

00524
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EVALUACION DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA DEL
VIRUS DE MOSAICO DE LA PAPAYA (PapMV)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICO BIOLOGA

PRESENTA

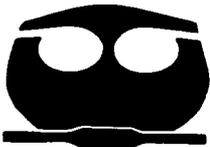
ELIZABETH CRISTINA ACOSTA RAMIREZ



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MEXICO, D. F.

FEBRERO 2003





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

Presidente: Prof. Rodolfo Pastelín Palacios.

Vocal: Prof. Armando Isibasi Araujo.

Secretario: Prof. Constantino III Roberto López Macías.

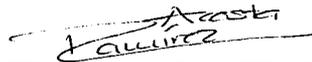
1er. Suplente: Prof. Rosalba Esquivel Cote.

2o. Suplente: Prof. Sonia Mayra Pérez Tapia.

El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.



Dr. Constantino III Roberto López Macías
ASESOR



Elizabeth Cristina Acosta Ramirez
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto fue financiado por el Instituto Mexicano del Seguro Social a través de la Coordinación de Investigación en Salud. Proyectos FP 0038/1235, 2001/037 y 2001/377 y por la Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC). No de la demande: 241661-00.

Al Doctor Isibasi por permitirme formar parte de su grupo, por su confianza y apoyo incondicional.

Al Dr. Denis Leclerc por su apoyo y colaboración en el proyecto.

A Alex Baeza, amigo y cómplice, por enseñarme el camino a la investigación.

A Constantino, por ponerme en bandeja de plata un proyecto de vida, por la confianza depositada en mí.

A Erika Martín y sus niños del 217, amigos que me ponen los pies en la tierra y me conectan a mis raíces, la Química.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunoquímica, especialmente a Ismael, al Dr. Pastelin, Luisa, Rosita, Héctor y Mauricio, por sus consejos y paciencia durante mi aprendizaje.

DEDICATORIA

A mi MAMI , que es mi ejemplo de vida. Que ha dedicado su vida en cuerpo y alma en mi hermano y en mi. GRACIAS, junto con Coco eres lo más valioso que me queda.

A Beto, mi hermano, compañero y alma complementaria. Nunca te vayas.

A Jorjón, mi Padre y amigo. Has dejado huella y hueco profundos en mi vida.

A mi abue Cris, que con amor y buenos consejos ayudó a sacar adelante a cinco latosos nietos, tu herencia más grande, los grandiosos valores que nos inculcaste. Te extraño.

A Enrique, que amablemente se ofreció para sacarnos adelante.

A mis hermanas Tani e Ili, parte importante en mi vida, las quiero mucho. Tani, por el comienzo de una nueva vida. Ili por los sueños que están por cumplirse.

A mi hermanito Alex, no importa la distancia, siempre estaremos juntos.

A mi tío Arturo, tía Bety y mi primita Vri, junto con los anteriores mi única familia. Los quiero.

A Jorge y Diego que ahora forman parte de mi familia, siempre presentes.

A mis amigos, Raúl, Christian. Irving, Adriana, Fer, Rafael, Samuel, Samia, las Dianas. Moisés, Citlalli, Jorge, Pancho, Jhonathan, Vic Ortiz y Menendez, por permitirme ser parte de la historia de sus vidas, apoyo incondicional en todo momento y por la vida que compartimos.

A Dios por darme la fortaleza para derribar los obstáculos, una familia que me apoya y quiere y por su bendición para seguir adelante.

INDICE	PÁGINAS
I. Abreviaturas	8
II. Resumen	10
III. Introducción	12
IV. Antecedentes	
1. La respuesta inmune	
1.1 Antigenicidad e inmunogenicidad	15
1.1.1 Importancia de la vía de administración y dosis del antígeno	20
1.2 Respuesta inmune innata	21
1.3 Respuesta inmune celular	24
1.4 Respuesta inmune humoral	26
1.5 Protección	30
1.6 Respuesta de memoria	
1.6.1 Linfocitos B de memoria	31
1.6.2 Linfocitos T de memoria	32
2. Agentes vacunales	
2.1 Tipos de vacunas	
2.1.1 Vacunas a base de microorganismos vivos	34
2.1.2 Vacunas a base de microorganismos muertos	35
2.1.3 Vacunas a base de subunidades	36
2.1.4 Vacunas de DNA	36

3. Adyuvantes	
3.1 Definición de adyuvante	36
3.2 Tipos de adyuvantes	38
3.3 Mecanismo de acción	41
4. Uso de virus vegetales como agentes vacunales	42
4.1 Virus mosaico del ejote (CPMV)	
Cowpea Mosaic Virus	44
4.2 Virus mosaico del tabaco (TMV)	
Tobacco Mosaic Virus	46
4.3 Bushy Tomato Stunt Virus (BTSV)	47
5. Introducción al virus de mosaico de la papaya (PapMV)	48
V. Planteamiento del problema	50
VI. Hipótesis	51
VII. Objetivos	
1.Objetivo general	51
2.Objetivos particulares	51



VIII.	Diseño experimental	
1	Métodos	
1.1	Material biológico	52
1.2	Reactivos y soluciones	53
1.3	Equipo de laboratorio	56
2	Inmunizaciones	56
3	Detección de anticuerpos por el método de ELISA (ensayo inmunoenzimático en fase sólida)	57
IX.	Resultados	59
X.	Discusión	70
XI	Conclusiones	76
XII	Bibliografía	77

I. ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
CPMV	virus de mosaico del ejote
TMV	virus de mosaico del tomate
PapMV	virus de mosaico de la papaya
TCR	receptor del linfocito T
BCR	receptor del linfocito B
Id	entradérmica
sc	subcutánea
im	intramuscular
iv	intravenosa
ip	intraperitoneal
NK	células asesinas naturales
C'	sistema del complemento
RNA	ácido ribonucleico
LPS	lipopolisacárido
PAMP	patrón moléculas asociado a patógeno
PRR	receptor de reconocimiento de patrón
TLR	receptor parecido a Toll
DC	célula dendrítica
APC	célula presentadora de antígeno

MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
Th	linfocito T cooperador
IFN- γ	interferón gamma
Fc γ R	receptor de la fracción constante de la IgG
IL	interleucina
TGF- β	factor de crecimiento transformante β
Fc	fracción constante de las inmunoglobulinas
TCM	linfocitos T de memoria central
TEM	linfocitos T de memoria efectora
FCA	adyuvante completo de Freund
FIA	adyuvante incompleto de Freund
ISCOM	complejo inmunoestimulador
OVA	ovalbúmina
HRP	peroxidasa de rábano
HCl	ácido clorhídrico
NaOH	hidróxido de sodio
PBS	solución reguladora de fosfatos
CBS	solución reguladora de citratos
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
CaBS	solución reguladora de carbonatos
SSI	solución salina isotónica
ELISA	ensayo inmunoenzimático en fase sólida

II. RESUMEN

El presente trabajo es un estudio sobre la respuesta inmune humoral y capacidad adyuvante generadas por un virus vegetal, en este caso, el virus de mosaico de la papaya (PapMV), empleando para ello un modelo murino.

Se ha evidenciado que la organización del antígeno así como la repetitividad que este tenga ya sea en el patógeno que lo expresa o bien en el sistema presentador que lo contenga influyen de manera significativa tanto en el tipo como en la magnitud de la respuesta inmune generada. Así, los virus vegetales representan un modelo adecuado para estudiar los fenómenos implicados en la generación de la respuesta inmune, debido a que por su estructura poseen antígenos repetitivos en un arreglo paracristalino, lo cual los hace altamente organizados y por lo tanto excelentes inmunógenos.

Aprovechando estas características, se proponen como promisorios candidatos a agentes acarreadores de péptidos heterólogos mediante la modificación de su genoma, incrementando así la inmunogenicidad de dichos péptidos, adquiriendo dos nuevas propiedades: ser un sistema acarreador de antígenos y ser adyuvantes.

.....

Además de las ventajas biotecnológicas, los virus vegetales se pueden purificar mediante procesos relativamente sencillos, con altos rendimientos, lo cual representa una gran ventaja si se desea su producción a gran escala.

Finalmente, este trabajo demuestra que el PapMV posee una excelente capacidad de generar una respuesta humoral. Observamos que desde los primeros días posteriores a la inmunización podemos detectar niveles altos de anticuerpos IgM alcanzando el nivel más alto el día 8; así mismo a partir del día 4 detectamos anticuerpos IgG alcanzando su nivel máximo el día 90. Adicionalmente se detectaron todas las subclases de IgG, encontrándose que los isotipos predominantes fueron: IgG2b>IgG3>IgG2a>IgG1. Cabe resaltar que estos resultados se obtuvieron administrando una sola dosis de antígeno y en ausencia de adyuvante. Comparando las vías ip, iv e sc no se observaron diferencias significativa entre ellas. Hasta el día 320 se ha encontrado que los niveles de anticuerpos se mantienen altos lo que sugiere que se indujo una respuesta inmune humoral de larga duración.

La inmunización de ratones con ovoalbúmina (OVA) (una proteína débilmente inmunogénica) junto con PapMV produce un incremento en la respuesta de anticuerpos contra OVA, además de que la respuesta hacia este antígeno se mantiene, lo que indica que el PapMV funciona como agente adyuvante. Igual que en el caso anterior sólo se realizó una inmunización.

III. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo de las diferentes estrategias de vacunación se ha optado por la purificación de los determinantes antigénicos del patógeno involucrado, con esto se ha visto desfavorecida la generación de un estado protector, lo que ha llevado al empleo de agentes adyuvantes, que si bien ayudan a la estimulación de la respuesta inmune pueden llegar a generar efectos secundarios debido a la toxicidad de las sustancias que los constituyen, además la mayoría de los adyuvantes propuestos hasta hoy se pueden usar de manera exclusiva en animales y sólo las sales de aluminio⁶⁶ son aceptadas para su uso en humanos.

Así, se hace evidente la necesidad de generar agentes adyuvantes que además de cumplir con su función estimulante de la respuesta inmune, disminuyan o mejor aún eliminen aquellas reacciones secundarias⁶⁵ asociadas a su administración.

Ahora bien, si aunado al efecto adyuvante de estos agentes podemos añadir la propiedad de presentar al antígeno en forma repetitiva y altamente organizada se lograría establecer una estrategia de vacunación que diera lugar a una respuesta inmune eficiente y que generara un estado protector y sobre todo que fuera factible su uso en humanos.

Para lograr esto, se propone el uso de virus vegetales⁹², los cuales al cumplir con las características necesarias para ser buenos inmunógenos, se pueden modificar genéticamente para hacerlos expresar sobre su superficie antígenos heterólogos en forma repetitiva y altamente organizada⁷⁵⁻⁸³.

Mediante esta estrategia, además de incrementar la capacidad inmunogénica de los péptidos presentados, se tiene un sistema que no requiere de una infraestructura compleja para la obtención de las partículas virales y es un sistema que permitiría producir grandes cantidades de proteína recombinante y de este modo facilitar su producción a gran escala⁷⁵⁻⁸³.

A estas características se suman que al obtener partículas virales recombinantes a partir de sistemas vegetales se lograría la producción de una vacuna que además de ser de bajo costo y ofrecer protección, no contenga contaminantes causales de efectos secundarios.

