

00322

42



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA EN LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLOGA
PRESENTA:
ILSE DELINT RAMIREZ

DIRECTOR: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
CODIRECTORA: ARMIDA BAEZ SALDAÑA



MEXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2003

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

PAGINACION DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Efecto de la deficiencia de Biotina en la respuesta Inmune Humoral"

realizado por Ilse Delint Ramírez

con número de cuenta 09855784-8 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Enrique Ortega Soto

Codirector de Tesis

Propietario Dra. Armida Báez Saldaña

Propietario Dra. Luz María López Marín

Suplente Dr. Julio César Carrero Sánchez

Suplente Dra. Isabel Soto Cruz

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

2

Este trabajo fue dirigido por el Dr. Enrique Ortega Soto, y la Dra. Armida Báez Saldaña con asesoría técnica de la M en IBB Claudia Angélica Garay Canales y realizado en el departamento de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

Se realizó con el apoyo del proyecto de DGAPA-UNAM, PAPIIT IN213701 y el proyecto 31783-N de CONACYT, México

El jurado designado para este examen esta compuesto por:

Dr. Enrique Ortega Soto

Dra. Armida Báez Saldaña

Dr. Julio César Carrero Sánchez

Dra. Luz María López Marín

Dra. Isabel Soto Cruz

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Enrique Ortega Soto por todas sus enseñanzas especialmente por mostrarme la forma de analizar problemas científicos.

A la Dra. Armida Báez Saldaña por su apoyo en el trabajo de laboratorio y enseñanzas sobre la linda biotina.

A mis sinodales Julio Cesar Carrero, Luz María López, e Isabel Soto por sus valiosas observaciones sobre esta tesis.

A Claudia Garay por su apoyo como técnica académica del laboratorio y por enseñarme varios métodos utilizadas en la realización de esta tesis y también a todos los compañeros del laboratorio Esteban, Halall, Paula, José, Linda, Ana, Daniel y Paola, por su apoyo técnico y por hacer más agradable la estancia en el laboratorio.

A los compañeros del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su accesoria en el manejo de los ratones.

Agradezco principalmente a mis padres y abuelos, a mi hermano y a mis otros hermanos, también a todos mis primos y tíos por el apoyo que siempre me han dado y que me permitió lograr este objetivo, además de hacer mi vida tan feliz.

A todos mis amigos, especialmente a mis comadres Elizabeth, Vania y Karla por su ayuda durante la carrera y por hacer la vida tan divertida.

A mis maestros de la Facultad de Ciencias por mostrarme el maravilloso mundo de la Biología.

**DEDICO ESTE TRABAJO A MI FAMILIA,
PRINCIPALMENTE A MI MADRE Y MI ABUELO,
A QUIENES LES DEBO TODO LO QUE SOY
Y TODO LO QUE TENGO.**

RESUMEN

La biotina es una vitamina que funciona como cofactor de varias enzimas que catalizan carboxilación, transcarboxilación, o decarboxilación en diversos procesos metabólicos. Se sabe que la deficiencia de biotina afecta importantemente el funcionamiento del sistema inmune, por lo que se pensó que la deficiencia de biotina podría tener un efecto en la respuesta inmune humoral. Para probar esta hipótesis se indujo deficiencia de biotina en ratones Balb/cAnN administrándoles una dieta depletante de biotina basada en avidina (clara de huevo cruda) como fuente de proteína; también se utilizaron ratones alimentados con una dieta basada en avidina pero suplementada con una cantidad de biotina mayor a la que puede capturar la avidina de la dieta; y ratones control, alimentados con otro tipo de proteína no depletante. Estos grupos fueron inoculados con antígenos T-dependientes (DNP-KLH) y T-independientes tipo I (TNP-LPS) y tipo II (TNP-FICOL) a diferentes tiempos, se determinaron anticuerpos en suero de los isotipos IgM, IgG, e IgA específicos contra los antígenos y la concentración de anticuerpos totales es decir no específicos. La respuesta contra antígenos T-dependientes y T-independientes de los ratones deficientes fue similar a la de los ratones control. Sin embargo los ratones alimentados con la dieta suplementada. En algunos tiempos presentaron menor cantidad de anticuerpos del isotipo IgA específicos para los antígenos T-independientes $p < 0.01$. También se observó una concentración de IgG total mayor en los ratones deficientes que los ratones suficientes y controles $p < 0.01$. No se observaron diferencias significativas en la concentración de IgM e IgA total.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Interacción antígeno anticuerpo	6
Funciones de los anticuerpos	7
Respuesta T-dependiente y T-independiente	10
Antígenos T-dependientes tipo 1	12
Antígenos T-dependientes tipo 2	17
Antecedentes	24
Biotina	24
Antagonistas de la biotina	25
Carboxilasas	26
Ciclo de la biotina	29
Otras funciones de la biotina	32
Indicadores de deficiencia de biotina	32
Efecto de la biotina en el sistema inmunológico	34
Justificación	41
Hipótesis	42
Objetivos	42
Métodos	43
Resultados	46
I - Efecto de la Biotina sobre el peso de los ratones	46
II - Producción de anticuerpos contra el antígeno T-dependiente DNP-KLH	49
III -Producción de anticuerpos contra un antígeno T-independiente 1 (TNP-LPS)	52
IV- Producción de anticuerpos contra el antígeno T-independiente 2 (TNP-FICOL)	55
V- Concentración total de anticuerpos	61
Discusión	63
Bibliografía	70

