hay evidencia de que actúa directamente desaminando el DNA[23;88].

Las mutaciones inducidas por AID en la SHM son predominantemente puntuales transicionales o transversionales. Las mutaciones transicionales ocurren aproximadamente 2 veces más que las de transversión y una alta proporción de las mutaciones se da en el sitio DGYW (donde D denota adenosina; G guanosina o variara por timidina T; Y denota citidina o T, y W denota A o T) o su complemento en reversa WRCH (donde R denota A o G, y H denota T, C o A), que como se había mencionado se encuentran en la región variable mostrando que la SHM es influenciada por la secuencia primaria del DNA. Las mutaciones están confinadas a una región de 1-2 kb en genes de la Ig. La frecuencia de mutaciones no es constante a lo largo de la región mutada y disminuye exponencialmente con una distancia creciente desde el lugar de inicio de la transcripción. El proceso inicia cuando AID que predominantemente se encuentra en el citoplasma entra al núcleo por una señal de localización, es fosforilada por la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) y posteriormente ya fosforilada entra en contacto con la proteína de replicación A (RPA) la cual se ha relacionado que dirige a AID hacia la región variable. AID inicia la desaminación de nucleótidos de citosina dando lugar a uracilos y la DNA polimerasa incluirá un nucleótido de adenina creando la mutación[23;26;27;88;89].

g. Influencia de la inmunidad innata en la generación de memoria (TLR en LB y en LT)

Desde su descripción se consideró que los TLRs eran receptores que se expresaban únicamente en células del sistema inmune innato, pero recientemente se ha observado que se encuentran tanto en éstas como en células del sistema inmune adaptativo. En linfocitos B y T humanos se han reportado que expresan TLR 1-6 8 y 9 (LT) y 1-2, 4,6,8-10 (LB) [90]

Se ha observado que éstos receptores tienen funciones en las células del sistema inmune innato y recientemente se ha estudiado cual es la función que éstas pueden tener en células como linfocitos B y T [11;90-93].

Se ha observado que en linfocitos T TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9 actúan como receptores coestimuladores para ayudar a la proliferación o producción de citocinas de los linfocitos T estimulados por el TCR, adicionalmente se ha observado que TLR2, TLR5 y TLR8 modulan la actividad de supresión que ocurre entre CD25+ CD4+ y células T reguladoras[92].

En cuanto a los linfocitos B, se han realizado estudios en los cuales se ha observado que los TLRs funcionan como adyuvantes en la generación de anticuerpos aunque estos conceptos se encuentran en debate actualmente, hay otros estudios en donde se observa que contribuyen en el cambio de isotipo [94-96] e incluso algunos mencionan que fungen como tercera señal además del antígeno y las señales de los Linfocitos T CD4 en los linfocitos B para generar anticuerpos[97]. A continuación se describirán con orden cronológico brevemente

estos estudios con el fin de describir el papel que actualmente se cree que tienen los TLR en los linfocitos B.

Desde el 2003 se ha descrito que mediante el estímulo de TLR9 se puede generar un cambio de isotipo, en este estudio se habla acerca de que la unión de CpGs a TLR9 en linfocitos B activa la síntesis de T-bet que es un factor de transcripción en linfocitos T y en este estudio se observa que induce el cambio de isotipo hacia IgG2a y probablemente inhibe la producción de IgG1 e IgE [96]. El mecanismo no está bien descrito, pero se observa que mediante este ligando de TLR9 se genera este cambio de isotipo. Además linfocitos B de memoria proliferan mediante la unión de CpG a TLR9 sin el estímulo antigénico[94].

Adicionalmente a la cooperación de T, la generación de anticuerpos T-dependientes requiere de la activación de TLRs en células B[98].

En 2006 se hicieron estudios donde se afirma que el estímulo a través de los TLRs es necesario como una tercera señal para la activación de linfocitos B humanos[97]. En este estudio se observó que la estimulación del BCR inicialmente ayuda a que se lleve a cabo la división celular pero no es suficiente para promover la supervivencia y diferenciación de éstos lo que conduce a que deje de llevarse a cabo la proliferación de linfocitos B; se requiere además de la cooperación de linfocitos T_H y de la señal a través de TLR.

En otro estudio se observó que ratones deficientes en MyD88^{-/-} y TRIF^{-/-}, que son componentes esenciales en la vía de señalización por TLR, la respuesta de anticuerpos no se ve afectada con el uso de adyuvantes como el adyuvante

completo e incompleto de Freund [98]. Estos hallazgos contradicen lo anteriormente publicado por el grupo de trabajo de Metzhitov en Yale, USA y actualmente existe la discusión acerca de las propiedades adyuvantes de los TLR[99].

En otros estudios se observa señalización a través de TLR9 es determinante para que se lleve a cabo un cambio de isotipo a IgG2a, observación que ya se había tenido desde el 2003.[94-96]

En estudios realizados en nuestro laboratorio utilizando ratones TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, MyD88^{-/-} y TRIF^{-/-} que fueron inmunizados con porinas de *S. typhi*, se comparó la respuesta de anticuerpos específicos con ratones no deficientes del mismo fondo genético y se observó una disminución en la capacidad de generar anticuerpos específicos hacia porinas en los ratones deficientes. Ratones TLR2^{-/-} mostraron una disminución de la producción de anticuerpos anti-porinas de tipo IgG con una alteración particularmente pronunciada en el isotipos IgG3. Sin embargo se observa que la alteración de la expresión de TLR4 influye en la respuesta de anticuerpos de tipo IgM. [100]

Éstos estudios, indican que el reconocimiento de los antígenos por los TLR contribuye en la calidad y cantidad de la respuesta específica de anticuerpos y tienen importantes implicaciones en el estudio de las propiedades que debe tener una molécula para su uso en vacunas en contra de patógenos; en especial de virus y bacterias mediante las propiedades adyuvantes mediadas por PRRs como los TLR.

h. Modelos de estudio

Porinas

Las porinas son poros o canales proteicos no específicos[101] que forman parte de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Estas proteínas pueden ser atravesadas por pequeñas moléculas hidrofílicas con límite de exclusión de 600 Da.

Las porinas se ensamblan como trímeros de subunidades idénticas de forma cilíndrica semejante a un barril, cada subunidad consiste de 16 hojas β plegadas antiparalelas unidas por asas con algunas α hélices intercaladas. Cada monómero expone 8 asas cortas hacia el espacio periplásmico y ocho asas largas situadas hacia el exterior de la membrana externa. La forma cilíndrica que caracteriza a las porinas se forma al cerrarse las estructuras β plegadas de forma pseudocilíndrica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1.

Se ha observado que la inmunización de ratones con las porinas de *S. typhi*, induce la respuesta de anticuerpos con capacidad bactericida y de larga duración [102], es decir son antígenos capaces de ser reconocidos por el sistema inmune adaptativo.

Mediante un ensayo en el cual se midió la unión de porinas a diferentes TLRs se ha observado que las porinas son capaces de señalizar por dos TLRs diferentes, TLR2 y TLR4 y son capaces de activar a células de la respuesta inmune innata (como macrófagos y células dendríticas)[103]. De esta forma, las porinas de *S.*

typhi son reconocidas por el sistema inmune innato y por el sistema inmune adaptativo, sin embargo no sabemos si estas características puedan contribuir en la generación de anticuerpos de memoria; sin embargo, se han hecho hallazgos experimentales en donde se observa como es que se lleva a cabo la diversificación del repertorio de anticuerpos. En los ratones T11 μ MT [25] los cuales tienen limitado su repertorio al reconocimiento de VSV-IND la inmunización con porinas de *S. typhi* inducen la ampliación del repertorio de anticuerpos a través del uso de nuevas cadenas L[25]. Sin embargo, en ese estudio no se demostró si la diversificación del repertorio es debido a las propiedades antígeno-PAMP de las porinas[25].

PapMV

En estudios recientes los virus vegetales han sido herramientas efectivas para la expresión de antígenos de patógenos de interés en vacunación. Estos virus no son patógenos para los mamíferos y además este sistema tienen la característica de presentar al antígeno de interés en un contexto altamente organizado y repetitivo, arreglo molecular que se reconoce como favorable para la inducción de la respuesta de anticuerpos, lo que sugiere a su vez la inducción de los mecanismos de la memoria inmunológica que posteriormente se reflejan en una respuesta inmune de larga duración[104].

El virus del mosaico de la papaya [PapMV], es un miembro de la familia de los Potexvirus, es una partícula con simetría helicoidal, tiene una forma de vara con

una longitud de 500nm y un diámetro de 13nm. Las partículas virales están formadas por una cadena de (+) ssRNA de 6656 nucleótidos y por 1400 copias de una única proteína[105;106]. La capacidad inmunogénica del PapMV ha sido evaluada en ratones, observando una eficiente activación de la respuesta inmune innata y una respuesta de anticuerpos específicos de larga duración, caracterizada por la producción y mantenimiento de altos títulos de anticuerpos con isotipo de IgG, la secreción de citocinas pro-inflamatorias, sobreexpresión de moléculas co-estimuladoras de células dendríticas y macrófagos[106]. Se ha mezclado el PapMV con la proteína de membrana externa C [OmpC] de *S.typhi* y se observa que incrementa la capacidad de protección contra la infección con *S. typhi*, revelando las propiedades intrínsecas adyuvantes del PapMV en la inducción de la inmunidad[107]. También se ha observado que al utilizar al virus del mosaico de la papaya (PapMV) como plataforma para expresar el epitopo M2e del virus de la influenza y generar la partícula semejante a virus PapMV-CP-M2e es capaz de inducir la producción de anticuerpo anti- M2e, que pueden reconocer células infectadas con el virus. Estos resultados presentan, por primera vez, el potencial de proteínas recombinantes de virus vegetales para la expresión de antígenos de patógenos, como modelo para el desarrollo de vacunas eficientes [108]. Se ha descrito como innovadora y prometedora en el desarrollo de vacunas eficientes la plataforma utilizando el virus del mosaico de la papaya (PapMV), para la expresión de (HCV) E2 del virus de la hepatitis C como blanco de la respuesta inmune; por ello en este estudio es una partícula que resulta de interés, ya que nos sirve para entender mediante que mecanismos es que se genera la diversificación del

repertorio de anticuerpos que puedan contribuir en la generación de respuesta de anticuerpos de memoria que se necesitan para la elaboración de vacunas.

Ovoalbúmina

Es una glicoproteína obtenida de huevo de pollo con un peso molecular de 45 kDa por cadena, cada macromolécula consta de cuatro cadenas idénticas. OVA es usada como un antígeno habitual en muchos estudios a pesar de ser pobremente inmunogénica. La comparación de los niveles de anticuerpos anti-OVA inducidos y las subclases de IgG se usan como un indicador del tipo de respuesta Th1 o Th2[109]. Previamente se ha reportado que ratones BALB/c sensibilizados con OVA inducen una respuesta Th1 en los pulmones, pese a la considerable producción de IL-4 e IL5 en esplenocitos de BALB/c. Sin embargo, los esplenocitos de ratones BALB/c siempre producen respuesta tipo Th2 sin tomar en cuenta la dosis usada para la sensibilización[110]. No se ha reportado que la OVA sea reconocida como PAMP por el sistema inmune.