Un candidato que cumple con las características descritas anteriormente lo representa el virus de mosaico de la papaya (PapMV). El empleo de este virus como acarreador de antígenos es promisorio, ya que la proteína de la cápside tiene un patrón repetitivo de 180 subunidades⁸⁷, además tiene un alto peso molecular⁸⁸ y no representa un peligro de bioseguridad debido a que no se replica en las células de mamífero.

La purificación de PapMV es muy estable, lo que sugiere que la vacuna podría resistir los cambios en la temperatura ambiental además de que su estabilidad se ve incrementada si se liofiliza.

De manera tal, que el presente trabajo tiene como finalidad determinar la capacidad inmunogénica del PapMV para evaluar si éste puede ser considerado como un adyuvante y una eficiente partícula acarreadora de antígenos.

IV. ANTECEDENTES

1. La respuesta inmune.

1.1 Antigenicidad e inmunogenicidad.

Los linfocitos T y B pueden ser estimulados por numerosas sustancias que, tanto de manera específica como inespecífica. Cuando los linfocitos T o B son estimulados por una sustancia que se une de forma complementaria a sus receptores¹ (TCR o BCR), la respuesta de las células se califica como específica porque está dirigida contra la molécula que los estimuló. En un organismo vertebrado y bajo condiciones de salud, esa respuesta está dirigida a neutralizar o a eliminar del cuerpo las sustancias extrañas que los estimularon, sustancias a las cuales se le denomina antígenos.^{2,3}

Por otro lado, los inmunógenos son las moléculas que inducen una respuesta específica contra sus determinantes antigénicos.^{2,3}

La antigenicidad y la inmunogenicidad dependen de varios factores. Los dos términos definen propiedades diferentes, pero no se excluyen entre sí, sino que se complementan. Todos los inmunógenos son antígenos, pero no todos los antígenos son inmunógenos.

Para que una sustancia sea antigénica debe poseer una serie de características. A continuación se describen brevemente las principales características de los antígenos:

PESO MOLECULAR: de manera general, los antígenos de mayor peso molecular son los que tienen la cantidad más elevada de determinantes y, por lo tanto, tienen mayor probabilidad de interactuar con los receptores de los linfocitos. Así, las moléculas muy pequeñas (con peso molecular inferior a 1 500 Da) tienen una conformación tan simple y un número de determinantes tan pequeño que éstos sólo pueden ser reconocidos, pero no estimulan al sistema inmune. ⁴

NATURALEZA QUÍMICA: es aceptado que las proteínas son las moléculas que expresan mejor su antigenicidad porque pueden tener una estructura terciaria o cuaternaria compleja. Mientras mayor sea la complejidad de las proteínas resultan más antigénicas e inmunogénicas.

Las proteínas que tienen un estado físico particulado son mejores antígenos que las que se encuentran en forma soluble.⁴

Los polisacáridos son menos antigénicos que las proteínas. Los más conocidos por su antigenicidad son las sustancias de los grupos sanguíneos⁵ y los que se encuentran en la pared celular o la membrana de los microorganismos⁶. Aun que pueden ser antígenos con un peso molecular elevado, por lo general,

.....

tienen estructuras relativamente simples. Un polisacárido típico, está compuesto por un pequeño número de monosacáridos diferentes, los cuales forman unidades que se repiten y que están unidas entre sí. También pueden encontrarse unidos a proteínas o a lípidos, formando gluco- o lipoproteínas. Estas moléculas estimulan la activación del linfocito B principalmente, pero debido a que los linfocitos T reconocen a péptidos presentados en el contexto de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad y no polisacáridos, existe poca cooperación de estos linfocitos en la respuesta inmune contra estas moléculas.

Los lípidos son moléculas poco antigénicas. Sin embargo, existe una gran cantidad de lípidos que pueden actuar como haptenos cuando se conjugan a proteínas de mayor peso molecular⁷. Estas moléculas activan principalmente linfocitos B aunque se ha demostrado para algunos lípidos bacterianos la presentación a linfocitos T es a través de moléculas CD1 (ref) lo que explicaría la presencia de IgG contra estas moléculas.

Además, el sistema inmune es capaz de reconocer las diferentes conformaciones que pueden adoptar las moléculas en el espacio verificándose con esto un cambio en las propiedades antigénicas e inmunogénicas de la molécula en cuestión⁸.

CONFORMACIÓN: los D-aminoácidos y también los que no tienen anillos aromáticos le confieren muy poca antigenicidad e inmunogenicidad a las proteínas, mientras que los correspondientes isómeros L y los aminoácidos fenilalanina o triptofano incrementan considerablemente las posibilidades de un reconocimiento antigénico eficiente⁹.

Por lo general, los aminoácidos aromáticos, los monosacáridos con anillos furanósidos o piranósidos, las bases púricas o pirimídicas y los anillos policíclicos, son todas, estructuras que le confieren cierto grado de rigidez a la molécula y aumentan su antigenicidad¹⁰.

CARGA ELÉCTRICA: la carga eléctrica del determinante no es un factor esencial para su antigenicidad, sin embargo, parece ser que la carga eléctrica negativa de la membrana celular atrae inespecíficamente a los antígenos con carga eléctrica neta positiva, lo cual puede facilitar la fagocitosis de la molécula y la posterior presentación de los determinantes¹¹.

Las características antes descritas son de manera general, las que deben cumplir las moléculas para ser consideradas como antigénicas, sin embargo, existen algunas otras características que le confieren a dichas moléculas su calidad de inmunogénicas, esas características son las siguientes:

.....

NATURALEZA EXTRAÑA DEL ANTÍGENO: la inmunogenicidad de una molécula depende, principalmente de sus características químicas, las cuales deben ser diferentes a las de los otros componentes del cuerpo del individuo¹². Esto depende de la *relación filogenético*, es decir, las diferencias o similitudes que puedan existir entre especies como resultado del proceso evolutivo. Esto podría ser la causa de las variaciones observadas en el reconocimiento de ciertos antígenos y en la respuesta, positiva o negativa, contra los mismos¹².

Bajo condiciones de salud, el organismo es capaz de montar una respuesta contra sustancias que no le son propias. Así, cuando una sustancia de un organismo se introduce en otro, la magnitud de la respuesta montada por este último dependerá de la relación filogenética que tengan ambos organismos.

De manera tal, que si el receptor posee una sustancia similar a la que le fue introducida, la respuesta será de menor magnitud en comparación a la generada en caso de que dicha sustancia provenga de una especie diferente a la suya.

EDAD: la inmadurez inmunológica del recién nacido o la involución del tejido linfóide que se observa en el curso de la edad avanzada, son factores que pueden impedir la expresión de la inmunogenicidad de algunos antígenos¹².

~~~~~

**DESTINO METABÓLICO:** para que resulten buenos inmunógenos, los compuestos antigénicos deben tener estructuras químicas susceptibles a la degradación enzimática por las células que los van a fagocitar.

El destino metabólico de los antígenos introducidos al cuerpo de un animal vertebrado puede influir significativamente en la inmunogenicidad de los mismos. Los antígenos más potentes generalmente se metabolizan en una forma rápida, como es el caso de las proteínas. En cambio, los antígenos que se metabolizan lentamente, como los polisacáridos se acumulan en diferentes tejidos donde permanecen intactos por tiempos prolongados<sup>13, 14</sup>.

#### 1.1.1 Importancia de la vía de administración y dosis del antígeno.

Aún y cuando el antígeno cumpla con las características de un buen inmunógeno, es necesario considerar la vía de administración, enteral o parenteral, (la cual dependerá de las características fisicoquímicas del antígeno a administrar), la dosis administrada y el esquema de inmunización.

La inmunización parenteral, se puede llevar a cabo vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal y dependiendo de la vía que se elija, el antígeno será conducido a los diferentes órganos linfoides secundarios. Por ejemplo, si se elige vía intradérmica, subcutánea o intramuscular, el antígeno será llevado a los ganglios linfáticos más cercanos; si se elige vía

---

intravenosa o intraperitoneal, el antígeno se acumulará de manera preferencial en el bazo.

Otro de los aspectos que debe ser tomado en cuenta es que para cada antígeno existe una dosis óptima de respuesta, porque de lo contrario si se encuentra en baja dosis puede no generarse ninguna o bien si se encuentra en exceso puede generarse tolerancia inmunológica<sup>16</sup>

## 1.2 Respuesta inmune innata.

La inmunidad innata consiste en aquellos mecanismos existentes antes de la infección. Los principales componentes de la inmunidad innata son:

1. barreras físicas y químicas, como las epiteliales y las sustancias antimicrobianas producidas en la superficie epitelial.
2. células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y células asesinas naturales (NK ).
3. Proteínas sanguíneas, incluyendo miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación.
4. Citocinas que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células de la inmunidad innata.<sup>17</sup>

---

Los componentes de la inmunidad innata reconocen estructuras que son características y conservadas en los microorganismos patógenos y que además no están presentes en las células de los mamíferos.

Entre estas estructuras se encuentran los ácidos nucleicos característicos de los microorganismos tales como el RNA de doble cadena, el cual es generado por virus que se encuentran replicándose o bien N-formil metionil péptidos que son típicos en las proteínas bacterianas; lípidos complejos y carbohidratos que son sintetizados exclusivamente por los microorganismos como el lipopolisacárido en las bacterias Gram negativas, los ácidos teicoicos en las bacterias Gram positivas y los oligosacáridos ricos en manosa que se encuentran en las glicoproteínas bacterianas.

Dichas estructuras son conocidas como "patrones moleculares asociados a patógeno" PAMP's y los receptores que unen a estas conservadas estructuras se les denomina "receptores de reconocimiento de patrón" o PRR's<sup>18</sup>

El sistema inmune innato emplea una gran variedad de PRRs que pueden ser expresados en la superficie de la célula, en compartimentos intracelulares o secretados al torrente sanguíneo y en otros fluidos <sup>19</sup>

~~~~~

Dentro de la familia de los PRRs se incluye a los TLRs, que son homólogos a la molécula Toll de *Drosophila*²⁰

Miembros ya caracterizados de la familia de los TLRs muestran cierta especificidad por moléculas de patógenos, por ejemplo: TLR2 se une a componentes de bacterias Gram positivas²¹ y micobacterias²²

TLR4 es una parte del receptor para el lipopolisacárido (LPS)²³ y es esencial para el reconocimiento de bacterias Gram negativas y del virus respiratorio sincicial²⁴; TLR5 reconoce la flagelina tanto de Gram positivos como de Gram negativos²⁵; y TLR9 es el receptor de DNA sin metilar²⁶

Las señales inducidas por los PAMPs pueden ser agrupadas en las siguientes tres categorías:

- señales que median la respuesta inflamatoria²⁷
- señales que funcionan como coestimuladores de la activación de células T.²⁸
- Señales que controlan la inducción de funciones efectoras^{29,30}