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de defensa de los organismos contra agentes patógenos se hallan prácticamente presentes en todos los *phyla* de animales. Sin embargo los vertebrados han desarrollado mecanismos de defensa con mayor especialización y capacidad de discriminación que constituyen la inmunidad específica, también llamada adaptativa (Hoffmann et al 1999). Tales mecanismos se inician tras la exposición a sustancias extrañas al organismo, a las que se denomina antígenos. Entre las características de la inmunidad específica se encuentran su alta especificidad para discriminar moléculas diferentes y su capacidad para “recordar” y responder con mayor intensidad a exposiciones repetidas al mismo estímulo. Los componentes de la inmunidad específica son los linfocitos y sus productos, entre los cuales están los anticuerpos. Las respuestas inmunitarias específicas se clasifican en dos tipos, según el componente celular o humoral del sistema inmunitario que participa. En la inmunidad celular participan células llamadas linfocitos. Este tipo de inmunidad puede ser transferida de individuos inmunizados a individuos no inmunizados a través de linfocitos pero no de plasma o suero. En la inmunidad humoral participan moléculas de la sangre que son las responsables de reconocer a los antígenos; estas moléculas se llaman anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser transferidos a individuos no estimulados a través de productos sanguíneos libres de células, es decir plasma o suero (Abbas et al 1999).

Todos los anticuerpos están compuestos de dos cadenas ligeras idénticas, cada una de aproximadamente 25-30 kD y dos cadenas pesadas idénticas de 55 a 70 kD. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada y las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Tanto las cadenas ligeras como las cadenas pesadas contienen series de unidades homólogas repetidas, cada una de unos 110 aminoácidos, que se pliegan independientemente en un motivo globular común de aproximadamente 12 kD llamado dominio de inmunoglobulina (Ig). Todos los dominios de inmunoglobulina contienen dos capas de hojas con un plegamiento β ; cada una de estas capas está formada por tres o cuatro hebras de cadenas polipeptídicas antiparalelas. Algunos dominios de la Ig, como aquellos que están presentes en las regiones variables, tienen una hebra extra en cada una de las dos capas. Muchas proteínas de importancia en el sistema inmunitario contienen regiones que usan el mismo motivo estructural (Paul et al 2000).

Existen más de 10^7 , probablemente hasta 10^9 , anticuerpos estructuralmente diferentes en cada individuo, cada uno con secuencias de aminoácidos únicas en los sitios de unión al antígeno. Esta extraordinaria diversidad de estructuras explica la asombrosa especificidad de los anticuerpos por los antígenos, ya que cada aminoácido diferente puede ser responsable de una distinta unión al antígeno. Esta diversidad está casi totalmente restringida a los dominios de Ig del amino terminal de las cadenas pesadas y ligeras. A estos dominios se les llama regiones variables mientras que a los dominios más conservados se les llama dominios constantes. Los tres tramos más divergentes dentro de los dominios variables se denominan regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR), las cuales se encuentran flanqueadas por regiones más conservadas que contribuyen a la estructura del dominio. En una inmunoglobulina las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las de una cadena pesada forman la superficie de unión al antígeno (Figura 1) (Abbas et al 1999).

Cada cadena ligera se pliega en dos dominios de Ig cada uno de aproximadamente 110 aminoácidos: un dominio constante (C_L) y uno variable (V_L). Los dominios variables contienen las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3 (Abbas et al 1999).

Con base en características estructurales de las cadenas pesadas los anticuerpos pueden agruparse en un número reducido de isotipos y subclases distintas. Todos los anticuerpos de un isotipo comparten grandes regiones de secuencias de aminoácidos idénticas que les diferencian de los anticuerpos que pertenecen a otros isotipos. Tanto en ratones como en humanos existen 5 isotipos, llamados IgA, IgG, IgE, IgM e IgD. En el humano los anticuerpos del isotipo IgA se dividen en dos subtipos llamados IgA1 e IgA2, mientras que los anticuerpos del isotipo IgG se subdividen en IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En los ratones los subtipos de IgG son distintos: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. No existe correspondencia entre los subtipos murinos y los humanos (Abbas et al 1999).

Las secuencias de aminoácidos compartidas en las cadenas pesada son responsables tanto de muchas características y propiedades comunes a los anticuerpos del mismo isotipo como de la capacidad para unirse a ciertos receptores de superficie celular u otras macromoléculas como el complemento y así activar ciertas funciones efectoras inmunitarias. Es decir, las distintas funciones efectoras de los anticuerpos son mediadas por diferentes isotipos. Las cadenas pesadas se designan por las letras del alfabeto griego según corresponda al isotipo general del anticuerpo; los anticuerpos IgA contienen cadenas pesadas α ; los del isotipo IgG, cadenas γ ; los anticuerpos IgE, cadenas ϵ ; los anticuerpos IgM, cadenas μ y los IgD, cadenas δ (Paul et al 2000).