Modelo experimental MD4

Un modelo experimental útil debido a que posee el repertorio limitado al reconocimiento de un solo antígeno es el de ratones MD4 ya que en estos ratones más del 90% la frecuencia de linfocitos B cuentan con inmunoglobulinas de alta afinidad específicas para lisozima. Los ratones MD4 se generaron mediante la microinyección de el hibridoma HyHEL10 que genera anticuerpos monoclonales que reconocen un epitopo específico de la lisozima que fueron seleccionados

como recurso de genes de inmunoglobulina con alta especificidad a la lisozima cuya interacción ha sido caracterizada [111]. Clonas que codifican para la cadena pesada y ligera del HyHEL10 fueron usadas como fuente del gen transgénico de las inmunoglobulinas construido. La región constante $\gamma 1$ de HyHEL10 fue reemplazada por un segmento que contiene las regiones del locus μ - δ para asegurar que la progresión de la expresión de IgM únicamente lleva a la expresión de la expresión solo conduce a IgM e IgD que es observada en la maduración. Los genes μ y δ fueron derivados de BALB/c que tienen alotipo IgH^a. Estas clonas pueden distinguir a los anticuerpos que no son transgénicos de los endógenos con cadenas pesadas que tienen alotipo IgH^b [112] en los genes de cadena pesada de ratones B10.BR [113] y por lo tanto a los anticuerpos que no son de origen transgénico que pueden estar presentes en los ratones MD4 que son singénicos.

Esta cepa de ratones nacen en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental (UNAM) para obtenerlos se hace la cruce de ratones con el transgen y ratones que no poseen el transgen B10.BR. Las crías resultantes se tipifican para saber cuales de ellas poseen el transgen con reconocimiento a HEL y cuales no; de esta manera se catalogan como MD4 o B10.BR respectivamente para su uso en los experimentos llevados a cabo en la tesis.

2. Planteamiento del problema

Algunos antígenos son eficientes de inducir memoria de anticuerpos de manera eficiente mientras que otros como OVA no, por lo que es importante determinar las características del antígeno necesarias para la generación de memoria inmunológica. Uno de los mecanismos moleculares involucrados en el establecimiento de memoria humoral es la diversificación del repertorio de anticuerpos, por lo tanto se puede utilizar como una forma para determinar si un antígeno dado es eficiente inductor de los mecanismos de memoria de anticuerpos.

3. Hipótesis

Los antígenos que son reconocidos por el sistema inmune innato tienen propiedades adyuvantes intrínsecas que les permiten la generación eficiente de diversificación del repertorio y con ello memoria inmunológica; mientras que los antígenos incapaces de inducir señales adyuvantes a través de los PRR del sistema inmune innato son pobres inductores de memoria.

4. **Objetivo general**

Determinar las características del antígeno que le permiten inducir de manera eficiente la diversificación del repertorio de anticuerpos

Objetivos particulares

- Determinar si los antígenos modelo sin capacidad adyuvante intrínseca descrita (como OVA) son capaces de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos en ratones MD4.
- Determinar si la coinmunización de antígenos modelo como OVA con ligandos de TLR (como adyuvantes), es capaz de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos anti-OVA en MD4
- Determinar si las porinas de *S. typhi* y PapMV que son antígenos que pueden ser reconocidos por PRR son capaces de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos en ratones MD4.

5. Materiales y métodos

Antígenos

- Ovoalbúmina de huevo de gallina (OVA) grado VI de SIGMA (número de catalogo A-2512, Lote: 91K7057).
- Porinas purificadas por el método de Nikaido a partir de *S. typhi* ATCC 9993. Producidas en la UIMIQ, lote:1252 y PV61106
- OmpC purificada por el método de Nikaido a partir de *S. typhi* STYC302. Producida en la UIMIQ, lote: 1246.
- Virus del mosaico de la papaya (PapMV). Producido en la Unidad de Investigación en Infectología del CHUL/CHUQ, de la Universidad de Laval. Québec Canadá.

Anticuerpos

- Anti IgM: Lote: 60103125 No.61-6820 Marca: Zymed
- B220-PerCP Lote: 17497 Cat. 553093 Marca: Pharmigen

Adyuvantes

- Peptidoglicana *S. aureus* Cat. tlrpgnsa Lot.2902 PGNSA Marca: Invivogen
- Poly I:C 10.95mg/mL
- LPS *E. coli* 0111:B4 Marca Sigma

- Flagelina *S. typhimurium* Cat. tlr1stfla Lot. 28-13 STFLA
- Loxoribine 3.4mg/mL
- DNA de *E.coli* Cat. tlr1ednaef Lot 2701-01.

Animales de laboratorio

- Especie: ratón. Cepa: B10.BR Edad de los ratones: 6-12 semanas
- Especie: ratón Cepa: MD4 Edad de los ratones: 6-12 semanas

Los ratones fueron reproducidos y mantenidos en microaisladores en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales fueron tratados siguiendo los lineamientos institucionales y las regulaciones nacionales sobre las buenas prácticas del manejo de animales.

Marcaje de lisozima con isotiocianato de fluoresceína

Se disolvieron 3mg de lisozima para que quede a una concentración de 1mg/mL en FITC labeling Buffer en un tubo eppendorff protegido de la luz. En un tubo eppendorff se hizo una solución FITC/DMSO y se colocaron 60 μ L por cada mg de lisozima que se quiera marcar. Se dejó reposar 2h a temperatura ambiente en agitación y protegido de la luz . Se dializó a 4°C en agitación y se cambia mínimo 4 veces el buffer de diálisis en un lapso de 48 horas. Se observó cual es la concentración de la lisozima mediante la absorbancia a 280 y 492nm y se calculó la concentración con la siguiente fórmula.

$$\text{Proteína (mg)/mL} = \frac{[A280 - (A492 * 0.35)]}{1.4}$$

La concentración se ajustó para su posterior uso a 1mg/mL, la concentración final del marcado en el tubo de muestra es de 10µg/mL.

Tipificación de los ratones MD4

La tipificación de los ratones MD4 se dividió en dos fases:

- 1) Tipificación citométrica de los ratones como B10.BR o MD4
- 2) Tipificación de ratones MD4 por ELISA

Tipificación de ratones MD4 por el método citométrico

Se sangró al animal y se obtuvo 200µL de sangre en 1mL de buffer de citratos, la sangre se centrifugó a 3000g durante 5 min. Se resuspendió el botón y se lavó 2 veces con PBS. Se resuspendió y colocó 1mL de buffer de lisis a cada vial, se mezcló por inversión e incubó por 3 minutos. Se centrifugaron a 3000g por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante. Se resuspendió y lavó 2 veces con PBS, las células se tiñeron con lisozima marcada con FITC tal que la concentración final fue de 10µg/mL y una dilución 1:300 de anticuerpo anti-B220-PerCP incubándolos por 30 minutos en tubos eppendorff a 4°C. A cada tubo eppendorff después de la incubación se le retiró el sobrenadante y se le adicionan 350µL de PBS. Se tuvieron controles para las tinciones; para observar la autofluorescencia, se le colocarán 100 µL de PBS, uno con lisozima-FITC y otro con B220-PerCP con las células de los ratones a tipificar con el fin de tener controles positivos y negativos. Se leyeron en el citómetro en el cual se seleccionó el área de los linfocitos en la región correspondiente de tamaño y granularidad, después se seleccionaron a las

células B220-PerCP positivas y finalmente las células lisozima-FITC positivas; cuando se observó que más del 90% de los linfocitos B con FITC-HEL positivo, la muestra se tomó como ratón MD4 por tipificación citométrica.

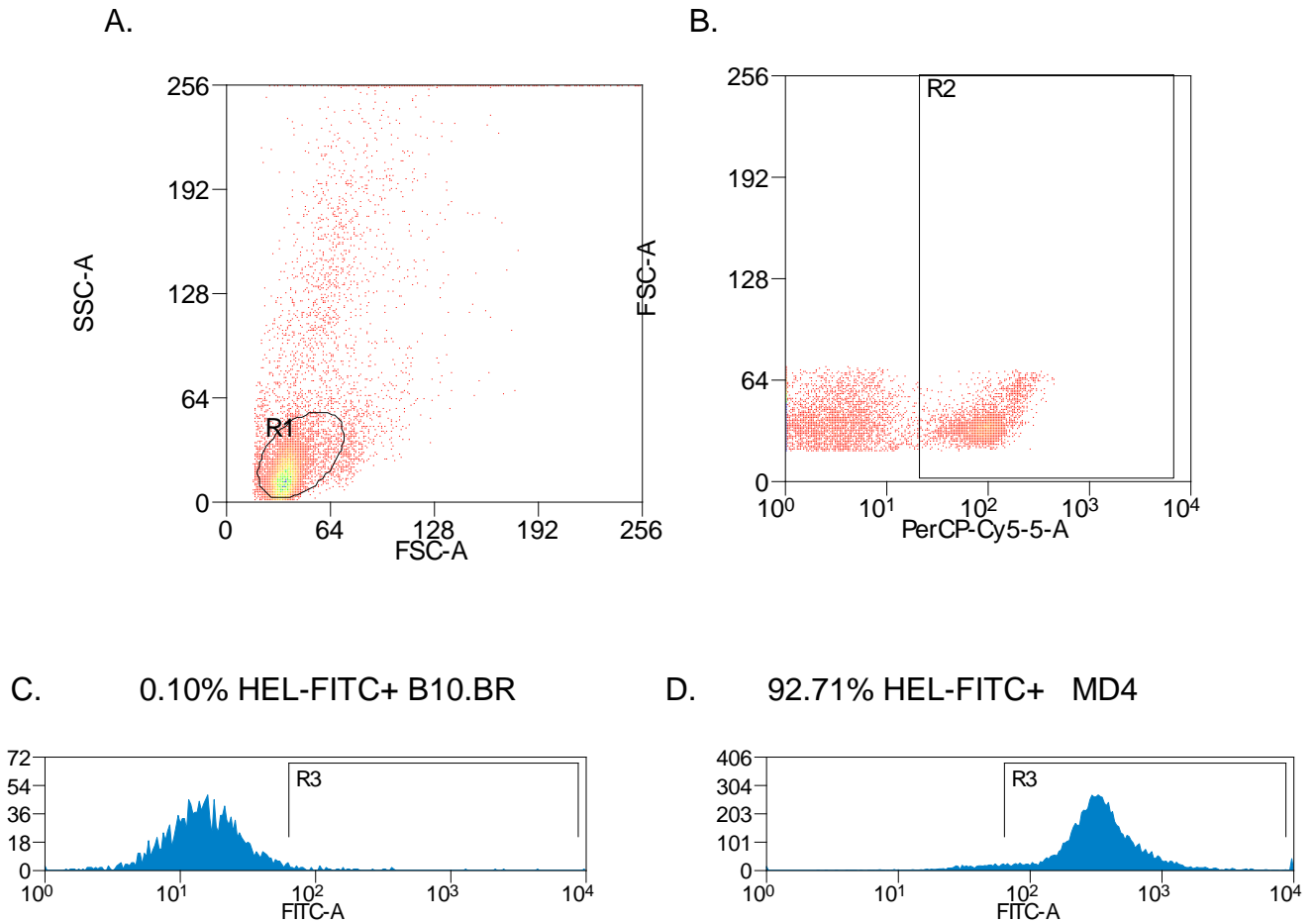


Figura 2 Ejemplo de tipificación de ratones MD4 por citometría. Se tomó el área característica por tamaño y granularidad de los linfocitos (A). De ésta área se seleccionaron a los linfocito B mediante el marcador B220-PerCP (B). Se observó el porcentaje de linfocitos HEL-FITC

Tipificación de ratones MD4 por ELISA.