La repuesta del sistema inmune innato aporta señales que, junto con el antígeno promueven la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B antígeno-específicos. Entonces, la inmunidad innata participa como señal de alarma para el

~~~~~

sistema inmune adaptativo para la generación de la respuesta específica, mediante la generación de coestimuladores.<sup>31</sup>

### 1.3 Respuesta inmune celular.

Las células dendríticas inmaduras, están presentes en la mayoría de los tejidos donde exhiben una potente capacidad de capturar y procesar antígenos, pero baja actividad estimuladora de células T.

Mediadores de la inflamación y agentes microbianos promueven la migración de las células dendríticas a los órganos linfoides secundarios. Conforme migran, estas células maduran, perdiendo la capacidad de capturar antígenos y adquieren la capacidad de activar a las células T. Esta capacidad migratoria hace de las células dendríticas la célula presentadora de antígeno más relevante .

Además del complejo péptido:MHC II, las células dendríticas llevan señales que dirigen la respuesta de Th apropiada para el agente infeccioso que capturaron en el tejido<sup>32</sup>

Después de la identificación de las clases de linfocitos Th, se propuso que los linfocitos Th1 son los responsables de la inmunidad mediada por células y que los Th2 de la inmunidad humoral<sup>33,34</sup>

La principal citocina de las células Th1, el IFN- $\gamma$ , lleva a cabo funciones clave: activa macrófagos, incrementando su capacidad microbicida. Estimula la producción de anticuerpos IgG que se unen con gran afinidad a Fc  $\gamma$  R y a proteínas del sistema del complemento además de que son los anticuerpos involucrados en la opsonización y la fagocitosis. Los isotipos inducidos por la acción del IFN- $\gamma$  son IgG2a e IgG3 en el ratón.

Los linfocitos Th2 son excelentes cooperadores de los linfocitos B y estimulan la producción de grandes cantidades de IgM y de los isotipos de IgG que no fijan complemento, como lo son IgG1 en el ratón.<sup>35</sup>

Las citocinas producidas por las células Th2 tienen actividades anti-inflamatorias. IL-4 e IL-13 antagonizan la activación de los macrófagos inducida por IFN- $\gamma$ ; TGF- $\beta$  es antiproliferativa e inhibe la activación de los leucocitos. Así, el resultado neto de la activación de los linfocitos Th2 es inhibir tanto la inflamación aguda como la crónica<sup>36</sup>

Al menos otros dos factores son importantes en el balance Th1 (IL-12) y Th2 (IL-4). El primero es la dosis o concentración del antígeno. Con algunas excepciones, bajas concentraciones de antígeno e infecciones a bajas dosis tienden de manera preferencial a generar una respuesta tipo Th1, mientras que las dosis altas inducen el desarrollo de una respuesta Th2<sup>37,38</sup>

-----

Otro factor que se sabe influencia el desarrollo de las células T es la coestimulación, que se refiere a las señales generadas por las APC y que trabajan junto con el antígeno para dar lugar a la respuesta de T. Los coestimuladores mejor definidos son dos proteínas estructuralmente relacionadas, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), ambas activan a los linfocitos T mediante la interacción con su receptor, CD28.<sup>39</sup>

Otras moléculas en la superficie de los linfocitos T y de las APC pueden también regular la diferenciación de los linfocitos T.. Recientemente se planteó que la activación mediante la interacción de CD40L en las células T con CD40 en las APC se requiere para el desarrollo de células T efectoras<sup>40</sup> pero no existe evidencia de que este par ligando-receptor influencia el desarrollo de poblaciones Th1-Th2

#### 1.4 Respuesta inmune humoral

El espacio extracelular está protegido por la respuesta inmune humoral, en la cual los anticuerpos producidos por los linfocitos B ocasionan la destrucción de los microorganismos extracelulares y previenen el origen de las infecciones intracelulares. La activación de los linfocitos B y su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos está dada por la presencia del antígeno y generalmente requiere de la cooperación de las células Th.<sup>41</sup>

De acuerdo con evidencias experimentales, se propone que la activación de las células B se lleva a cabo en dos etapas. La primera independiente de la cooperación de T, es decir, antígeno dependiente y otra en la cual intervienen los linfocitos Th dando origen al cambio de isotipo y la generación de memoria<sup>42</sup>. A continuación se describen las características de dichas etapas:

Fase I: activación de la células B independiente de T. La activación de la célula B antígeno específica es inducida e los tejidos linfoides secundarios mediante señales originadas de la unión del antígeno al BCR, esta señal es denominada señal 1.

Muchos patógenos expresan en su superficie estructuras antigénicas repetitivas, que son altamente inmunogénicas para las células B, y dichas estructuras son el blanco de la respuesta inmune humoral.<sup>43</sup>

Parece ser que las estructuras repetitivas actúan como potentes inductores de la respuesta de B. Así, durante la fase temprana de la respuesta muchos patógenos son capaces de activar a los linfocitos B independiente de la cooperación de los linfocitos T <sup>44</sup>

La activación primaria de la célula B es dependiente sólo de la presencia del antígeno y son las señales co-estimuladoras proporcionadas por las células T. Otras células como los macrófagos y las células dendríticas, sin embargo, pueden

promover señales que incrementan o pueden ayudar en la activación de las células B. Así, las APC juegan un papel crucial no sólo para la activación de las células T naïve sino también para la activación de los linfocitos B naïve <sup>45,46,47</sup> después de la cual se llevará a cabo la proliferación celular.

Hogkin et al <sup>48</sup> demostraron que el cambio de isotipo a IgG puede ocurrir después de que las células B han llevado a cabo al menos cinco divisiones celulares.

El cambio de isotipo y la secreción de IgG son eventos de diferenciación que son dependientes de la interacción entre los linfocitos T y B mediante CD40 y CD40L <sup>49,50</sup>

Fase II: eventos dependiente de T que regulan la respuesta inmune humoral.

Al mismo tiempo que la activación inicial y la expansión clonal de las células B ocurre ante la presencia del antígeno, la activación de las células T así como la expansión es dirigida por su interacción con las APC.

La segunda fase de la cascada de activación de los linfocitos B, está caracterizada por la reacción del centro germinal que inicia la maduración de la

afinidad, el cambio de isotipo y el desarrollo de memoria, y es claramente dependiente de T. <sup>51, 49, 50</sup>

La activación de las células B vía moléculas co-estimuladoras de las células T como CD40L, OV40 y CD28 son necesarias para el cambio de isotipo, la formación de centros germinales y la inducción de células B de memoria. <sup>52, 53, 54.</sup>

Los anticuerpos contribuyen a la inmunidad en diferentes formas:

- Para entrar a las células, los virus y bacterias intracelulares necesitan unirse a moléculas de la superficie de la célula blanco. Los anticuerpos que se unen a este tipo de patógenos pueden prevenir este fenómeno y se les denomina anticuerpos neutralizantes.

La neutralización por anticuerpos también es un mecanismo efector para evitar la entrada de las toxinas bacterianas a las células.

- Los anticuerpos protegen al organismo contra los microorganismos extracelulares facilitando su fagocitosis, esto se puede llevar a cabo mediante dos mecanismos:
  1. Los anticuerpos que se han unido al patógeno son reconocidos por los receptores a Fc presentes en las células fagocíticas. A esta función de los anticuerpos se le denomina opsonización.

- 
2. Mediante la unión de los anticuerpos a la superficie del patógeno se puede dar lugar a la activación del sistema del complemento

Los mecanismos efectores de los anticuerpos están determinados por el isotipo o la clase de anticuerpos generados durante la fase humoral de la respuesta inmune.

### 1.5 Protección

En el curso normal de la infección, el patógeno primero prolifera hasta cierto nivel, y si no es controlado por la respuesta inmune innata, se genera la respuesta inmune adaptativa y se estimula la generación de anticuerpos y células T efectoras que lo eliminarán del cuerpo.

Una respuesta inmune adaptativa eficiente llega a generar un estado de protección. Este estado consiste en la presencia de células efectoras y moléculas generadas durante la respuesta inicial y finalmente la memoria inmunológica.

---

## 1.6 Respuesta de memoria.

La consecuencia más importante de la respuesta del sistema inmune adaptativo es el establecimiento de un estado denominado memoria inmunológica.

La memoria inmunológica es la capacidad del sistema inmune de responder más rápida y efectivamente ante la presencia de patógenos con los cuales se haya

tenido un contacto previo, reflejando con esto la preexistencia de una población de linfocitos antígeno-específicos que se expandirán clonalmente.

### 1.6.1 Linfocitos B de memoria.

La respuesta de memoria de B es un fenómeno sistémico caracterizado por los altos títulos y la afinidad de una rápida respuesta de anticuerpos después de la reexposición al antígeno <sup>55, 56, 57, 58</sup>

Conceptualmente, esta respuesta puede ser considerada en cuatro etapas. La primera involucra la inducción de la célula B de memoria, la segunda involucra la permanencia de dicha célula, la tercera la expresión de la célula de memoria en la reexposición y la cuarta la proliferación de esta célula.

La respuesta secundaria de anticuerpos se caracteriza en los primeros días por la producción de pequeñas cantidades de anticuerpos clase IgM y una gran cantidad de anticuerpos clase IgG, con presencia de IgA e IgE. Estos anticuerpos son generados por células B de memoria que llevan a cabo de manera rápida el cambio de inmunoglobulinas y que además tienen una mayor expresión de moléculas MCH clase II sobre su superficie en comparación con los linfocitos B *naïve*.

Se cree que los linfocitos B de memoria continúan recirculando a través de los mismos compartimentos de los órganos linfáticos secundarios que contienen células B *naïve*, principalmente los folículos del bazo, ganglios linfáticos y placas de Peyer.

#### 1.6.2 Linfocitos T de memoria.

Un vez activados los linfocitos T *naïve*, éstos proliferan generando células efectoras que migran a las áreas de B o al tejido inflamado <sup>57, 58, 59, 60</sup>. Una fracción de los linfocitos T activados persisten en la circulación como células de memoria confiriendo protección. <sup>61, 62, 63</sup>