Se determinó el título de anticuerpos por ELISA como ya es detallado en la metodología y si éste fue mayor a 7 se consideraron como ratón MD4 por tipificación por ELISA.

Los ratones MD4 usados para los experimentos llevados a cabo en esta tesis, son los ratones que resulten como MD4 en la tipificación por citometría y por ELISA y como B10.BR los ratones que resulten negativos para las dos pruebas.

Inmunizaciones

Grupos de ratones MD4 y B10.BR fueron inmunizados intraperitonealmente (ip) con 10µg de OVA, porinas (OmpC, OmpF o ambas) y PapMV en ausencia o presencia de adyuvante. Se utilizaron 10 µg de adyuvante en los casos que se requirió. Los ratones control recibieron solución salina isotónica. Muestras de sangre se colectaron de la vena facial a los días 4, 8 12, 21 y 30 como se indica en las gráficas. Las muestras individuales de suero se congelaron a -20°C hasta su análisis.

Titulación de anticuerpos por el método de ELISA.

Las placas para ELISA de 96 pozos se fijaron adicionando 5µg de lisozima o 1µg de porinas o 0.1µg de PapMV o 10 µg de OVA por pozo en un volumen de 100µL de buffer de carbonatos, se incubaron 1 hora a 37° C, después, se incubaron toda la noche a 4 °C. Después del tiempo de incubación se lavaron 2 veces con 300µL de solución de lavado.

Posteriormente se bloquearon las placas adicionando a cada pozo 100 μ L de solución de bloqueo y se incubaron durante 1 hora a 37° C. Se lavaron las placas 4 veces con 300 μ L de solución de lavado

Luego en una placa de dilución se adicionaron 5 μ L de suero que se obtuvo a partir de ratones en 195 μ L de solución de bloqueo; a partir de esta solución se hicieron diluciones seriadas 1:2 hasta completar el rango de valores de concentración establecido, las respectivas diluciones se colocaron en la placa de ELISA ya fijadas con el antígeno y bloqueadas; entonces se incubaron una hora a 37° C.

Después de la incubación las placas se lavaron 4 veces con 300mL de solución de lavado y posteriormente se agregaron a cada pozo 100mL de solución de bloqueo con segundo anticuerpo se incubó durante 1 hora a 37° C .

Al finalizar el tiempo de incubación las placas se lavaron 4 veces con 300mL de solución de lavado, se adicionaron 100mL de solución de revelado y se incubó durante 10 min. en oscuridad. Para detener la reacción se agregó a cada pozo 10mL de H₂SO₄ 2 N y posteriormente se determinó la densidad óptica en el lector de ELISA (Lector para placas de ELISA Dynex Technologies Modelo MRXII) a una longitud de onda de 490nm.

6. Resultados

La OVA no es capaz de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos en los ratones MD4.

Con el fin de establecer si un antígeno que no se ha identificado como PAMP es capaz de inducir la diversificación del repertorio en los ratones MD4, grupos de 5 ratones de 6 a 12 semanas MD4 y ratones con el mismo fondo genético B10.BR fueron inmunizados con OVA al día 0 del experimento, al día 15 los ratones fueron reinmunizados con 10 μ g de OVA; se sangraron y del suero se analizaron los títulos de anticuerpos de tipo IgM anti-OVA por medio de ELISA en los tiempos indicados en las gráficas (Figura 3). OVA no induce anticuerpos específicos durante la respuesta primaria, ni secundaria en los ratones MD4. La OVA no induce títulos de anticuerpos específicos en los ratones MD4 y en los ratones B10.BR, que no tienen repertorio limitado, se observan títulos primarios cercanos al basal (Figura 3).

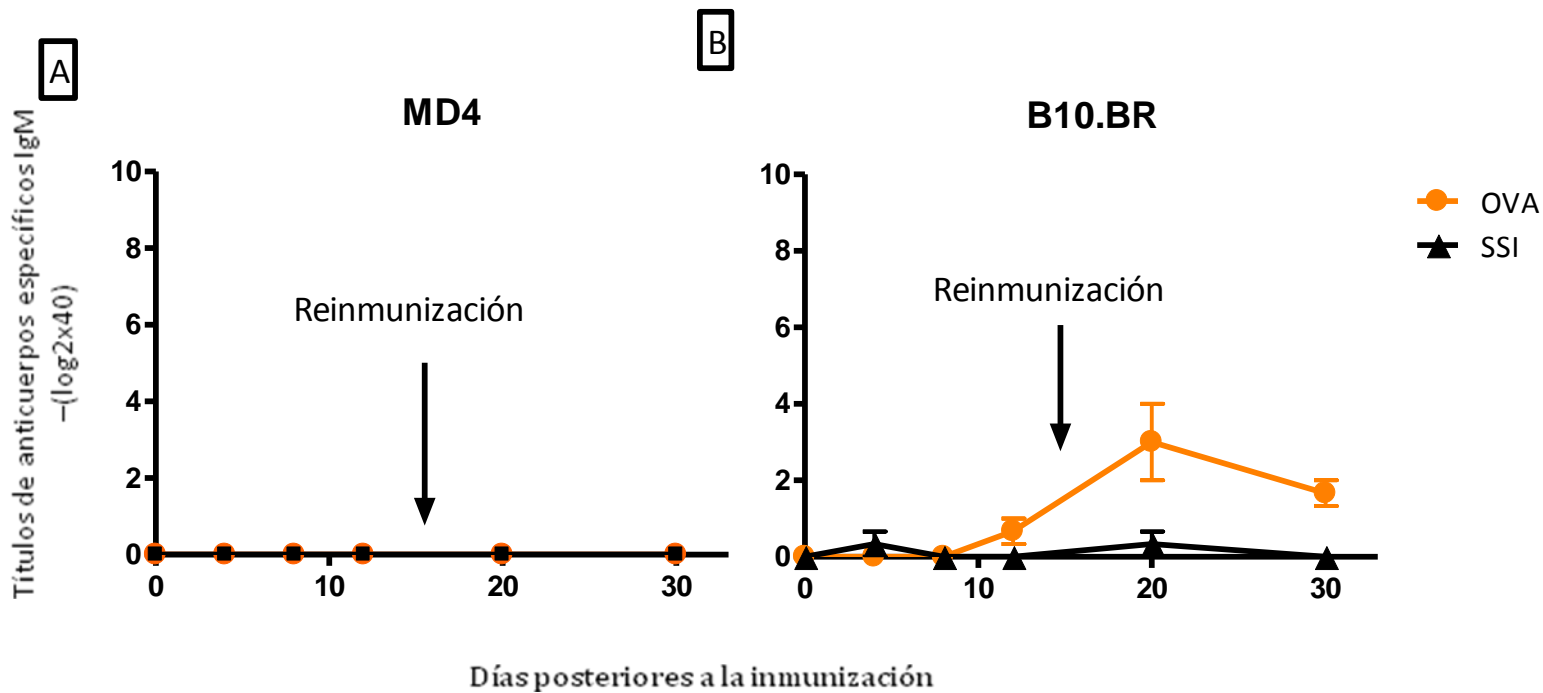
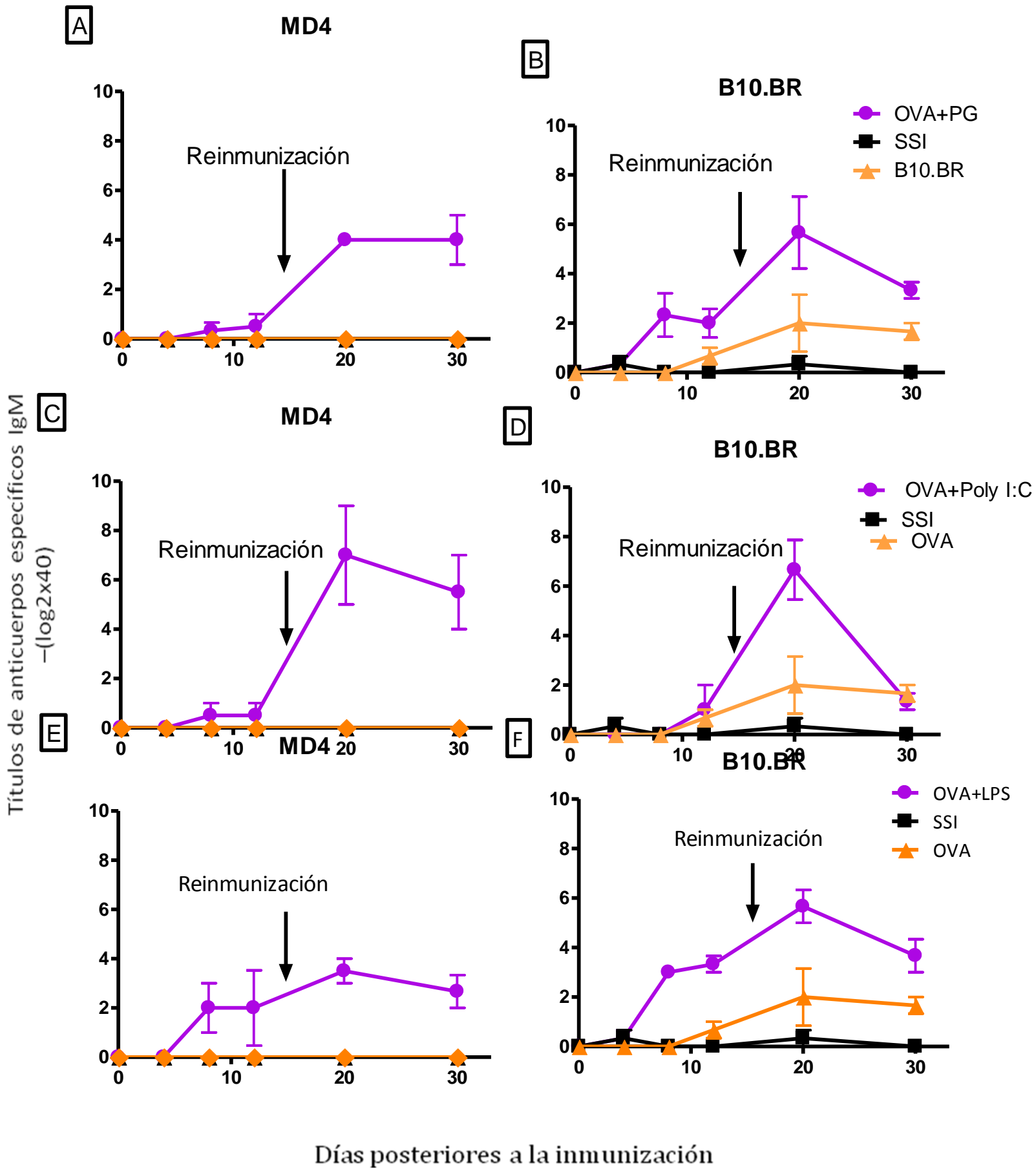


Figura 3. La inmunización con OVA no es capaz de diversificar el repertorio de anticuerpos en ratones MD4. Grupos de 5 ratones MD4 y B10.BR de 6 a 12 semanas fueron inmunizados con OVA o SSI al día 0 del experimento y reinmunizados al día 15. Se analizaron los títulos de anticuerpos IgM anti-OVA en los sueros de los ratones por medio de ELISA en los tiempos indicados en las gráficas. OVA no induce anticuerpos específicos durante la respuesta primaria, sólo se observan títulos basales durante la respuesta secundaria en los ratones B10.BR.