La expresión de CCR7, un receptor de quimiocinas que controla la migración a los órganos linfoides secundarios, hace posible la división de las

---

células T de memoria en dos distintas clases funcionalmente diferentes. En contraste, las células CCR7<sup>-</sup> estimulan eficientemente a las células dendríticas y se diferencian a células efectoras después de la segunda estimulación antigénica, y las células CCR7<sup>+</sup> expresan receptores involucrados en la migración a los órganos linfoides secundarios.

Así se han denominado a las células CCR7<sup>+</sup> y CCR7<sup>-</sup> como de memoria central (T<sub>CM</sub>) y de memoria efectora (T<sub>EM</sub>) respectivamente.<sup>64</sup>

Los linfocitos T CD8 de memoria requieren ser reactivados para poder ser citotóxicos. Estas células siguen expresando algunos marcadores característicos de las células activadas como CD44, pero no expresan algunos otros marcadores de activación como CD69. Expresan más Bcl-2, una proteína que promueve la supervivencia de la célula y que puede ser la responsable del tiempo de vida media largo de los linfocitos B de memoria.

Estos linfocitos son más sensibles a la reestimulación con el antígeno en comparación con los linfocitos B *naïve* y producen en mayor cantidad citocinas como IFN- $\gamma$  en respuesta a ese estímulo.

---

## 2. Agentes vacunales.

La finalidad de una vacuna es estimular la respuesta inmune sin provocar al individuo la enfermedad. Las vacunas en primer plano están diseñadas para prevenir la enfermedad pero algunas están diseñadas para administrarse una vez que ha ocurrido la infección.

A pesar de que los microorganismos poseen una gran cantidad de moléculas que son extrañas al animal o la persona a la que han infectado, la respuesta inmune contra la mayor parte de éstas resulta ser irrelevante, entonces surge la necesidad de identificar, purificar y caracterizar aquellos antígenos que llegan a conducir a un estado de inmunidad protectora en el hospedero.

De este modo se han generado, en el transcurso del descubrimiento de las propiedades de los antígenos que conducen a la protección diferentes estrategias de vacunación que a continuación se describen de manera breve.

### 2.1 Tipos de vacunas.

#### 2.1.1 Vacunas a base de microorganismos vivos atenuados.

Desde la vacuna de Jenner a base de microorganismos vivos atenuados este tipo de vacunas resultan de gran relevancia. El proceso de atenuación involucra la propagación del microorganismo de interés bajo condiciones

desfavorables para su desarrollo o bien bloquear los genes que se sepan codifiquen para aquellos componentes implicados en la virulencia del agente, adicionalmente hay que bloquear aquellas vías que le permitan a éste adquirir esas moléculas de la flora normal del sitio donde se aplicó la vacuna. <sup>65</sup>

Muchas de estas vacunas tienen una eficacia mayor al 90%, esto es porque al replicarse el patógeno en el hospedero generando un estímulo antigénico similar al de la infección. Este tipo de vacunas tiene como inconveniente que en algunos casos, la generación de mutaciones puede dar lugar al reestablecimiento de la virulencia y establecer la enfermedad en el organismo.

#### 2.1.2 Vacunas a base de microorganismos muertos.

Como en estas vacunas el antígeno no se replica, se requieren hacer refuerzos. En este tipo de vacunas la eficacia es variante, dependiendo del antígeno, lo que representa un problema porque, si bien son seguras con respecto a aquellas en las que se emplean microorganismos vivos<sup>65</sup>, al ser requerido un refuerzo resulta difícil llegar a toda la población en más de una ocasión. Sin embargo, tienen el inconveniente de que conservan moléculas tóxicas del patógeno que generan en muchos casos reacciones secundarias adversas en los vacunados.

---

### 2.1.3 Vacunas a base de subunidades.

Algunas vacunas a base de subunidades son muy inmunogénicas a dosis bajas, otras requieren del uso de adyuvantes como las sales de aluminio para adsorber a la subunidad generalmente proteica para incrementar su inmunogenicidad. Como grupo, las vacunas a base de subunidades son de costo muy elevado y resulta empleo difícil en los países subdesarrollados.

Las vacunas de este tipo tienen como ventajas que la respuesta montada está dirigida contra la molécula de interés además que los componentes del patógeno que puedan ocasionar efectos adversos son eliminados<sup>65</sup>. En contraste, este tipo de vacunas, cuando se trata de antígenos timo independientes no

pueden ser empleadas en pacientes pediátricos por la inmadurez en su sistema inmunológico<sup>65</sup>, además que se requiere emplear adyuvantes para mejorar la respuesta inmune debido a que son de baja complejidad.

### 1.1.5 Vacunas de DNA

Las vacunas de DNA involucran la administración de un plásmido que codifica para la proteína responsable de la respuesta protectora. Este vector es tomado por las células en donde es expresado y puede entonces generar una respuesta inmune. <sup>66</sup>

En este tipo de vacunas, el antígeno es producido por las células del individuo inmunizado, es liberado al medio extracelular o bien se presenta principalmente por moléculas MHC clase I, estimulando a las células CD8<sup>+</sup>. Además, el antígeno puede ser glicosilado por la maquinaria del hospedero y adquirir su patrón de glicosilación nativo.<sup>66</sup>

### 3. Adyuvantes.

#### 3.1 Definición de adyuvante.

Existen diversas sustancias que pueden incrementar de modo significativo la inmunogenicidad de algunos antígenos. Estas sustancias son denominadas adyuvantes y la mayoría de ellas se emplean con fines de experimentación exclusivamente, ya que su administración en humanos implica ciertos riesgos, particularmente la generación de hipersensibilidad.

El término adyuvante (del latín *adyuvare*, que significa ayudar) fue empleado por Ramon en 1926 para aquellas sustancias que en combinación con un antígeno en específico genera mayor inmunidad que el antígeno *per se*<sup>67</sup>. La enorme diversidad de compuestos que incrementan de manera la respuesta inmune específica a un antígeno funcionando como adyuvante se clasifica de manera arbitraria como sigue:<sup>65</sup>

- 
1. Sales y aceites minerales
  2. Micropartículas.
  3. Productos bacterianos.
  4. Citocinas y hormonas.
  5. Polianiones
  6. Poliacrílicos
  7. Acarreadores
  8. Vectores vivos
  9. Vehículos

### 3.2 Tipos de adyuvantes.

Los adyuvantes más conocidos son con productos naturales como bacterias muertas o extractos de las mismas. Sin embargo, también funcionan como adyuvantes algunas sales de aluminio, los componentes purificados de la pared celular de micobacterias y varios productos sintéticos.

Las sales de aluminio con iones monovalentes de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , pueden formar compuestos solubles como los sulfatos o insolubles como los óxidos, hidróxidos y los fosfatos de aluminio. Los primeros ocasionan la agregación de las proteínas, mientras que los segundos las adsorben y de este modo impiden su difusión.

---

Actualmente, numerosas vacunas se preparan adsorbiendo los antígenos a compuestos de aluminio. Sin embargo, estos inmunógenos presentan el inconveniente de que no pueden ser liofilizados y, por consiguiente, requieren refrigeración para su transporte.

Uno de los adyuvantes más conocidos es el adyuvante completo de Freund (FCA). El FCA consiste de una emulsión que contiene aceite mineral, lanolina y bacilos tuberculosos muertos. Una inyección subcutánea o intramuscular de esta mezcla ocasiona una reacción inflamatoria local y granulomatosa.

Otros estudios han demostrado que la inmunogenicidad de los antígenos puede verse incrementada de modo significativo cuando se inoculan después de haber sido conjugados a polímeros sintéticos o adsorbidos sobre la superficie de partículas inertes de plástico o bentonita. No obstante, estos procedimientos pueden generar reacciones adversas y no ofrecen mayor potencia estimulante que las sales de aluminio.

Las endotoxinas de las bacterias Gram negativas (LPS) también pueden actuar como inmunoestimulantes, aunque se puede decir que su efecto es más bien inmunomodulador, ya que pueden actuar tanto para suprimir como para facilitar la respuesta inmune. Las principales actividades biológicas del LPS son: estimula a los linfocitos B, activa a macrófagos, estimula a linfocitos  $T_{H2}$ , induce

---

reacciones inflamatorias, activa vía alterna del complemento y eleva producción de glucocorticoides. El lípido A es el componente del LPS responsable tanto de su actividad "tóxica" como de su actividad inmunoestimulante.

El papel de los liposomas como adyuvantes inmunológicos fue establecido en 1974 cuando una fuerte respuesta inmune humoral al toxoide diftérico incluido en liposomas fue observada después de su inyección en ratones. A diferencia de otros adyuvantes no hubo formación de granuloma en el sitio de infección ni hubo reacciones de hipersensibilidad en ratones.<sup>68</sup>

En años posteriores se demostró que la adyuvanticidad de los liposomas se aplica a una gran variedad de antígenos bacterianos, virales, parasitarios y a antígenos asociados a tumor.<sup>69,70</sup>

Las formulaciones de adyuvantes clásicas como los adyuvantes de Freund y sales de aluminio emulsiones con el antígeno, o bien el antígeno es adsorbido en geles que contienen el adyuvante.<sup>71</sup> Los ISCOM (complejos inmunoestimuladores, Iscotec AB, Uppsala, Suiza) es un complejo que consiste de lípidos, saponinas y antígenos que se forman espontáneamente cuando se mezclan los constituyentes correctos en la estequiometría adecuada.

La composición del ISCOM ideal depende de diferentes factores como la inmunogenicidad del antígeno incorporado, grado y purificación de la saponina

Quillaja, la especia que va a ser inmunizada y la dosis de antígenos que será usada en la inmunización. Las cantidades de Quil-A y antígeno en los ISCOM debe ser balanceada adecuadamente para evitar efectos colaterales causados por altas dosis de Quil-A. <sup>72</sup>

### 3.3 Mecanismos de acción.

Los adyuvantes pueden incrementar la respuesta a los antígenos de diferentes formas:<sup>73</sup>

1. Pueden incrementar la inmunogenicidad de los antígenos.
2. Obtener una respuesta rápida y que se mantenga a través del tiempo.
3. Modular la afinidad de los anticuerpos, especificidad e isotipo.
4. Estimular la inmunidad mediada por células (CMI)
5. Promover la inducción de inmunidad en mucosas
6. Incrementar la respuesta inmune en individuos inmunológicamente inmaduros (infantes) o en personas adultas mayores
7. Disminuir la dosis de antígenos en las vacunas y así reducir los costos.

El principal modo de acción de la mayoría de los adyuvantes particulados , o "liberadores de antígeno" por ejemplo: micropartículas, emulsiones, liposomas, ISCOMs es promover la captura del antígeno por las células presentadoras de antígeno en el sitio de inyección.

---

Los adyuvantes que se derivan de los patógenos, por ejemplo, componentes de la pared celular activan al sistema inmune innato mediante su reconocimiento por los PRRs, dando como resultado la activación de los procesos pro-inflamatorios que dirigen la inducción de la inmunidad adquirida.<sup>74</sup> a este tipo de adyuvantes se les denomina inmunoestimuladores. Así por ejemplo, parte de la acción del adyuvante completo de Freund, el cual contiene micobacteria es mediada por TLR2.

#### 4. Antecedentes del uso de virus vegetales como agentes vacunales.

Los adyuvantes son capaces de promover la generación de anticuerpos hacia un antígeno después de la inmunización. Sin embargo, muchos de estos adyuvantes no tienen la capacidad de activar a los linfocitos T citotóxicos (CTL). La razón de esto recae en la existencia de dos vías alternativas de presentación de antígeno dando lugar a la estimulación de células T CD4<sup>+</sup> y a la generación de anticuerpos o la estimulación de células T CD8<sup>+</sup>. En general, las proteínas exógenas entran a la célula presentadora de antígeno por endocitosis. Los péptidos generados por la degradación proteolítica de esas proteínas se unen a las moléculas de MHC clase II que viajan hacia la superficie de la célula antes de estimular a las células CD4<sup>+</sup>. Los péptidos derivados de proteínas citoplasmáticas son translocadas dentro del retículo endoplásmico y unidas a moléculas MHC clase I, cuando éstas alcanzan la superficie de las APC, activan a las CTL.

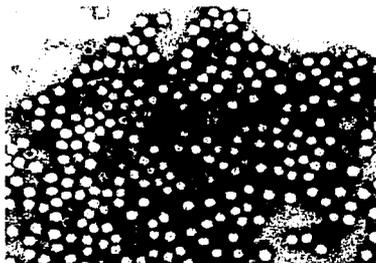
---

Para favorecer la activación de linfocitos T citotóxicos se ha optado por administrar al antígeno dentro de la célula presentadora de antígeno, vía las vacunas de DNA o mediante el uso de virus recombinantes (partículas semejantes a virus, VLP) para forzar la presentación del antígeno en el contexto de moléculas MHC clase I.<sup>74</sup>

Los VLP's son seguros y altamente inmunogénicos. Consisten en una o más proteínas de la cápside viral que pueden actuar como adyuvante acarreado la secuencia peptídica dentro de la célula presentadora de antígeno y ningún agente adyuvante es requerido.

En el desarrollo de VLP's ha derivado en el empleo de virus vegetales como el virus de mosaico del ejote (CPMV) y el virus de mosaico del tabaco (TMV) como agentes acarreadores de péptidos heterólogos.

#### 4.1 Virus de mosaico del ejote (Cowpea Mosaic Virus, CPMV)



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Microscopía electrónica del virus de mosaico del ejote (CPMV). Las muestras fueron teñidas negativamente, analizadas y observadas a 39,000x (Bar=200nm)

El virus de mosaico del ejote (CPMV) es miembro de la Familia *Comoviridae*, es un virus no envuelto, de simetría icosaédrica con un diámetro de 28 nm. Su estructura fue descrita por resolución atómica (Stauffer et al, 1987; Chen et al, 1990).

Su nucleocápside contiene 60 copias de las subunidades L y S (large, small) de la proteína de la cápside que tienen un arreglo icosaédrico.

El genoma de CPMV consiste de dos moléculas de RNA (+) de 5889 (RNA1) y 3481 (RNA2) nucleótidos (Lomonosoff & Shanks, 1983; Van Wezenbeek et al, 1983).

---

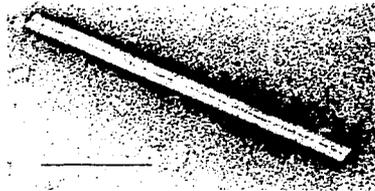
CPMV puede ser modificado genéticamente para que exprese péptidos ajenos o heterólogos en su superficie.

Así, se han expresado diferentes péptidos tanto de origen bacteriano como algunos provenientes de virus que son patógenos para los mamíferos, a continuación se mencionan las partículas virales quiméricas que se han diseñado para CPMV:

- Proteína transmembranal gp41 del HIV-1 IIB <sup>75</sup>
- OmpF *Pseudomonas aeruginosa* <sup>76,77</sup>
- Residuos 3 a 19 de VP2 del virus del parvovirus canino. <sup>78,79</sup>
- Péptido D2 (residuos 1 al 30 de D2) de la proteína que une fibronectina (FnBP) de *Staphylococcus aureus*. <sup>80,81</sup>

---

#### 4.2 Virus de Mosaico del Tabaco (Tobacco Mosaic Virus, TMV)



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Microscopía electrónica del virus de mosaico del tabaco (TMV). Las muestras fueron teñidas negativamente, analizadas y observadas a 39,000x (Bar=200nm)

El virus de mosaico del tabaco (TMV) pertenece al género *Tobamovirus*, es un virus no envuelto, de simetría helicoidal, tiene unas dimensiones de 300 nm de largo y 18 nm de ancho.

Su nucleocápside está formada de 60 subunidades proteicas y su genoma es ssRNA(+).

Las quimeras que se han diseñado con este virus son las siguientes:

- OmpF de *Pseudomonas aeruginosa*<sup>82</sup>
- 10 ó 15 aminoácidos epitope 5B19 de la proteína SP del virus de la hepatitis murino (MHV)<sup>83</sup>

---

#### 4.3 Bushy Tomato Stunt Virus, BTSV.

El BTSV es miembro de la familia *Tombusviridae*, su material genético consiste de RNA de una sola cadena con polaridad positiva. La cápside tiene forma de icosaedro, y está compuesta de 180 subunidades proteicas, cada una con un peso de 41kDa.<sup>84</sup>

Para este virus se ha diseñado una quimera empleando un péptido de 13 aminoácidos derivado del asa V3 de la glicoproteína 120 (gp120) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1).<sup>85</sup>

---

## 5. Introducción al virus de mosaico de la papaya (PapMV)



Figura 3. Microscopía electrónica del virus de mosaico de la papaya (PapMV).

Pertenece a la familia de los *Potexvirus*, que son virus no envueltos. Su nucleocápside es filamentososa y mide 530 nm de largo. En cuanto a su material genético, éste consiste de RNA de una sola cadena de polaridad positiva.

La proteína de la cápside tiene un peso de 22.93kDa y está compuesta de 180 subunidades proteicas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

**Para este virus se están desarrollando en nuestro laboratorio tecnologías para dar origen a partículas quiméricas acarreadoras de péptidos heterólogos con fines de vacunación.<sup>86, 87, 88, 89, 90, 91</sup>**

---

## **V. Planteamiento del problema.**

El virus de mosaico de la papaya (PapMV) es una partícula que cumple con las características moleculares de un buen inmunógeno como: es una partícula compleja químicamente, altamente organizada y filogenéticamente distante.

Asimismo, los procesos involucrados en su obtención y purificación son sencillos y de bajo costo en comparación con otros sistemas que son empleados actualmente.

Por esto, consideramos que PapMV es un buen candidato para estudiar los fenómenos involucrados en la inducción de la respuesta inmune. Además al ser susceptible a la modificación de su cápside por Ingeniería Genética puede dar lugar a una partícula acarreadora de antígenos incrementando la capacidad inmunogénica de éstos, es decir funcionar como un adyuvante.

---

## **VI. Hipótesis**

Debdo a sus características moleculares, el virus de mosaico de la papaya (PapMV) inducirá eficientemente una respuesta inmune humoral caracterizada por altos titulos de anticuerpos y una larda duración.

Además, podrá ser empleado como un adyuvante que incremente la respuesta contra proteínas o péptidos heterólogos con el objetivo de generar una respuesta protectora y de larga duración contra antígenos de interés en la vacunación.

## **V. Objetivos**

### **1.Objetivo general.**

**Estudiar la inmunogenicidad y capacidad adyuvante de PapMV**

### **2.Objetivos particulares.**

- 1. Caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por PapMV**
- 2. Evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-PapMV**
- 3. Analizar el efecto adyuvante inducido por PapMV**

---

## **VI. Diseño experimental.**

### **1. Materiales**

#### **1.1 Material biológico**

Los ratones BALB/c entre ocho y diez semanas de edad fueron proporcionados por el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, de la UNAM localizado dentro de las instalaciones del Hospital General de México.

El virus de mosaico de la papaya (PapMV) fue obtenido y purificado en el Centro de Investigación en Infectología de la Universidad Laval. Québec, Canadá.

Ovalbúmina. Marca Sigma No. de catálogo A-2512.

---

**Anticuerpos:**

**HRP-anti- IgM de ratón obtenido en conejo**

**Zymed No. cat. 61-6820**

**HRP- anti- IgG de ratón obtenido en conejo**

**Zymed No. cat. 61-6020**

**HRP- anti-IgG1 de ratón obtenido en conejo**

**Zymed No. cat. 61-0120**

**HRP- anti- IgG2a de ratón obtenido en conejo**

**Zymed No. cat. 61-0220**

**HRP-anti-IgG2b de ratón obtenido en conejo**

**Zymed No. cat. 61-0320**

**HRP-anti- IgG3 de ratón obtenido en conejo**

**Rockland No. cat. 610-4343**

**1.2 Reactivos y soluciones**

**Ácido clorhídrico 0.1N (HCl)**

**Tomar 0.82 mL de ácido clorhídrico (37% pureza) y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL con 50 mL de agua destilada.**

---

**Hidróxido de sodio 0.1N (NaOH)**

**Pesar exactamente 0.4g de hidróxido de sodio, disolver y aforar con agua MilliQ a 100mL.**

**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 Milli Q, ajustar pH y aforar a 1000mL con agua Milli Q.**

**Solución reguladora de citratos (CBS) 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 bloqueo**

**Pesar exactamente 5.0 g de leche descremada, disolverla en 100 mL de solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7.4.**

**Debe prepararse el día de su utilización.**

---

**Solución de lavado.**

Disolver 1 mL de Tween20 en 1000 mL de agua destilada.

**Solución reveladora.**

Pesar exactamente 0.006g de o-fenildiamina.

Disolver en 12 mL de CBS pH 5.6, adicionar 10 $\mu$ L de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en el momento de su utilización.

**Solución de ácido sulfúrico 2.5 N. (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

Tomar 6.66 mL de ácido sulfúrico (98% pureza,  $\delta$  1.84) y transferir a un matraz volumétrico de 100mL con 50 mL de agua destilada, dejar enfriar y aforar a 100mL con agua destilada.

**Solución amortiguadora de carbonatos (CaBS) pH 9.5**

Pese exactamente:

Bicarbonato de sodio 7.0 g

Carbonato de sodio 2.8 g