La inmunización con OVA junto con ligandos de TLR puede diversificar el repertorio de anticuerpos y generar títulos de anticuerpos específicos en ratones MD4

Para establecer si un antígeno que no sea reconocido como PAMP es capaz de inducir la diversificación del repertorio en los ratones MD4 en conjunto con el estímulo de una molécula PAMP, estos ratones fueron coinmunizados con OVA y ligandos de TLR (peptidoglicana que es ligando de los dímeros formados por TLR1 y 2 ó TLR 2 y 6; Poly I:C ligando de TLR3; LPS ligando de TLR4; flagelina ligando de TLR5; loxoribine (TLR7) y DNA de *E.coli*, que tiene islas CpG ligando de TLR9). La inducción de anticuerpos específicos para OVA se midió en los sueros de los ratones (Figura 4). La OVA no induce títulos de anticuerpos específicos en los ratones MD4, sin embargo, si se coinmuniza con un PAMP ligando de TLR se observa que se lleva a cabo la diversificación del repertorio de anticuerpos; los títulos de anticuerpos anti-OVA en los ratones MD4 que son significativamente diferentes cuando son inmunizados en conjunto con ligandos de TLR a los de los controles con solución salina y a otro grupo inmunizado con la misma cantidad de OVA (Figura 4). En especial se observa que se generan títulos altos cuando se inmuniza con OVA y el ligando de TLR2, 3, 4 y 5 (Figura 4. A, C, E,G), aunque la coinmunización con loxoribine y DNA de *E. coli*; ligandos de TLR7 y TLR9 respectivamente, produce una generación muy baja de anticuerpos específicos y que no es estadísticamente diferente a la de los controles de inmunización con OVA y SSI (Figura 4 I, K).



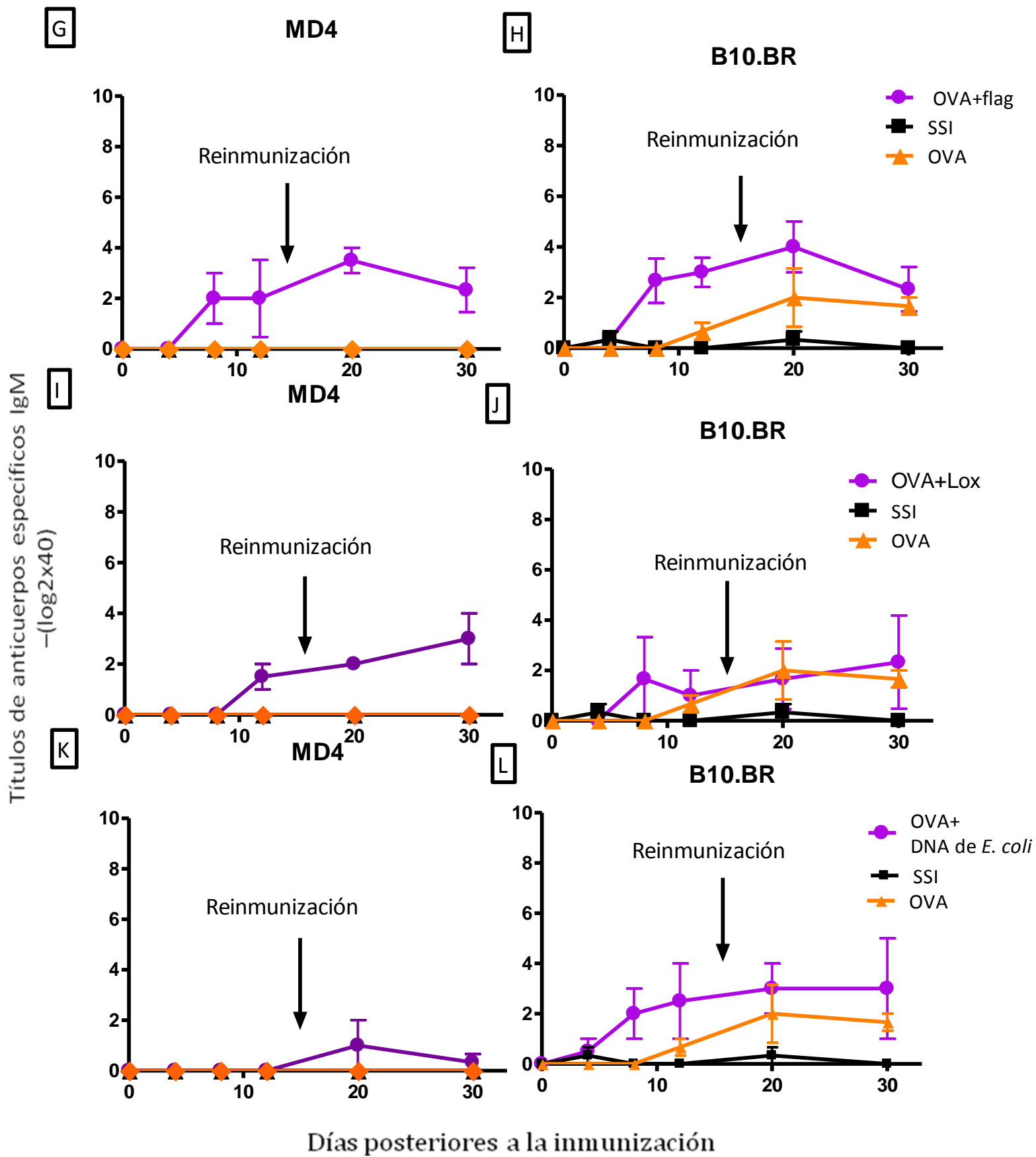


Figura 4. La inmunización con OVA no es capaz de diversificar el repertorio de anticuerpos, pero si esta es coimmunizada con ligandos de TLR2, 3, 4, 5 y 7 se produce de manera eficiente la diversificación del repertorio de anticuerpos en los ratones MD4. Grupos de 5 ratones MD4 de 6 a 12 semanas fueron inmunizados con OVA, OVA+ ligandos de TLR (PG, peptidoglicana ligando del dímero formado por TLR1 y 2 ó TLR2 y 6); Poly I:C, ligando de TLR3; LPS ligando de TLR4; Flag, flagelina ligando de TLR5; Lox, loxoribine ligando de TLR7; DNA de *E. coli*, ligando de TLR9) al día 0 y fueron reinmunizados a día 15. Se analizaron los títulos de anticuerpos anti-OVA en los sueros de los ratones por medio de la técnica de ELISA en los tiempos indicados en las gráficas. OVA no induce anticuerpos específicos durante la respuesta primaria, sólo se observan títulos basales durante la respuesta secundaria en los ratones B10.BR, la coimmunización de OVA +ligando de TLR2, 3, 4, 5 y 7 provocó que se generaran de anticuerpos específicos anti OVA en ratones que tienen un repertorio limitado que no generaron anticuerpos específicos cuando únicamente OVA fue inmunizada.

OmpC, OmpF y PapMV diversifican el repertorio de anticuerpos del ratón

MD4

El repertorio de anticuerpos en los ratones MD4 es oligoclonal la mayoría de los anticuerpos son específicos al reconocimiento de epitopos conocidos de HEL debido al transgen[112;114], lo cual nos permite la evaluación de la diversificación del repertorio ante el reto antigénico.

La inmunización con las porina OmpC y OmpF que son las porinas mayoritarias de *S. typhi*, así como el virus del mosaico de la papaya PapMV a los cuales se les ha observado propiedades adyuvantes intrínsecas, indujo la producción de anticuerpos IgM específicos en los ratones MD4 . Los ratones singénicos de la cepa B10.BR son del mismo fondo genético que los ratones MD4 y sirvieron de control para estudiar la respuesta de anticuerpos inducidos por las porinas Ompc , OmpF y PapMV en un fondo no transgénico. Tanto los ratones B10.BR inmunizados con OmpC, como los inmunizados con ambas porinas produjeron anticuerpos específicos cuyos títulos fueron más altos que los inducidos en los ratones MD4, sin embargo, la cinética de producción de los anticuerpos mostró un patrón similar en ambos casos (Figura 5 A-D). Tanto en ratones MD4 como en los B10.BR se observan títulos d anticuerpos IgM a partir del día 4 postinmunización, la respuesta se incrementa mostrando un pico en el día 12 que se conservó hasta el último día de observación (día 30).

Sin embargo, la inmunización con OmpF como PapMV no genera una cinética similar entre el MD4 y B10.BR de generación de anticuerpos específicos.

Al inmunizar OmpF en el ratón MD4; podemos observar que se generan anticuerpos específicos pero en títulos menores que los que se observan en el ratón B10.BR y que cae el título de anticuerpos específicos para el reconocimiento de la OmpF a día 30 posterior a la inmunización, lo cual no se observa en el ratón no transgénico (Figura 5 C,D).

En cuanto a la cinética de generación de anticuerpos ante la inmunización con PapMV, podemos observar que a día 20 se observa en el ratón MD4 mayores títulos de anticuerpos específicos que se conservan hasta día 30; sin embargo en el grupo de ratones B10.BR se observa que los anticuerpos de tipo IgM que se generan se abaten a día 20. (Figura 5 E,F)

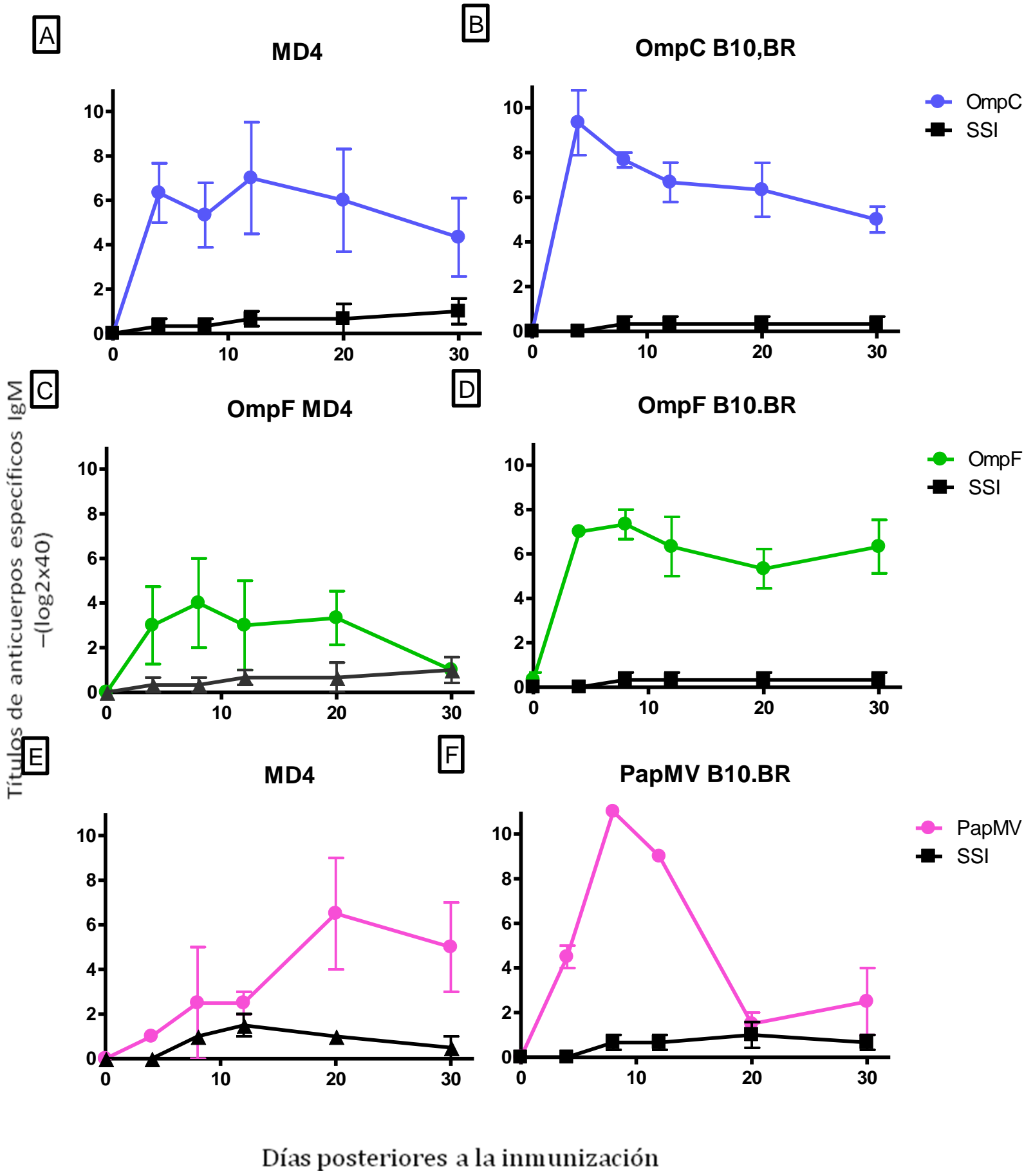


Figura 5. La porinas OmpC, OmpF de *S. typhi* y PapMV inducen la diversificación del repertorio de anticuerpos específicos en ratones MD4.

Grupos de 3 ratones MD4 o B10.Br fueron inmunizados con OmpC, PapMV o con SSI como control al día 0. Se tomaron muestras de sangre en los ratones los días indicados en la gráfica y los títulos de anticuerpos fueron determinados por medio de ELISA en los sueros. Títulos de anticuerpos IgM anti-OmpC, OmpF, y PapMV en ratones MD4 son estadísticamente diferentes que los del control negativo inmunizados con SSI. Títulos de anticuerpos anti-OmpC, OmpF, y PapMV en ratones B10.BR fueron determinados, éstos tienen el mismo fondo genético que los ratones MD4 pero su repertorio no está limitado.

La coinmunización de OVA con PapMV pero no de OVA con OmpC diversifican el repertorio de anticuerpos

Con el fin de saber si las propiedades PAMP de los antígenos OmpC y PapMV podrían contribuir en la diversificación del repertorio de anticuerpos de otro antígeno al ser coinmunizadas con éste, se inmunizaron grupos de 5 ratones MD4 y B10.BR con 10µg de OVA y 10µg de OVA+10µg de OmpC ó 10µg de OVA+10µg de PapMV al día 0 y fueron reinmunizados a día 15 con las mismas concentraciones. Se analizaron los títulos de anticuerpos anti-OVA en los sueros de los ratones por medio de la técnica de ELISA en los tiempos indicados en las gráficas. OVA no induce anticuerpos específicos durante la respuesta primaria, sólo se observan títulos basales durante la respuesta secundaria en los ratones B10.BR, la coinmunización de OVA + PapMV provocó que se generaran de anticuerpos específicos anti-OVA en ratones que tienen un repertorio limitado que no habían generado anticuerpos específicos cuando únicamente OVA fue inmunizada. No se observa el mismo efecto cuando los ratones son coinmunizados con OVA+OmpC (Figura 6).

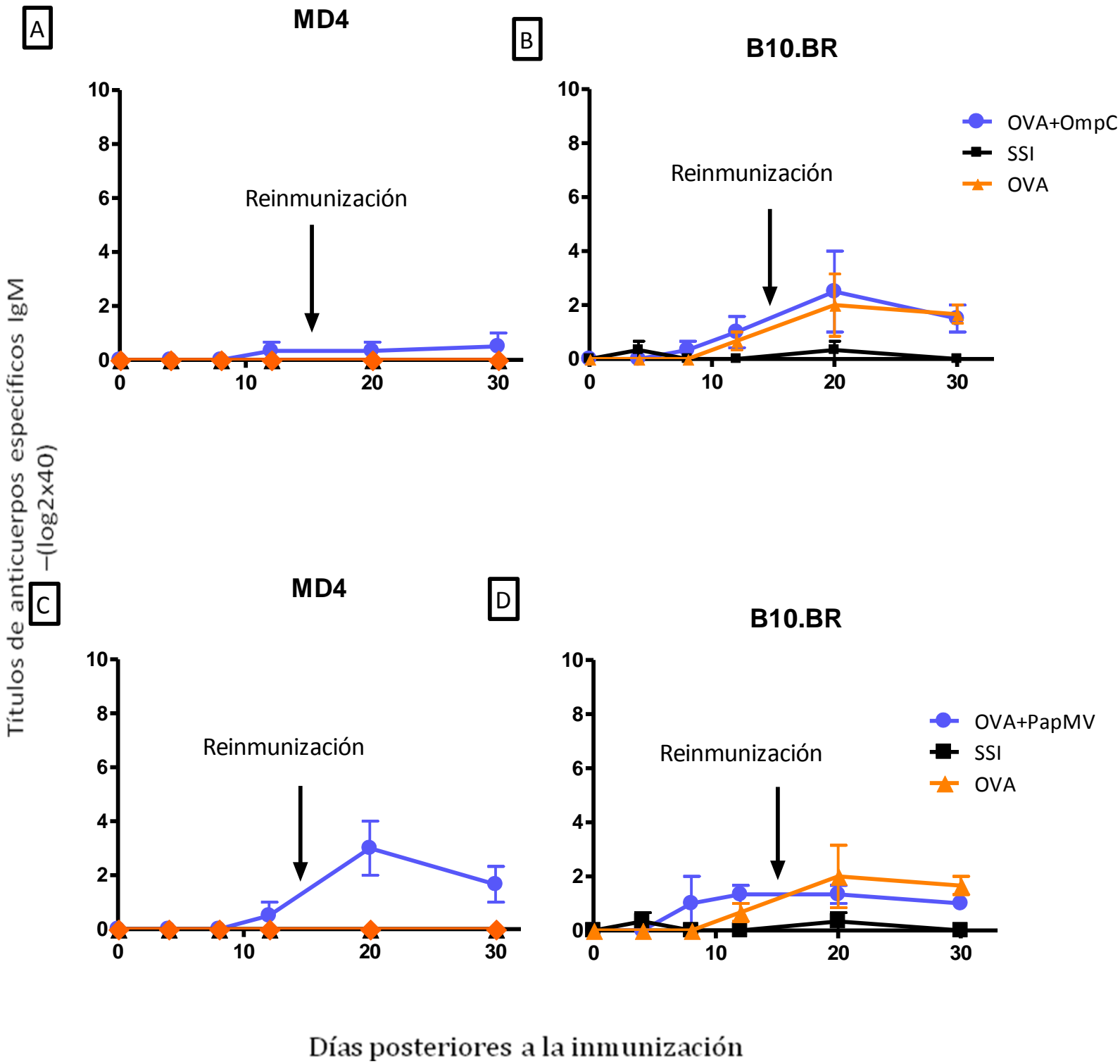


Figura 6. La coinmunización de OVA con PapMV pero no de OVA con OmpC provoca la generación de anticuerpos específicos para el reconocimiento de OVA. Ratones MD4 y B10.BR fueron coinmunizados con 10µg de OVA y 10µg de OmpC ó PapMV al día 0 y fueron reinmunizados a día 15. Se analizaron los títulos de anticuerpos anti-OVA en los sueros de los ratones por medio de la técnica de ELISA en los tiempos indicados en las gráficas. OVA no induce anticuerpos específicos durante la respuesta primaria, sólo se observan títulos basales durante la respuesta secundaria en los ratones B10.BR, la coinmunización de OVA + PapMV indujo la generación de anticuerpos específicos anti-OVA en ratones que tienen un repertorio limitado que no habían generado anticuerpos específicos cuando únicamente OVA fue inmunizada. No se observa el mismo efecto cuando los ratones son coinmunizados con OVA+OmpC.

7. Discusión

El universo molecular que nos rodea es reconocido por el sistema inmune a través de 2 grandes sistemas de receptores, los PRR del sistema inmune innato cuyos ligandos reciben el nombre de PAMP[5], por otro lado los receptores del sistema inmune adaptativo son el BCR a cuyos ligandos se les denominan antígenos y finalmente el TCR que reconoce péptidos o algunos carbohidratos presentados en el contexto de las moléculas del MHC[115]. Algunos lípidos son presentados en el contexto de moléculas no clásicas a linfocitos NKT [116]. En su conjunto estos son los sistemas generales de reconocimiento molecular descrito hasta ahora para el sistema inmune, los ligandos de todos estos receptores son principalmente biomoléculas de naturaleza proteínica, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Estos ligandos son reconocidos por uno o varios receptores del sistema inmune permitiendo así la activación celular y el inicio de la respuesta inmunológica. El estudio de la respuesta inmune contra patógenos y el desarrollo de vacunas han permitido identificar muchas de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la activación de la respuesta inmune y la generación de inmunidad (protección) contra la infección, así se han podido definir las características de las moléculas que son responsables de la inducción de una respuesta inmune [117]. La distancia filogenético (exogenicidad), naturaleza química, complejidad molecular, rigidez molecular, organización y repetitividad de la molécula han sido identificados como parámetros importantes de una molécula para la inducción de la respuesta inmune (inmunogenicidad)[118]. Las moléculas que no cuentan con

estas características son poco inmunogénicas para que estas moléculas induzcan una respuesta inmune potente se les han mezclado con moléculas inmunopotenciadoras a las que se les denominó adyuvantes. Los adyuvantes se han usado principalmente para el desarrollo de vacunas y el objetivo ha sido la inducción de una respuesta inmune adaptativa tanto humoral como celular que sea potente y de larga duración, es decir que genere memoria inmunológica [16]. Con el descubrimiento de los TLRs se dilucidaron varios de los mecanismos moleculares que son el fundamento del efecto adyuvante, poniendo también de manifiesto la compleja e interdependiente relación entre la respuesta inmune innata y la adaptativa[119]. La contribución de los TLRs en la inducción de la respuesta inmune de anticuerpos se ha descrito como un mecanismo indirecto a través de la activación y maduración de células dendríticas favoreciendo la presentación del antígeno y coestimulación al los linfocitos T y por tanto induciendo un ambiente de citocinas propicias para la correcta activación del linfocito B[117]. Sin embargo, el descubrimiento de TLRs en el linfocito B abrió el debate sobre la contribución de estos receptores en la biología de estas células y sobre la participación de dos importantes sistemas de reconocimiento molecular uno innato y otro adaptativo en una misma célula en la generación de memoria [16;94-96]. Los estudios sobre el reconocimiento molecular mediado por los TLRs han permitido identificar moléculas que son capaces de señalar tanto por estos receptores como a través del BCR, así estas moléculas son reconocidas como PAMPs por el sistema inmune innato y como antígenos por el linfocito B, para estas moléculas proponemos el nombre de "Pamptigens". Los pamptigens son en general moléculas provenientes de microorganismos. Por otro lado, se han podido