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

---

### 1.3 Equipo de laboratorio

Placas de poliestireno Costar® marca Corning de 96 pozos. No. de catálogo 3590

Potenciómetro Corning Modelo 10

Lector de ELISA Dynex Technologies MRXII

## 2. Inmunizaciones

Para el experimento de determinación de la dosis óptima, los ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 10, 50 y 100  $\mu\text{g}$  PapMV en 500  $\mu\text{L}$  de SSI. La suspensión viral se realizó en solución salina isotónica (SSI) calidad inyectable.

En el experimento de evaluación del efecto de la vía en la respuesta de anticuerpos los ratones fueron inmunizados por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal y oral con una dosis de 100 $\mu\text{g}$  PapMV (día cero). La suspensión viral se realizó en solución salina isotónica (SSI) calidad inyectable, excepto para la vía oral en la cual se empleo CaBS como vehículo.

---

Para la evaluación del efecto adyuvante se inmunizaron los ratones vía intraperitoneal con 50 $\mu$ g PapMV, 10 $\mu$ g PapMV, 2 mg OVA, 50 $\mu$ g PapMV + 2 mg OVA, 10 $\mu$ g PapMV +2 mg OVA y 5 $\mu$ g LPS E. coli + 2 mg OVA como control positivo.

En todos los experimentos se incluyó un grupo de ratones al que se le administró SSI calidad inyectable.

En todos los casos, las muestras de sangre fueron obtenidas de la cavidad retro-orbital los días indicados en las gráficas. Después de obtenidas las muestras de sangre, éstas se centrifugaron en tubos Microtainer (Becton Dickinson) a 3000 rpm/5min/ temperatura ambiente y mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### 3. Detección de anticuerpos por el método de ELISA (ensayo inmunoenzimático en fase sólida)

Para detectar los anticuerpos contra los antígenos empleados, se recubrieron placas de 96 pozos con PapMV (0.1  $\mu$ g PapMV/pozo), OVA (15  $\mu$ g/pozo), las suspensiones se realizaron en solución amortiguadora de carbonatos.

Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora y posteriormente a 4°C toda la noche, después se lavaron 4 veces con solución de lavado y se bloquearon por 1 hora a 37°C.

Se realizaron diluciones seriadas de los sueros partiendo de una dilución 1/40 en un factor de 2 en solución de bloqueo y se incubaron 1 hora a 37°C. Al final de la incubación, se lavaron las placas 4 veces.

Se adicionó el anticuerpo de conejo anti-ratón (IgM, IgG o sus isotipos) marcado con peroxidasa de rábano (1:1000 en solución de bloqueo), las placas se incubaron 1.5 horas.

A posterior lavado (4 veces) se agregaron 100µL de solución reveladora por pozo incubando 10 minutos en la obscuridad y se determinó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de ELISA.

Los títulos fueron determinados tomando como valor de 1 el promedio de las absorbancias de los controles negativos multiplicado por tres.

## VII. Resultados

- Determinación de la dosis óptima de administración del virus de mosaico de la papaya (PapMV) en ratones de la cepa Balb/C

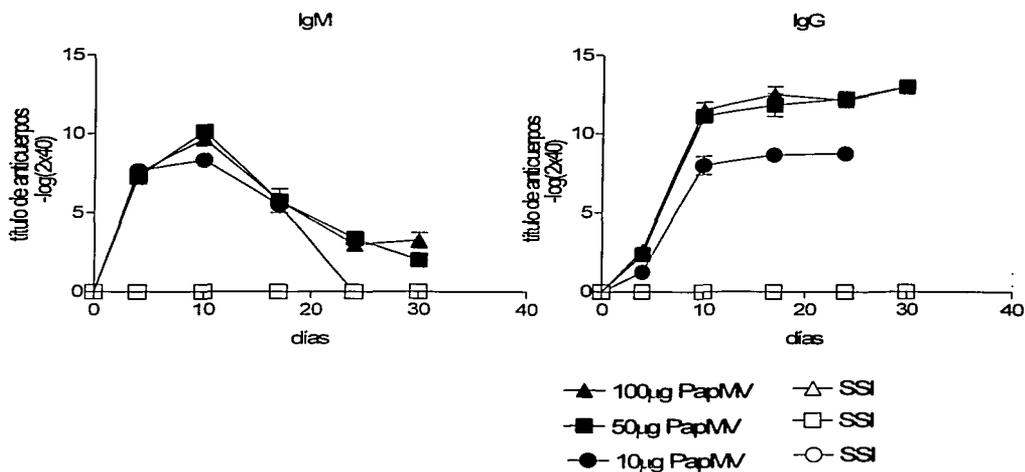


Figura 4. Respuesta de anticuerpos IgM e IgG anti-PapMV en ratones inmunizados con diferentes dosis del virus de mosaico de la papaya (PapMV) por vía intraperitoneal. La sangre se obtuvo retroorbitalmente en los días señalados y mediante su centrifugación se obtuvo el suero, el cual fue analizado por el método ELISA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Estos resultados nos muestran que existen un efecto dosis dependiente en la cinética de producción de anticuerpos anti-PapMV. Así para las dosis de 100 $\mu$ g y 50 $\mu$ g de virus de mosaico de la papaya (PapMV) no se observan diferencias significativas en la cinética de anticuerpos. En cambio, para la dosis de 10 $\mu$ g de virus sí se observan diferencias en cuanto a la producción de anticuerpos en cuanto a cantidad y no así en el tiempo de generación de éstos.

- Evaluación de la respuesta de anticuerpos de ratones inmunizados con el virus de mosaico de la papaya (PapMV) por diferentes vías

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

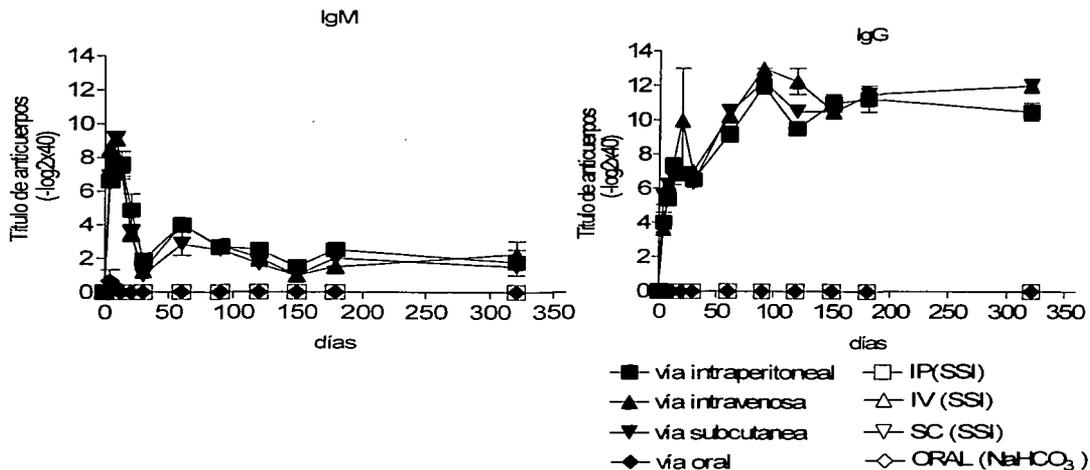


Figura 5. Respuesta de anticuerpos IgM e IgG anti-PapMV en ratones inmunizados por diferentes vías con una sola dosis del virus de mosaico de la papaya (PapMV). La sangre se obtuvo retroorbitalmente en los días señalados y mediante su centrifugación se obtuvo el suero, el cual fue analizado por el método ELISA.

En la figura 5 se observa que la producción de IgM alcanza su punto máximo el día 8, disminuyendo gradualmente hasta el día 30 permaneciendo a niveles bajos de manera constante hasta el día 318 posteriores a la inmunización.

Para los anticuerpos IgG, se observa que la producción de anticuerpos inicia a partir del día 4, alcanzando su punto máximo hacia el día 120. Después de este tiempo se observa una ligera disminución en los títulos manteniéndose constantes en un título de 11 a lo largo del tiempo de análisis.

En ambos casos no se observan diferencias significativas en cuanto a la cinética para las vías intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. Sin embargo, para la vía oral no se detecta producción de anticuerpos IgM ni IgG.

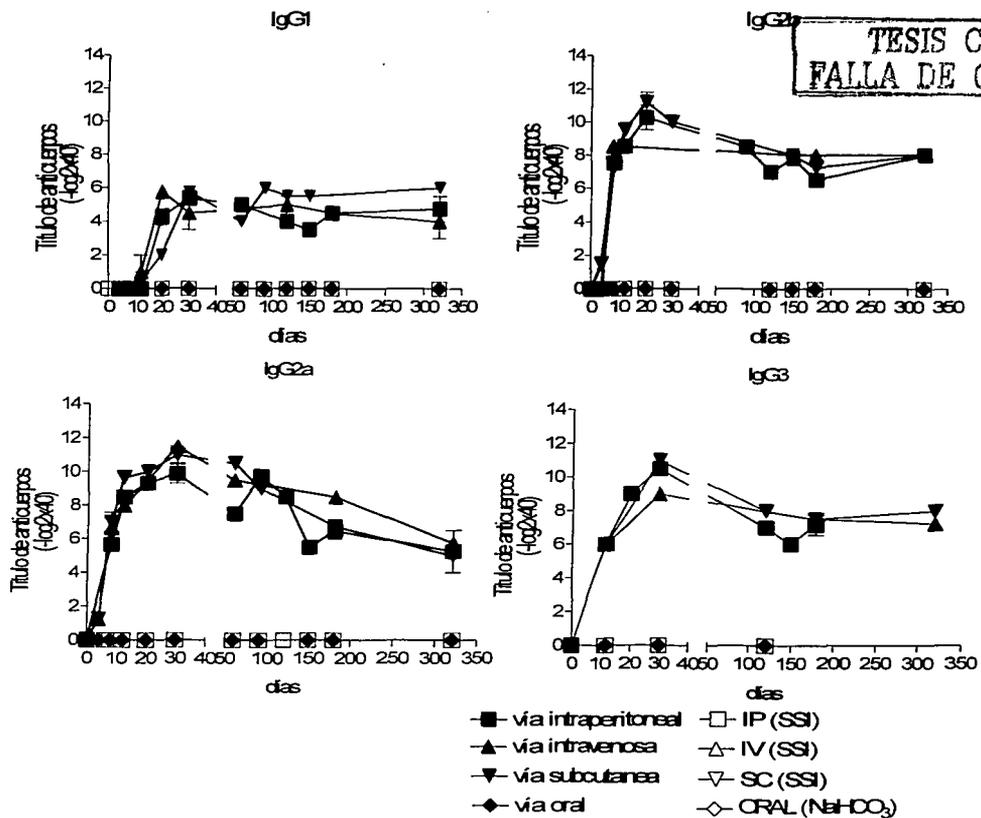


Figura 6. Respuesta de anticuerpos IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-PapMV en ratones inmunizados por diferentes vías con una sola dosis del virus de mosaico de la papaya (PapMV). La sangre se obtuvo retroorbitalmente en los días señalados y mediante su centrifugación se obtuvo el suero, el cual fue analizado por el método ELISA.

En la figura 6 se presentan las gráficas correspondientes a la cinética de producción de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Se puede observar que tampoco existen diferencias significativas en la respuesta para las vías intraperitoneal, intravenosa y subcutánea asimismo la ausencia de isotipos para la vía oral. Se observa que el orden en magnitud de producción de anticuerpos tiene el siguiente comportamiento en orden descendente:  $IgG2b \geq IgG2a > IgG3 > IgG1$ . Para todos los isotipos se observa el punto máximo de producción en el día 30 presentándose un ligero descenso que se mantiene constante incluso después de los 318 días en los que se siguió el estudio.



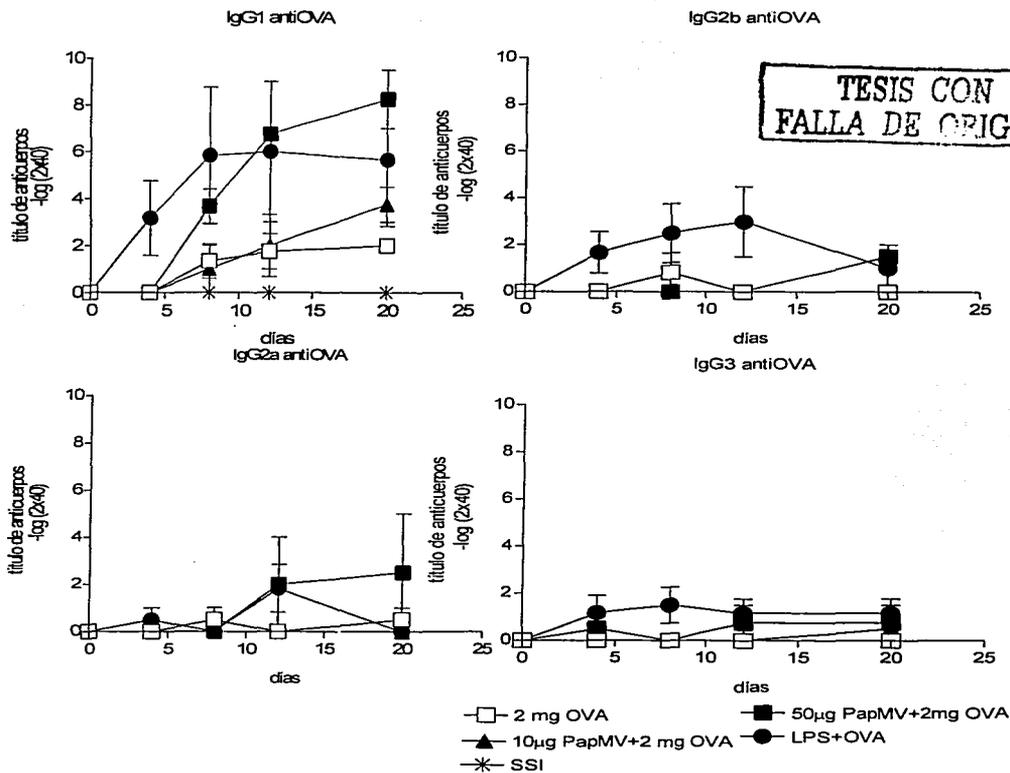


Figura 8. Respuesta de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-OVA en ratones inmunizados vía intraperitoneal con los antígenos mencionados. La sangre fue obtenida retroorbitalmente y centrifugada para obtener el suero. La detección de los anticuerpos se realizó por el método ELISA.

En la figura 8 podemos observar el efecto adyuvante del virus de mosaico de la papaya (PapMV) sobre la ovoalbúmina (OVA), registrándose un efecto positivo en la producción de anticuerpos IgG1. Aquí se logra mantener la respuesta a diferencia del control que emplea LPS de *E. coli* como adyuvante, en la cual se registra una caída al día 12 en los niveles de anticuerpos generados.

Comparativamente, no se detectó la presencia de las demás subclases de IgG.

- Evaluación de la especificidad de los anticuerpos anti-PapMV

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

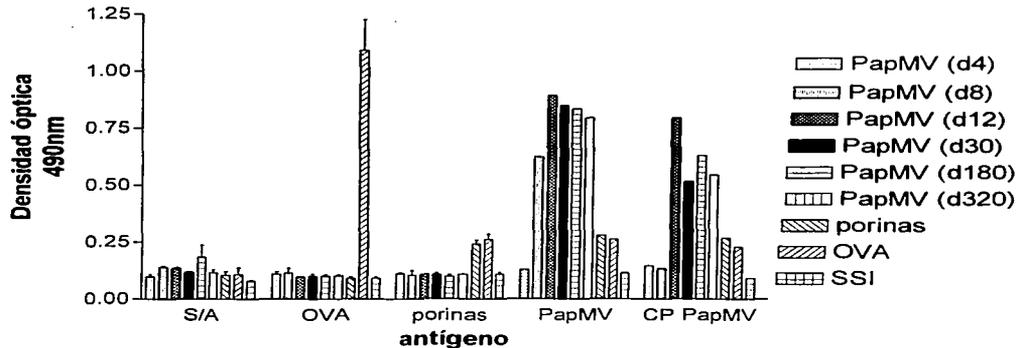


Figura 9. Caracterización de la especificidad de los anticuerpos producidos. Los sueros de los días 4, 8, 12, 30, 180 y 320 de la vía intravenosa se enfrentaron con cuatro diferentes antígenos. En este ensayo los sueros se diluyeron 1/40.

En la figura 9 se registra la especificidad de los anticuerpos generados por los ratones BALB/c inmunizados con PapMV. Los sueros obtenidos en los días señalados en el recuadro se enfrentaron en dilución 1/40 contra los siguientes antígenos: las porinas de *Salmonella typhi* y el lipopolisacárido de *E. coli*, la proteína de la cápside del PapMV y el virus de mosaico de la papaya completo.

---

Se observa que los anticuerpos generados reconocen de manera específica tanto al virus completo como a la proteína de la cápside, por lo que podemos señalar que es el antígeno inmunodominante. Además no detectamos reconocimiento hacia el LPS ni hacia las porinas que son antígenos comunes de enterobacterias presentes en la flora normal de los ratones.

---

## **VIII. Discusión.**

Analizando la respuesta inmune humoral generada por el virus de mosaico de la papaya (PapMV), vemos que en la fase primaria hay generación de anticuerpos IgM e IgG desde el día 4 después de la inmunización siendo más abundantes las IgM. En los días posteriores no encontramos una producción polarizada de alguno de los isotipos de IgG y hay producción de todos, es decir, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3.

Se sabe que el rearrreglo de DNA que da origen al cambio de isotipo y confiere la diversidad efectora de la respuesta inmune humoral está dirigido por citocinas, especialmente aquellas producidas por las células T efectoras CD4+.

Así, en el ratón, la interleucina 4 (IL-4) induce el cambio a IgG1, TGF- $\beta$  (transforming growth factor) induce el cambio a IgG2b; estas citocinas son producidas por células de tipo TH2. En cuanto a las células TH1 respecta, el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) participa en el cambio de isotipo a IgG2a e IgG3.

De manera tal que, podemos decir que tenemos una respuesta combinada de tipo Th1 y TH2.

---

Estos resultados en cierta medida los podemos esperar porque al ser el virus vegetal una partícula proteica de relación filogenéticamente distante, de gran volumen y altamente organizada, su reconocimiento por parte del sistema inmune se ve favorecido. Sin embargo, es necesario saber el por qué de esa respuesta sostenida que no es común para los demás antígenos de naturaleza proteica.

Como punto de referencia para comparar al PapMV tenemos algunos otros modelos de agentes acarreadores de péptidos que emplean virus vegetales tales como el virus de mosaico del tabaco (TMV), el virus de mosaico del ejote (CPMV). En estos modelos se ha observado que hay una elevada producción de anticuerpos tipo IgG dentro de los 7 a 10 días (en promedio) posteriores a la primera inmunización y de manera general, para el CPMV se hace evidente una polarización en la respuesta de tipo TH1, aunque esto varíe dependiendo del antígeno acoplado a la partícula viral, así vemos que en algunos casos también existe una respuesta combinada TH1-TH2 siendo predominante de todas formas la respuesta de tipo TH1.

Para el TMV no se reporta si hubo cambio de isotipo, pero sí se menciona en los trabajos publicados que hay generación de anticuerpos neutralizantes.