identificar moléculas que no señalizan a través de TLRs o de otros de los principales receptores de PAMPs, estas moléculas son generalmente derivadas de vertebrados como es el caso de la OVA, de la HEL, de moléculas sintéticas como los haptenos NP y DNP. Los pamptigens son en general más inmunogénicos que los (solo) antígenos, lo que nos hace suponer que estas moléculas cuentan con propiedades adyuvantes intrínsecas. Las porinas de *S. typhi* y el PapMV son proteínas que se han caracterizado previamente como antígenos y como PAMP[102;103], de esta forma constituyen un modelo valioso para estudiar la contribución de las señales de reconocimiento de la respuesta inmune innata en la generación de la diversidad de la respuesta de anticuerpos y en el establecimiento de la memoria inmunológica que va acoplada a este fenómeno a través del almacenamiento del genotipo de estos nuevos anticuerpos antígeno-específico para su posterior utilización en una respuesta inmune secundaria. El modelo experimental utilizado fue el ratón transgénico MD4 cuyo transgen codifica para un anticuerpo con especificidad para HEL. Más del 90% de estos presentan el fenotipo específico contra HEL [112;114]. El conocer el receptor original permite evaluar la diversificación del repertorio sólo a través de la identificación por ELISA de anticuerpos con otra especificidad, estos mecanismos de diversificación son los mecanismos mediante los cuales se generan anticuerpos con una afinidad mayor ante un nuevo contacto con ese antígeno, refiriéndose así a la activación los mecanismos de generación de memoria. Los mecanismos de diversificación del repertorio en estos animales no han sido estudiados pero por analogía con lo observado en los ratones T11 y QM[25;28] podemos esperar que la edición de receptor, hipermutación somática y el cambio de cadenas ligeras kapa o lambda

sean los mecanismos involucrados. La OVA que es un antígeno sin propiedades como PAMP descritas, no indujo títulos de anticuerpos específicos en los ratones MD4 (Figura 3A), mientras que al coinmunizar OVA con adyuvantes como peptidoglicana, Poly I:C, LPS, flagelina, loxoribine que son ligandos conocidos de TLR 1, 2,6, 3, 4, 5, y 7, se observó la presencia de anticuerpos específicos anti-OVA tanto en la respuesta primaria como en la secundaria (Figura 4). En estudios anteriores, observamos que la coinmunización de OVA con porinas (OmpC+OmpF) contribuye en la diversificación del repertorio de anticuerpos, generando anticuerpos de varios isotipos en ratones BALB/c indujo la formación de anticuerpos IgG2a e IgG2b que no induce la OVA cuando es inmunizada sin adyuvante. Este efecto fue similar al inmunizar OVA con adyuvantes bien caracterizados como el PAMP LPS y el adyuvante completo de Freund[120].

Las porinas (OmpC+OmpF, OmpC y OmpF) indujeron anticuerpos específicos en los ratones MD4 con una cinética similar a la observada en los ratones B10.Br con el mismo fondo genético pero sin el transgen (Figura 5 A-F), también podemos observar que PapMV diversifica el repertorio de anticuerpos generando anticuerpos pero la cinética no es similar con la observada en los ratones B10.BR. Finalmente con el objetivo de ver si las propiedades PAMP de las porinas OmpC y el PapMV podrían en coinmunización con OVA provocar que se generen anticuerpos específicos anti-OVA se coinmunizaron ratones y observamos que únicamente los estímulos PAMP dados por PapMV son los que pueden provocar la generación de anticuerpos con el reconocimiento a OVA (Figura 6). Esto podría

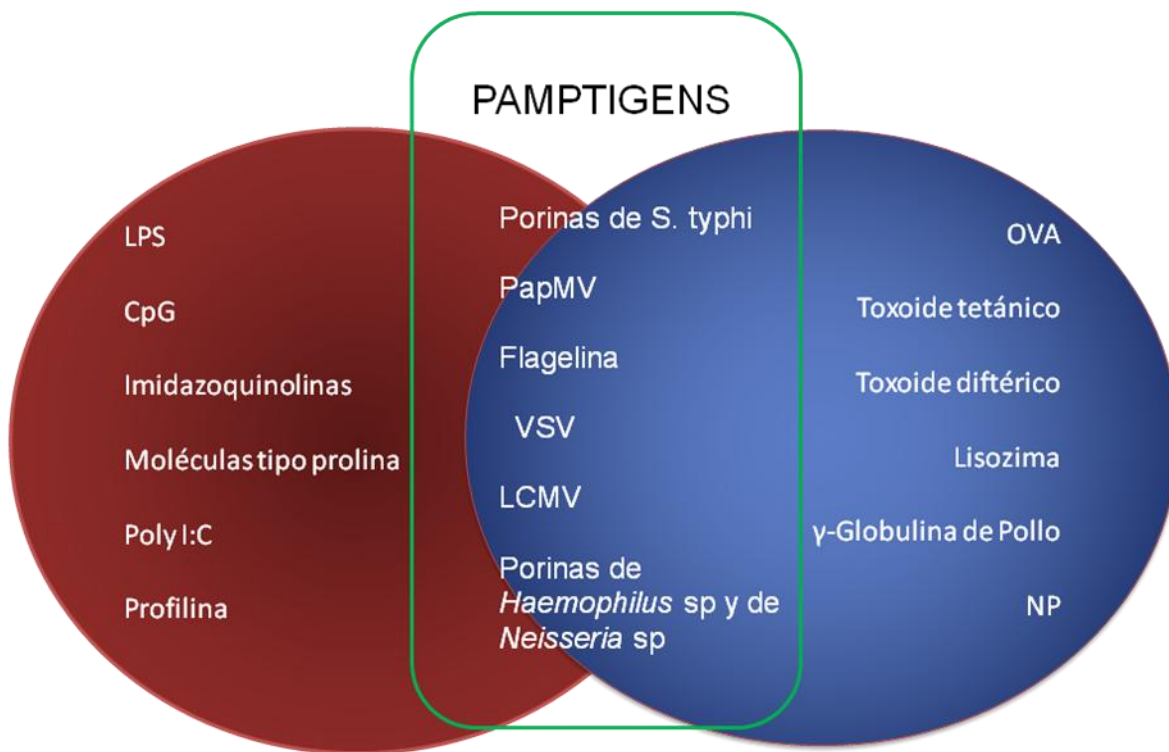
deberse a que los PRR que reconocen como PAMP a OmpC y PapMV son diferentes, ya que la respuesta depende de la naturaleza del adyuvante.

Estos datos sugieren que las señales dadas por el estímulo de éstos PRRs son importantes para la diversificación del repertorio de anticuerpos específicos y con ello de la activación de los mecanismos de memoria. El mecanismo pudiera ser a través de la generación del efecto adyuvante en las células dendríticas mejorando la presentación del antígeno, la coestimulación y el ambiente de citocinas propicios para la activación de la respuesta inmune adaptativa celular y de anticuerpos. Otra posibilidad pudiera ser a través de la activación directa de los TLRs en los linfocitos B de los ratones inmunizados.

En su conjunto estos resultados muestran que las porinas y PapMV son pantígenos que contribuyen en la diversificación del repertorio de anticuerpos probablemente a través de la señal mediada por PRR y por ello son eficientes inductores de memoria.

8. Conclusión

Las moléculas que sólo son capaces de activar al sistema inmune adaptativo (antígenos) no son eficientes para generar memoria, no obstante, los antígenos que son reconocidos también por el sistema inmune innato son eficientes inductores de diversificación del repertorio de anticuerpos y de la generación de memoria inmunológica, a estos antígenos con capacidad adyuvante intrínseca los hemos denominado “Pamptigens”.



9. Bibliografía

1. **Akira,S., Uematsu,S., and Takeuchi,O.**, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006. **124**: 783-801.

Ref ID: 2

2. **Beutler,B.**, Innate immunity: an overview. *Mol.Immunol.* 2004. **40**: 845-859.

Ref ID: 1

3. **Kabelitz,D. and Medzhitov,R.**, Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines.

Curr.Opin.Immunol. 2007. **19**: 1-3.

Ref ID: 135

4. **Rubartelli,A. and Lotze,M.T.**, Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends*

Immunol. 2007. **28**: 429-436.

Ref ID: 181

5. **Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R.,** Innate immune recognition.
Annu.Rev.Immunol. 2002. **20**: 197-216.
Ref ID: 124

6. **Teixeira,M.M., Almeida,I.C., and Gazzinelli,R.T.,** Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes.Infect.* 2002. **4**: 883-886.
Ref ID: 136

7. **Kool,M., Soullie,T., van Nimwegen,M., Willart,M.A., Muskens,F., Jung,S., Hoogsteden,H.C., Hammad,H., and Lambrecht,B.N.,** Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J.Exp.Med.* 2008. **205**: 869-882.
Ref ID: 184

8. **Scheibner,K.A., Lutz,M.A., Boodoo,S., Fenton,M.J., Powell,J.D., and Horton,M.R.,** Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J.Immunol.* 2006. **177**: 1272-1281.
Ref ID: 183

9. **Galdiero,M., Pisciotta,M.G., Galdiero,E., and Carratelli,C.R.,** Porins and lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* regulate the expression of CD80 and CD86 molecules on B cells and macrophages but not CD28 and

CD152 on T cells. *Clin.Microbiol.Infect.* 2003. **9**: 1104-1111.

Ref ID: 101

10. **Takeuchi,O. and Akira,S.**, Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes.Infect.* 2002. **4**: 887-895.

Ref ID: 137

11. **Takeda,K., Kaisho,T., and Akira,S.**, Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 2003. **21**: 335-376.

Ref ID: 7

12. **Kawai,T. and Akira,S.**, TLR signaling. *Semin.Immunol.* 2007.

Ref ID: 22

13. **O'Hagan,D.T. and Valiante,N.M.**, Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2003. **2**: 727-735.

Ref ID: 413

14. **Alam,R. and Gorska,M.**, 3. Lymphocytes. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2003. **111**: S476-S485.

Ref ID: 134

15. **Clark,E.A. and Ledbetter,J.A.**, How B and T cells talk to each other.
Nature 1994. **367**: 425-428.
Ref ID: 25

16. **Lanzavecchia,A., Bernasconi,N., Traggiai,E., Ruprecht,C.R., Corti,D., and Sallusto,F.**, Understanding and making use of human memory B cells.
Immunol.Rev. 2006. **211**: 303-309.
Ref ID: 10

17. **Ollila,J. and Vihinen,M.**, B cells. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2005. **37**: 518-523.
Ref ID: 13

18. **Potocnik,A.J., Nielsen,P.J., and Eichmann,K.**, In vitro generation of lymphoid precursors from embryonic stem cells. *EMBO J.* 1994. **13**: 5274-5283.
Ref ID: 37

19. **Reth,M.**, Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 1992. **10**: 97-121.
Ref ID: 38

20. **Bertrand,F.E., Vogtenhuber,C., Shah,N., and LeBien,T.W.**, Pro-B-cell to pre-B-cell development in B-lineage acute lymphoblastic leukemia

expressing the MLL/AF4 fusion protein. *Blood* 2001. **98**: 3398-3405.

Ref ID: 31

21. **Ghia,P., ten Boekel,E., Rolink,A.G., and Melchers,F.,** B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol.Today* 1998. **19**: 480-485.

Ref ID: 33

22. **Mombaerts,P., Iacomini,J., Johnson,R.S., Herrup,K., Tonegawa,S., and Papaioannou,V.E.,** RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992. **68**: 869-877.

Ref ID: 93

23. **Odegard,V.H. and Schatz,D.G.,** Targeting of somatic hypermutation. *Nat.Rev.Immunol.* 2006. **6**: 573-583.

Ref ID: 103

24. **Reth,M., Gehrman,P., Petrac,E., and Wiese,P.,** A novel VH to VHDJH joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature* 1986. **322**: 840-842.

Ref ID: 115

25. **Senn,B.M., Lopez-Macias,C., Kalinke,U., Lamarre,A., Isibasi,A., Zinkernagel,R.M., and Hengartner,H.,** Combinatorial immunoglobulin light chain variability creates sufficient B cell diversity to mount protective

antibody responses against pathogen infections. *Eur.J.Immunol.* 2003. **33**: 950-961.

Ref ID: 100

26. **Frieder,D., Larijani,M., Tang,E., Parsa,J.Y., Basit,W., and Martin,A.,** Antibody diversification: mutational mechanisms and oncogenesis. *Immunol.Res.* 2006. **35**: 75-88.

Ref ID: 6

27. **Nemazee,D.,** Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat.Rev.Immunol.* 2006. **6**: 728-740.

Ref ID: 21

28. **Lopez-Macias,C., Kalinke,U., Cascalho,M., Wabl,M., Hengartner,H., Zinkernagel,R.M., and Lamarre,A.,** Secondary rearrangements and hypermutation generate sufficient B cell diversity to mount protective antiviral immunoglobulin responses. *J.Exp.Med.* 1999. **189**: 1791-1798.

Ref ID: 99

29. **Cozine,C.L., Wolniak,K.L., and Waldschmidt,T.J.,** The primary germinal center response in mice. *Curr.Opin.Immunol.* 2005. **17**: 298-302.

Ref ID: 227

30. **Fu,Y.X. and Chaplin,D.D.**, Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu.Rev.Immunol.* 1999. **17**: 399-433.
Ref ID: 228
31. **Kosco-Vilbois,M.H., Bonnefoy,J.Y., and Chvatchko,Y.**, The physiology of murine germinal center reactions. *Immunol.Rev.* 1997. **156**: 127-136.
Ref ID: 229
32. **MacLennan,I.C.**, Germinal centers. *Annu.Rev.Immunol.* 1994. **12**: 117-139.
Ref ID: 230
33. **Burton,G.F., Conrad,D.H., Szakal,A.K., and Tew,J.G.**, Follicular dendritic cells and B cell costimulation. *J.Immunol.* 1993. **150**: 31-38.
Ref ID: 231
34. **Tew,J.G., Wu,J., Qin,D., Helm,S., Burton,G.F., and Szakal,A.K.**, Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol.Rev.* 1997. **156**: 39-52.
Ref ID: 232
35. **Li,L. and Choi,Y.S.**, Follicular dendritic cell-signaling molecules required for proliferation and differentiation of GC-B cells. *Semin.Immunol.* 2002. **14**: 259-266.
Ref ID: 233

36. **Yoshida,K., van den Berg,T.K., and Dijkstra,C.D.**, Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma II-mediated immune-complex trapping. *Immunology* 1993. **80**: 34-39.
Ref ID: 234
37. **Kapasi,Z.F., Qin,D., Kerr,W.G., Kosco-Vilbois,M.H., Shultz,L.D., Tew,J.G., and Szakal,A.K.**, Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. *J.Immunol.* 1998. **160**: 1078-1084.
Ref ID: 235
38. **Liu,Y.J., Xu,J., de Bouteiller,O., Parham,C.L., Grouard,G., Djossou,O., Saint-Vis,B., Lebecque,S., Banchereau,J., and Moore,K.W.**, Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform. *J.Exp.Med.* 1997. **185** : 165-170.
Ref ID: 236
39. **Imal,Y. and Yamakawa,M.**, Morphology, function and pathology of follicular dendritic cells. *Pathol.Int.* 1996. **46**: 807-833.
Ref ID: 241
40. **Koopman,G., Keehnen,R.M., Lindhout,E., Newman,W., Shimizu,Y., van Seventer,G.A., de Groot,C., and Pals,S.T.**, Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106)

pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J.Immunol.* 1994. **152**: 3760-3767.

Ref ID: 243

41. **Liu,Y.J., Joshua,D.E., Williams,G.T., Smith,C.A., Gordon,J., and MacLennan,I.C.**, Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989. **342**: 929-931.

Ref ID: 237

42. **Szabo,M.C., Butcher,E.C., and McEvoy,L.M.**, Specialization of mucosal follicular dendritic cells revealed by mucosal addressin-cell adhesion molecule-1 display. *J.Immunol.* 1997. **158**: 5584-5588.

Ref ID: 242

43. **Camacho,S.A., Kosco-Vilbois,M.H., and Berek,C.**, The dynamic structure of the germinal center. *Immunol.Today* 1998. **19**: 511-514.

Ref ID: 239

44. **Jacob,J., Przylepa,J., Miller,C., and Kelsoe,G.**, In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J.Exp.Med.* 1993. **178**: 1293-1307.

Ref ID: 245

45. **Nossal,G.J.**, The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response. *Cell* 1992. **68**: 1-2.
Ref ID: 246
46. **Meyer-Hermann,M., Deutsch,A., and Or-Guil,M.**, Recycling probability and dynamical properties of germinal center reactions. *J.Theor.Biol.* 2001. **210**: 265-285.
Ref ID: 247
47. **Campbell,D.J., Kim,C.H., and Butcher,E.C.**, Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol.Rev.* 2003. **195**: 58-71.
Ref ID: 249
48. **Cyster,J.G., Ansel,K.M., Ngo,V.N., Hargreaves,D.C., and Lu,T.T.**, Traffic patterns of B cells and plasma cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2002. **512**: 35-41.
Ref ID: 250
49. **Allen,C.D., Ansel,K.M., Low,C., Lesley,R., Tamamura,H., Fujii,N., and Cyster,J.G.**, Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat.Immunol.* 2004. **5**: 943-952.
Ref ID: 251
50. **Ansel,K.M., McHeyzer-Williams,L.J., Ngo,V.N., McHeyzer-Williams,M.G., and Cyster,J.G.**, In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine

receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines.

J.Exp.Med. 1999. **190**: 1123-1134.

Ref ID: 252

51. **Kim,C.H., Rott,L.S., Clark-Lewis,I., Campbell,D.J., Wu,L., and Butcher,E.C.**, Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells.

J.Exp.Med. 2001. **193**: 1373-1381.

Ref ID: 253

52. **Moser,B. and Loetscher,P.**, Lymphocyte traffic control by chemokines.

Nat.Immunol. 2001. **2**: 123-128.

Ref ID: 106

53. **Grewal,I.S. and Flavell,R.A.**, CD40 and CD154 in cell-mediated immunity.

Annu.Rev.Immunol. 1998. **16**: 111-135.

Ref ID: 255

54. **Lenschow,D.J., Walunas,T.L., and Bluestone,J.A.**, CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev.Immunol.* 1996. **14**: 233-258.

Ref ID: 254

55. **Carreno,B.M. and Collins,M.**, The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses.

Annu.Rev.Immunol. 2002. **20**: 29-53.

Ref ID: 257

56. **Sharpe,A.H. and Freeman,G.J.**, The B7-CD28 superfamily.

Nat.Rev.Immunol. 2002. **2**: 116-126.

Ref ID: 256

57. **Choe,J., Li,L., Zhang,X., Gregory,C.D., and Choi,Y.S.**, Distinct role of follicular dendritic cells and T cells in the proliferation, differentiation, and apoptosis of a centroblast cell line, L3055. *J.Immunol.* 2000. **164**: 56-63.

Ref ID: 258

58. **Choi,Y.S.**, Differentiation and apoptosis of human germinal center B-lymphocytes. *Immunol.Res.* 1997. **16**: 161-174.

Ref ID: 406

59. **Choe,J. and Choi,Y.S.**, IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur.J.Immunol.* 1998. **28**: 508-515.

Ref ID: 422

60. **Liu,Y.J. and Arpin,C.**, Germinal center development. *Immunol.Rev.* 1997. **156**: 111-126.

Ref ID: 408

61. **Hur,D.Y., Kim,D.J., Kim,S., Kim,Y.I., Cho,D., Lee,D.S., Hwang,Y., Bae,K., Chang,K.Y., and Lee,W.J.**, Role of follicular dendritic cells in the apoptosis of germinal center B cells. *Immunol.Lett.* 2000. **72**: 107-111.

Ref ID: 409

62. **Klein,U. and Dalla-Favera,R.**, Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat.Rev.Immunol.* 2008. **8**: 22-33.

Ref ID: 414

63. **Schittek,B. and Rajewsky,K.**, Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 1990. **346**: 749-751.

Ref ID: 410

64. **Sprent,J. and Tough,D.F.**, Lymphocyte life-span and memory. *Science* 1994. **265**: 1395-1400.

Ref ID: 411

65. **Ho,F., Lortan,J.E., MacLennan,I.C., and Khan,M.**, Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur.J.Immunol.* 1986. **16** : 1297-1301.

Ref ID: 428

66. **Manz,R.A., Thiel,A., and Radbruch,A.,** Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997. **388**: 133-134.

Ref ID: 431

67. **Okudaira,H. and Ishizaka,K.,** Reaginic antibody formation in the mouse. XI. Participation of long-lived antibody-forming cells in persistent antibody formation. *Cell Immunol.* 1981. **58**: 188-201.

Ref ID: 412

68. **Slifka,M.K., Antia,R., Whitmire,J.K., and Ahmed,R.,** Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity.* 1998. **8**: 363-372.

Ref ID: 432

69. **Bachmann,M.F., Odermatt,B., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M.,** Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J.Exp.Med.* 1996. **183**: 2259-2269.

Ref ID: 423

70. **Gray,D.,** Immunological memory: a function of antigen persistence. *Trends Microbiol.* 1993. **1**: 39-41.

Ref ID: 429

71. **Mandel,T.E., Phipps,R.P., Abbot,A., and Tew,J.G.,** The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol.Rev.* 1980. **53**:

29-59.

Ref ID: 434

72. **Szakai,A.K., Kosco,M.H., and Tew,J.G.**, Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure function relationships.

Annu.Rev.Immunol. 1989. **7**: 91-109.

Ref ID: 433

73. **Tew,J.G., Phipps,R.P., and Mandel,T.E.**, The maintenance and regulation of the humoral immune response: persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as accessory cells. *Immunol.Rev.* 1980. **53**:

175-201.

Ref ID: 435

74. **Slifka,M.K. and Ahmed,R.**, Long-term humoral immunity against viruses: revisiting the issue of plasma cell longevity. *Trends Microbiol.* 1996. **4**: 394-400.

Ref ID: 436

75. **Zinkernagel,R.M., Bachmann,M.F., Kundig,T.M., Oehen,S., Pirchet,H., and Hengartner,H.**, On immunological memory. *Annu.Rev.Immunol.* 1996. **14**: 333-367.