~~~~~

Cabe mencionar que para la generación de las respuestas reportadas para estos virus se utilizó el adyuvante de Freund tanto el completo como el incompleto así como el QuilA. Además de que se realizan hasta cuatro refuerzos a los ratones inmunizados con las diferentes quimeras y la cantidad de antígeno que se administra es del doble en comparación con la empleada con PapMV.

Por otro lado, nosotros consideramos que el PapMV puede ser empleado como agente adyuvante además de fungir como un sistema acarreador de antígeno porque sólo realizamos una inmunización en ausencia de adyuvante y la respuesta que observamos es muy elevada y con una duración de más de la mitad de la vida promedio de los ratones, éste es un comportamiento diferente a la respuesta de anticuerpos producida por la mayoría de los antígenos.

Al evaluar si el virus de mosaico de la papaya (PapMV) puede funcionar como un agente adyuvante encontramos que, efectivamente lo podemos considerar como tal y que la respuesta generada contra el antígeno de prueba (ovalbúmina) sigue el mismo perfil, es decir, existe mayor producción de IgG1. Comparando los títulos de anticuerpos con respecto a la inmunización de OVA sola encontramos un aumento considerable cuando se inmunizan juntos el PapMV y OVA.

A nivel estructural, se observan diferencias notables en cuanto al tamaño de las partículas virales, el CPMV tiene un diámetro de 28 nm, el TMV tiene un tamaño de 300 nm de largo por 18 nm de ancho y el PapMV tiene una largo de 530 nm.

Asimismo, estos tres virus vegetales tienen diferente número de subunidades proteicas en su envoltura. El CPMV posee 60 subunidades al igual que TMV y el PapMV tiene 180 subunidades proteicas en su cápside.

Las características antes mencionadas sugieren que la respuesta inmune observada ante el estímulo por el PapMV es más elevada que para los otros dos virus debido a su tamaño y al acomodo de 180 subunidades proteicas iguales en su cápside, lo cual le confiere una capacidad inmunogénica mayor, dado al incremento de epitopos expuestos.

El PapMV resultó un buen adyuvante porque además de potenciar la respuesta inmune del antígeno en cuestión, los ratones inmunizados con el virus no presentaron manifestaciones de efectos secundarios tales como fiebre o edema en la zona de aplicación en el caso de la administración subcutánea. Además, por vía parenteral no existe diferencia significativa en la respuesta montada contra este virus.

El PapMV podría funcionar como acarreador de péptidos heterólogos porque se ha demostrado que es un excelente inmunógeno y es de esperarse que al expresar péptidos heterólogos en su superficie se genere una respuesta inmune más eficiente contra dichos péptidos debido a que se vería incrementada la organización de dichos antígenos, además de que encontraría presentado de manera repetida y con esto se vería favorecida la inducción de protección y de una respuesta de larga duración.

Así, este virus nos ofrece grandes ventajas con respecto a los otros modelos tanto de agentes acarreadores como de adyuvantes como son:

Ventajas con respecto a otros agentes acarreadores:

1. Requiere una dosis baja de antígeno.
2. Sólo se realiza una administración del antígeno
3. Es estable a temperatura ambiente
4. En el caso de los virus recombinantes, se elimina el riesgo de generar la enfermedad cuando el individuo inmunizado se comprometa inmunológicamente (caso de las vacunas a base de microorganismos vivos atenuados).
5. Presenta de manera organizada y altamente repetitiva al antígeno de interés promoviendo su detección por parte del sistema inmune.
6. No se requiere administrar junto con un adyuvante.

Ventajas con respecto a los adyuvantes conocidos:

1. **No hay manifestación de efecto secundarios asociados a su administración.**
2. **No induce inflamación al momento de la aplicación.**
3. **Una dosis baja de virus es suficiente para la estimulación del sistema inmune.**
4. **Además de funcionar como adyuvante tiene como función acarrear al péptido de interés.**

IX. Conclusiones.

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos muestran que el virus de mosaico de la papaya (PapMV) es un excelente agente inmunogénico y adyuvante.

El PapMV es un buen candidato como acarreador de péptidos heterólogos, por lo que esta tecnología podría representar una nueva alternativa para el desarrollo de vacunas y una alternativa para mejorar las ya existentes.

X. Bibliografia

- 1 Janeway, CA. Bottomly, K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell*, 1994;76;275-285.
- 2 Borek, F. (ed.) (1972) Immunogenicity. North Holland Publishing Co, Amsterdam.
- 3 Crumpton M (1974) Protein antigens: the molecular bases og antigenicity and immunogenicity. In *The Antigens*, Vol. II (ed. M. Sela), p.1. Academic Press, New York.
- 4 Crumpton M (1974) Protein antigens: the molecular bases og antigenicity and immunogenicity. In *The Antigens*, Vol. II (ed. M. Sela), p.1. Academic Press, New York.
- 5 Hakomori S Kobata A (1974) Blood group antigens. In *The Antigens*, Vol. II (ed. M. Sela), p.79. Academic Press, New York.
- 6 Jann K Westphal O (1975) Microbial polysaccharides. In *The Antigens*, Vol. III (ed. M. Sela), p.1. Academic Press, New York.
- 7 Alving CR (1977) Immune reactions of lipids and lipid model membranes. In *The Antigens*, Vol. II (ed. M. Sela), p.1. Academic Press, New York.

-
- 8 Crumpton M (1974) Protein antigens: the molecular bases of antigenicity and immunogenicity. In *The Antigens*, Vol. II (ed. M. Sela), p.1. Academic Press, New York.
- 9 Paul, William. Fundamental Immunology. 4a. ed. Lippincott-Raven Publishers. 1999. Cap. 7, 12, 14, 15, 16, 19, 24, 26.
- 10 Hoffman Phylogenetics
- 11 Austyn JM, Wood KJ. Principles of cellular and molecular Immunology. Oxford University Press. 1993.
- 12 Abbas, Abul. Andrew Lichtman. Cellular and Molecular Immunology 4a. ed. Saunders Co. 2000. Cap. 3, 8, 9, 12,13, 14.
- 13 Sela M. (1966) Immunological studies with synthetic polypeptides. *Adv. Immunol.* 5, 29.
- 14 Sela, M. (1969) Antigenicity: some molecular aspects. *Science* 166, 1365.
- 15 Janeway, Charles. Paul Travers *et al.* Immunobiology 5a. ed. Garland Publishing. 2001. Cap.1,2, 8, 9, 10, 14.
- 16 Zinkernagel RM, Ehl, S, Aichele, P et al Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol. Rev.* 1997;156;199-209..