Ref ID: 35

76. **Bernasconi,N.L., Traggiai,E., and Lanzavecchia,A.**, Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 2002. **298**: 2199-2202.
Ref ID: 424
77. **Bachmann,M.F., Kundig,T.M., Kalberer,C.P., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M.**, How many specific B cells are needed to protect against a virus? *J.Immunol.* 1994. **152**: 4235-4241.
Ref ID: 425
78. **Benner,R., Hijmans,W., and Haaijman,J.J.**, The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin.Exp.Immunol.* 1981. **46**: 1-8.
Ref ID: 426
79. **Dilosa,R.M., Maeda,K., Masuda,A., Szakal,A.K., and Tew,J.G.**, Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. *J.Immunol.* 1991. **146**: 4071-4077.
Ref ID: 440
80. **Gottlieb,S., McLaughlin,F.X., Levine,L., Latham,W.C., and Edsall, L.G.**, Long-term immunity to tetanus. A statistical evaluation and its clinical implications. *Am.J.Public Health Nations.Health* 1964. **54**: 961-971.
Ref ID: 430

81. **Hyland,L., Sangster,M., Sealy,R., and Coleclough,C.,** Respiratory virus infection of mice provokes a permanent humoral immune response. *J.Virol.* 1994. **68**: 6083-6086.
Ref ID: 439
82. **Kjeldsen,K., Simonsen,O., and Heron,I.,** Immunity against diphtheria 25-30 years after primary vaccination in childhood. *Lancet* 1985. **1**: 900-902.
Ref ID: 437
83. **Slifka,M.K., Matloubian,M., and Ahmed,R.,** Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J.Virol.* 1995. **69**: 1895-1902.
Ref ID: 438
84. **Ochsenbein,A.F., Pinschewer,D.D., Sierro,S., Horvath,E., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M.,** Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000. **97**: 13263-13268.
Ref ID: 441
85. **MacLennan,I.C., Liu,Y.J., and Johnson,G.D.,** Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol.Rev.*

1992. **126**: 143-161.

Ref ID: 442

86. **Heer,A.K., Shamshiev,A., Donda,A., Uematsu,S., Akira,S., Kopf,M., and Marsland,B.J.**, TLR signaling fine-tunes anti-influenza B cell responses without regulating effector T cell responses. *J.Immunol.* 2007. **178**: 2182-2191.

Ref ID: 18

87. **Muramatsu,M., Kinoshita,K., Fagarasan,S., Yamada,S., Shinkai,Y., and Honjo,T.**, Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000. **102**: 553-563.

Ref ID: 104

88. **Martin,A., Bardwell,P.D., Woo,C.J., Fan,M., Shulman,M.J., and Scharff,M.D.**, Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature* 2002. **415**: 802-806.

Ref ID: 105

89. **Durandy,A., Peron,S., Taubenheim,N., and Fischer,A.**, Activation-induced cytidine deaminase: structure-function relationship as based on the study of mutants. *Hum.Mutat.* 2006. **27**: 1185-1191.

Ref ID: 17

90. **Dasari,P., Nicholson,I.C., Hodge,G., Dandie,G.W., and Zola,H.,**
Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol.* 2005. **236**:
140-145.
Ref ID: 14
91. **Fillatreau,S. and Manz,R.A.,** Tolls for B cells. *Eur.J.Immunol.* 2006. **36**:
798-801.
Ref ID: 11
92. **Kabelitz,D.,** Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes.
Curr.Opin.Immunol. 2007. **19**: 39-45.
Ref ID: 123
93. **Takeda,K. and Akira,S.,** Toll-like receptors in innate immunity. *Int.Immunol.*
2005. **17**: 1-14.
Ref ID: 9
94. **Bernasconi,N.L., Onai,N., and Lanzavecchia,A.,** A role for Toll-like
receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in
naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003.
101: 4500-4504.
Ref ID: 96

95. **Jegerlehner,A., Maurer,P., Bessa,J., Hinton,H.J., Kopf,M., and Bachmann,M.F.**, TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *J.Immunol.* 2007. **178**: 2415-2420.
Ref ID: 19
96. **Liu,N., Ohnishi,N., Ni,L., Akira,S., and Bacon,K.B.**, CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells.
Nat.Immunol. 2003. **4**: 687-693.
Ref ID: 95
97. **Ruprecht,C.R. and Lanzavecchia,A.**, Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur.J.Immunol.* 2006. **36**: 810-816.
Ref ID: 97
98. **Gavin,A.L., Hoebe,K., Duong,B., Ota,T., Martin,C., Beutler,B., and Nemazee,D.**, Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 2006. **314**: 1936-1938.
Ref ID: 15
99. **Pasare,C. and Medzhitov,R.**, Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005. **438**: 364-368.
Ref ID: 12

100. Cervantes-Barragán L., Gil-Cruz C. Pastelin-Palacios Rodolfo Lang K. Isibasi Armando Ludewig B. López-Macías C. TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to *Salmonella* Typhi antigens. 2008.
Ref Type: Unpublished Work
Ref ID: 420
101. **Jap,B.K. and Walian,P.J.**, Structure and functional mechanism of porins. *Physiol Rev.* 1996. **76**: 1073-1088.
Ref ID: 28
102. **Secundino,I., Lopez-Macias,C., Cervantes-Barragan,L., Gil-Cruz,C., Rios-Sarabia,N., Pastelin-Palacios,R., Villasis-Keever,M.A., Becker,I., Puente,J.L., Calva,E., and Isibasi,A.**, Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 2006. **117**: 59-70.
Ref ID: 20
103. Gil-Cruz, C. Evaluación de la respuesta inmune innata inducida por las Porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi. 2006. Instituto Politécnico Nacional.
Ref Type: Thesis/Dissertation
Ref ID: 109

104. Acosta Ramírez Elizabeth. Influencia de la organización y repetitividad en la inducción de anticuerpos protectores. 2007. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Doctorado.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Ref ID: 144

105. **Lecours,K., Tremblay,M.H., Gagne,M.E., Gagne,S.M., and Leclerc,D.,** Purification and biochemical characterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein. *Protein Expr.Purif.* 2006. **47**: 273-280.

Ref ID: 444

106. **Lacasse,P., Denis,J., Lapointe,R., Leclerc,D., and Lamarre,A.,** Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. *J.Virol.* 2008. **82**: 785-794.

Ref ID: 443

107. **Acosta-Ramirez,E., Perez-Flores,R., Majeau,N., Pastelin-Palacios,R., Gil-Cruz,C., Ramirez-Saldana,M., Manjarrez-Orduno,N., Cervantes-Barragan,L., Santos-Argumedo,L., Flores-Romo,L., Becker,I., Isibasi,A., Leclerc,D., and Lopez-Macias,C.,** Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of

papaya mosaic virus. *Immunology* 2007.

Ref ID: 150

108. **Lacasse,P., Denis,J., Lapointe,R., Leclerc,D., and Lamarre,A.,** Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. *J.Virol.* 2008. **82**: 785-794.

Ref ID: 1

109. **Tomasic,J., Hanzl-Dujmovic,I., Spoljar,B., Vranesic,B., Santak,M., and Jovicic,A.,** Comparative study of the effects of peptidoglycan monomer and structurally related adamantyltripeptides on humoral immune response to ovalbumin in the mouse. *Vaccine* 2000. **18**: 1236-1243.

Ref ID: 445

110. **Morokata,T., Ishikawa,J., and Yamada,T.,** Antigen dose defines T helper 1 and T helper 2 responses in the lungs of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses. *Immunol.Lett.* 2000. **72**: 119-126.

Ref ID: 446

111. **Hartman,A.B., Mallett,C.P., Sheriff,S., and Smith-Gill,S.J.,** Unusual joining sites in the H and L chains of an anti-lysozyme antibody. *J.Immunol.* 1988. **141**: 932-936.

Ref ID: 152

112. **Goodnow,C.C., Crosbie,J., Adelstein,S., Lavoie,T.B., Smith-Gill,S.J., Brink,R.A., Pritchard-Briscoe,H., Wotherspoon,J.S., Loblay,R.H., Raphael,K., and .,** Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 1988. **334:** 676-682.
Ref ID: 4
113. **Singhai,R., Weaver,M., Sikora,L., and Levy,J.G.,** Evidence for the presence of idiotype-bearing regulatory T cells in which idiotype expression does not show linkage to either IgH alleles or the MHC. *Immunology* 1984. **51:** 743-754.
Ref ID: 148
114. **Adams,E., Basten,A., and Goodnow,C.C.,** Intrinsic B-cell hyporesponsiveness accounts for self-tolerance in lysozyme/anti-lysozyme double-transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990. **87:** 5687-5691.
Ref ID: 5
115. **Rajewsky,K.,** Immunology. The power of clonal selection. *Nature* 1993. **363:** 208.
Ref ID: 127

116. **Zhang,C., Zhang,J., and Tian,Z.,** The regulatory effect of natural killer cells: do "NK-reg cells" exist? *Cell Mol.Immunol.* 2006. **3**: 241-254.
Ref ID: 128
117. **Pulendran,B. and Ahmed,R.,** Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006. **124**: 849-863.
Ref ID: 3
118. **Zinkernagel,R.M.,** What is missing in immunology to understand immunity? *Nat.Immunol.* 2000. **1**: 181-185.
Ref ID: 129
119. **Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr.,** Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997. **91**: 295-298.
Ref ID: 126
120. Saavedra-Ávila, N. A. Contribución de las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi en la diversificación del repertorio de anticuerpos mediante el estímulo de los receptores tipo Toll. 2007.
Ref Type: Thesis/Dissertation
Ref ID: 421

Anexo. Preparación de soluciones

Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7.4

Pesar exactamente:

Cloruro de sodio 8.7g

Fosfato monobásico de sodio 0.7g

Fosfato dibásico de sodio 2.7g

Disolver en 500mL de agua MilliQ, ajustar pH y llevar a volumen de 1000mL con agua MilliQ.

Solución amortiguadora de Carbonatos (SAC) pH 9.5

Pesar exactamente:

Bicarbonato de sodio 7.0 g

Carbonato de sodio 2.8 g

Disolver en 500 ml de agua MilliQ, ajustar el pH y llevar a volumen de 1000 mL con agua MilliQ.

Solución amortiguadora de citratos (SAC) pH 5.6

Pesar exactamente:

Ácido cítrico 4.1g

Citrato de sodio 29.0g

Disolver en 500 mL de agua MilliQ, ajustar pH y aforar con agua MilliQ a 1000mL

Solución de lavado (agua Tween 0.1%)

A cada litro de agua destilada agregar 1 mL de Tween 20 y disolver.

Solución de Bloqueo (PBS + leche 5%)

Pesar 5 g de leche descremada, agregar PBS suficiente para hacer un volumen de 100 mL.

Nota: Esta solución debe ser utilizada el mismo día en que es preparada.

Solución de revelado.

Por cada 12 mL de SBC agregar 0.006g de OPD (SIGMA) y 10 μ L de H₂O₂ al 30% (SIGMA).

Nota: Esta solución debe utilizarse inmediatamente después de haberse preparado y debe mantenerse protegida de la luz.

Solución de H₂SO₄ 2.5 N

Medir 6.66 mL de ácido sulfúrico (98% pureza, δ 1.84) y transferir a un matraz volumétrico de 100mL con 50 mL de agua destilada, dejar enfriar y llevar al aforo con agua destilada.