-
- 17 du Pasquier L. And M. Flajnik. Origin and evolution of the vertebrate immune system. In WE Paul (ed) Fundamental Immunology. 4a. Ed. Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia; 1999, pp 605-650.
- 18 Janeway CA Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 541-13.
- 19 Janeway Ca Jr, Medzhitov R. 2002 Innate immune recognition Annu. Rev. Immunol. 20; 197-216.
- 20 Medzhitov, R. Et al (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature; 388; 394-397
- 21 Takeuchi, O et al (1999) Differential roles of TLR2 and TL4 in recognition of Gram negative and Gram positive bacterial cell wall compoentes. Immunity II; 443-451.
- 22 Brightbill HD et al (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins though Toll-like receptor. Science; 285; 732-736.
- 23 Poltorak K et al (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science;282; 2085-2088
- 24 Kurt-Jones, Ea et al (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. Nat. Immunol; I; 398-401.
- 25 Hayashi, F et al (2001) The innate immune respnse to bacterial flagellin is mediated by Toll like receptor 5 Nature;410; 1099-1103

-
- 26 Hemmi, H et al (2000) A toll- like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*; 408; 740-745.
- 27 Sen, GC. Lengyel P; the interferon system. A bird's eye view of its biochemistry *J. Biol. Chem*;1992;267;5017-5020.
- 28 Liu Y, Janeway Ca Jr: cells that present both specific ligan and costimulatory activity abd the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1992;89;3845-3849
- 29 M Croft, L Carter, SL Swain, and RW Dutton. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles *J. Exp. Med.* 1994 180: 1715-1728.
- 30 Finkelman, FD, Holmes, J. Katona IM et al. lymphocine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.* 1990;8;303-333.
- 31 Medzhitov R and Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol*; 1997;9; 4-9
- 32 Lanzavecchia, A. And Sallisto F (2000) Dynamics of T-lymphocyte responses: intermediates, effectors and memory cells. *Science*:290;92-97.
- 33 Mosman, TR and Coffman RL. *Annu. Rev. Immunol.* 7; 145-173 (1989)
- 34 Bottomly K *Immunol. Today*,9; 268-274;(1988)
- 35 Coffman RL Lebman DA Rothman P *Adv. Immunol*;54;229-270;(1993)

-
- 36 Croft M and Swain SL J Immunol; 1995;154;4269-4281
- 37 Brestchen PA Wei G Menon J. science;1992;257;1579-1584
- 38 Hosken NA Shibuya K Heath AW J Exp Med ;1995;182;1579-12584
- 39 Lenschow DJ Wakinas TL Annu Rev Immunol;1996;378;617-620
- 40 Grewal LS Xu J Flavell RA Nature;1995;378;617-620
- 41 Lanzavecchia, A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II- restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1988;8;773-793.
- 42 Baumgarth, N. A two-phase model of B-cell activation. *Immunol. Rev.*2000;176;171-180.
- 43 Bachmann Mf, Zinkernagel RM. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu. Rev. Immunol* 1997;15;235-270.
- 44 Bachmann MF, Hoffmann RU, Kundig TM et al. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 1996;262;1448-1451.
- 45 Dubois B et al. Critical role of IL-12 to dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol* 1998;161;2223-2231.
- 46 Berney, C. Herren, S. Kosco-Vilbois MH A member of the dendritic cell family that enters B cell follicles and stimulates primary antibody responses identified by a mouse receptor fusion protein. *J. Exp. Med* 1999;190;851-860.

- 47 MacPherson G, Kushnir, N Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunol. Rev.* 1999;171;325-334.
- 48 Hodgkin PD, Lee JH, Lyons AB. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J. Exp. Med.* 1996;184;277-281.
- 49 Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol. Rev.* 1996;153;85-106.
- 50 Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 1993;11;331-360.
- 51 Harris NL, Ronchese R. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol* 1999;77;304-311.
- 52 Favero J, Lafont V. Effector pathways regulating T cell activation. *Biochem Pharmacol* 1998;56;1539-1547.
- 53 Goodnow CC et al. Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv Immunol* 1995;59;279-368.
- 54 Garside P, Ingulli E, et al Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science*;1998;281;96-99.
- 55 MacLennan IC, Gray D. Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunol. Rev* 1988;91;61-85.
- 56 Slifka MK, Ahmed R. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr. Opin. Immunol.* 1998;10;252-258.

- 57 Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996;272;54-60.
- 58 Przylepa J Himes C, Kelsoe G. Lymphocyte development and selection in germinal centers. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;229;85-104.
- 59 McHeizer-Williams MG. Immune response decisions at the single cell level. *Semin Immunol.* 1997 Aug;9(4):219-27. Review.
- 60 Lam KP, Kuhn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell.* 1997 Sep 19;90(6):1073-83.
- 61 Garside P, Ingulli E, Merica RR et al. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science.* 1998 Jul 3;281(5373):96-9.
- 62 Borriello F, Sethna MP, Boyd SD et al. 7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 1997 Mar;6(3):303-13.
- 63 Cerutti A, Schaffer A, Shah S et al. CD30 is a CD40-inducible molecule that negatively regulates CD40-mediated immunoglobulin class switching in non-antigen-selected human B cells. *Immunity.* 1998 Aug;9(2):247-56.
- 64 Sallusto, F Lenig, D et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*;1999;401(6754)708-712
- 65 Mäkelä, H. Vaccines, coming of age after 200 years. *FEMS Microbiology Reviews* 24 (2000); 9-20 .

-
- 66 O'Hagan, D. Vaccine adjuvants. Preparation methods and research protocols. Humana Press. 2000.
- 67 Ramon, G. (1925) Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull. Soc. Cent. Med. Vet.*; 101, 227-234.
- 68 Gregoriadis, G. Allison, A C. (1974) Entrapment of proteins in liposomes prevents allergic reactions in preimmunised mice. *FEBS Lett* 45, 71-74.
- 69 Alving, C R (1991) Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *Immunol. Meth.* 140, 1-13
- 70 Gregoriadis, G. (1990) Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today* 11, 89-97.
- 71 Morein, B. Sundquist, B. et al. (1984) ISCOM, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*. 308, 457-460.
- 72 Lövgren B, Sjölander, A. (1996) Adjuvant activities of ISCOMs and ISCOM matrix: two different formulations of Quiljaja saponin and antigen. *Vaccine* 14, 753-760.
- 73 O'Hagan DT et al *Biomolecular Engineering* 18;2001;69-86
- 74 Schneider, J Gilbert, S C. et al. (1998) Enhanced immunogenicity for CD8⁺ T cell induction and complete protective efficacy of amalaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus *Ankara Nat. Med* 4, 397-402.

75 Durrani Z, McInerney TL, McLain L, et al: Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *J Immunol Methods* 1998: 220 (1-2):93-103

76 Brennan FR, Gilleland LB, Staczek J, et al: A chimaeric plant virus vaccine protects mice against a bacterial infection. *Microbiology* 1999: 145 (Pt 8)():2061-2067

77 Brennan FR, Jones TD, Gilleland LB, et al: Pseudomonas aeruginosa outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. *Microbiology* 1999: 145 (Pt 1)():211-220

78 Langeveld JP, Brennan FR, Martinez-Torrecuadrada JL, et al: Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus. *Vaccine* 2001: 19 (27):3661-3670

79 Nicholas BL, Brennan FR, Martinez-Torrecuadrada JL, et al: Characterization of the immune response to canine parvovirus induced by vaccination with chimaeric plant viruses. *Vaccine* 2002: 20 (21-22):2727-2734

80 Brennan FR, Jones TD, Longstaff M, et al: Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses. *Vaccine* 1999: 17 (15-16):1846-1857

81 Brennan FR, Bellaby T, Helliwell SM, et al: Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune responses in mice. *J Virol* 1999: 73 (2):930-938

82 Gilleland H.E, Gilleland L. B. *et. al.* Chimeric animal and plant viruses expressing epitopes of outer membrane protein F as a combined vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Immunol and Medical Medicine* 2000:27 (291-297)

83 Koo M, Bendahmane M, Lettieri GA, *et al*: Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (14):7774-7779

84 Olson AJ, Bricogne G, Harrison SC: Structure of tomato bushy stunt virus IV. The virus particle at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol* 1983; 171 (1):61-93

85 Joelson T, Akerblom L, Oxelfelt P, *et al*: Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 6):1213-1217

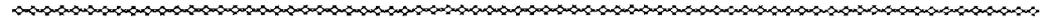
86 Sit TL, Leclerc D, AbouHaidar MG. The minimal 5' sequence for in vitro initiation of papaya mosaic potexvirus assembly. *Virology* 1994 Feb 15;199(1):238-42

87 Zhang H, Todderud E, Stubbs G. Crystallization and preliminary X-ray analysis of papaya mosaic virus coat protein. *J Mol Biol* 1993 Dec 5;234(3):885-7

88 Verde C, Malorni A, Parente A. The primary structure of papaya mosaic virus coat protein: a revision. *J Protein Chem* 1989 Dec;8(6):795-805

89 Sit TL, Abouhaidar MG, Holy S. Nucleotide sequence of papaya mosaic virus RNA. *J Gen Virol* 1989 Sep;70 (Pt 9):2325-31

90 Erickson JW, Bancroft JB. The assembly of papaya mosaic virus coat protein with DNA. *Prog Clin Biol Res* 1980;40:293-300



- 91 Abouhaidar M, Bancroft JB. The initiation of papaya mosaic virus assembly. *Virology* 1978 Oct 1;90(1):54-9
- 92 Beachy RN, Fitchen JH, Hein MB: Use of plant viruses for delivery of vaccine epitopes. *Ann N Y Acad Sci* 1996: 792 ():43-49
- 93 Brennan FR, Gilleland LB, Staczek J, et al: A chimaeric plant virus vaccine protects mice against a bacterial infection. *Microbiology* 1999: 145 (Pt 8) ():2061-2067
- 94 Castañón S, Marin MS, Martín-Alonso JM, et al: Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 1999: 73 (5):4452-4455
- 95 Fehr T, Bachmann MF, Bucher E, et al: Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies. *J Exp Med* 1997: 185 (10):1785-1792
- 96 Fitchen J, Beachy RN, Hein MB: Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine* 1995: 13 (12):1051-1057
- 97 Hilleman MR: Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine* 2000: 18 (15):1436-1447
- 98 Hudson AW and Ploegh HL: The cell biology of antigen presentation. *Exp Cell Res* 2002: 272 (1):1-7
- 99 Koo M, Bendahmane M, Lettieri GA, et al: Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration

of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (14):7774-7779

100 Ludewig B, Ehl S, Karrer U, et al: Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity. *J Virol* 1998; 72 (5):3812-3818

101 Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, et al: Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2001; 75 (18):8434-8439

102 McInerney TL, Brennan FR, Jones TD, et al: Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide. *Vaccine* 1999; 17 (11-12):1359-1368

103 Meloen RH, Hamilton WD, Casal JI, et al: Edible vaccines. *Vet Q* 1998; 20 Suppl 3 ():S92-S95

104 Nicholas BL, Brennan FR, Martinez-Torrecedradora JL, et al: Characterization of the immune response to canine parvovirus induced by vaccination with chimaeric plant viruses. *Vaccine* 2002; 20 (21-22):2727-2734

105 Ochsenein AF and Zinkernagel RM: Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 2000; 21 (12):624-630

106 Gregoriadis, G. (1990) Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today* 11, 89-97.