Como las cadenas ligeras, las cadenas pesadas poseen un dominio variable (V_H) en donde se encuentran las tres regiones hipervariables (CDR1, CDR2 y CDR3). El resto de la cadena pesada que forma la región constante es diferente entre los distintos isotipos; sin embargo, es muy semejante entre los miembros de un isotipo particular. En los anticuerpos del isotipo IgM e IgE, la región constante se pliega para formar cuatro dominios de Ig. En los anticuerpos IgG, IgA e IgD, las regiones constantes más pequeñas forman tres dominios de Ig (en el ratón la cadena γ del isotipo IgG ha sufrido una delección tal que la región constante sólo forma dos dominios de Ig). Estos dominios se designan como C_H y se numeran secuencialmente desde el extremo amino terminal hacia el carboxilo terminal (Abbas et al 2000).

Todas las cadenas pesadas se pueden expresar en forma secretada o en forma asociada a la membrana celular, lo cual depende de la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo terminal del último dominio C_H (Abbas et al 1999).

Las formas secretadas de las cadenas pesadas μ , α y δ , pero no las cadenas γ ni ϵ , tienen secuencias adicionales no globulares en el extremo carboxilo terminal del último dominio C_H . Estas extensiones se llaman fragmentos terminales y contribuyen a las interacciones intermoleculares que dan como resultado la formación de moléculas de Ig multiméricas; la IgM forma pentámeros y la IgA puede formar dímeros. La IgM y la IgA multiméricas también contienen un polipéptido adicional de 15 kD codificado por un gen diferente llamado cadena de unión J, que está unido por puentes disulfuro a los fragmentos terminales estabilizando así el multímero (Abbas et al 1999). Se conoce poco sobre la forma circulante de IgD, porque normalmente está presente en la sangre en cantidades muy pequeñas.

Todas las cadenas pesadas son característicamente N-glicosiladas, en donde el polipéptido contiene oligosacáridos unidos a residuos de asparagina. La localización de los oligosacáridos puede variar en los diferentes isotipos de Ig, la composición exacta no está determinada totalmente por la secuencia polipeptídica ya que puede variar con el estado fisiológico del hospedero en el momento de la síntesis del anticuerpo (Figura 1).

Como cada molécula de Ig posee al menos dos sitios de unión al antígeno, cada uno formado por un par de dominios V_H y V_L , muchas moléculas de Ig pueden orientar estos sitios de unión de forma que se puedan unir al mismo tiempo a dos antígenos situados sobre una superficie plana, esta flexibilidad la proporciona la región bisagra (Figura 1) (Abbas et al 1999).

La asociación entre las cadenas ligeras y pesadas implica tanto interacciones covalentes como no covalentes. Las interacciones covalentes son puentes disulfuro formados entre residuos de cisteína. La posición exacta de la cisteína de la cadena pesada que participa en la formación del

puente disulfuro con la cadena ligera varía según el isotipo. Las interacciones no covalentes consisten principalmente en interacciones hidrofóbicas entre los dominios V_L y V_H y entre el dominio C_L y el C_H1 . Esta asociación de los dominios V_L y V_H produce una aposición espacial tal que ambos dominios V pueden contribuir simultáneamente a la unión del antígeno. Las cadenas pesadas están unidas entre sí también por interacciones covalentes y no covalentes. Las cadenas pesadas forman un número variable de puentes disulfuro intercatenarios cerca de la región carboxilo terminal de la bisagra (Figura 1).

La enzima proteolítica papaina corta preferentemente las moléculas de IgG en tres fragmentos, dos de los cuales son idénticos y constan de una cadena ligera intacta asociada con un fragmento V_H - $C\gamma1$ de la cadena pesada. Estos fragmentos conservan la capacidad para unir el antígeno, función de los dominios V_L y V_H y se denomina por lo tanto Fab (por sus siglas en inglés Fragment antigen-binding). El tercer fragmento de la cadena pesada contiene los dominios $C\gamma2$ y $C\gamma3$. Esta parte de la IgG tiene tendencia a autoasociarse y a cristalizar, por consiguiente se le llama Fc (Fragment crystalline). Debido a que la formación del cristal depende de la uniformidad de la estructura, la capacidad de las regiones Fc para formar cristales refleja la presencia de secuencias de aminoácidos comunes en los dominios $C\gamma2$ y $C\gamma3$ compartidos por todos los anticuerpos del mismo subtipo. Como se mencionó anteriormente, muchas de las funciones efectoras de las inmunoglobulinas están mediadas por la región Fc de la molécula (Paul et al 2000).

Estos experimentos sobre proteólisis de la molécula de IgG proporcionaron las primeras evidencias de que estas moléculas de Ig mantienen separadas en el espacio la función efectora y la de reconocimiento; ya que las regiones variables "V" de las cadenas pesadas y ligeras se encargan del reconocimiento del antígeno las regiones constantes "C" de las cadenas pesadas son responsables de iniciar las funciones efectoras (Abbas et al 1999).

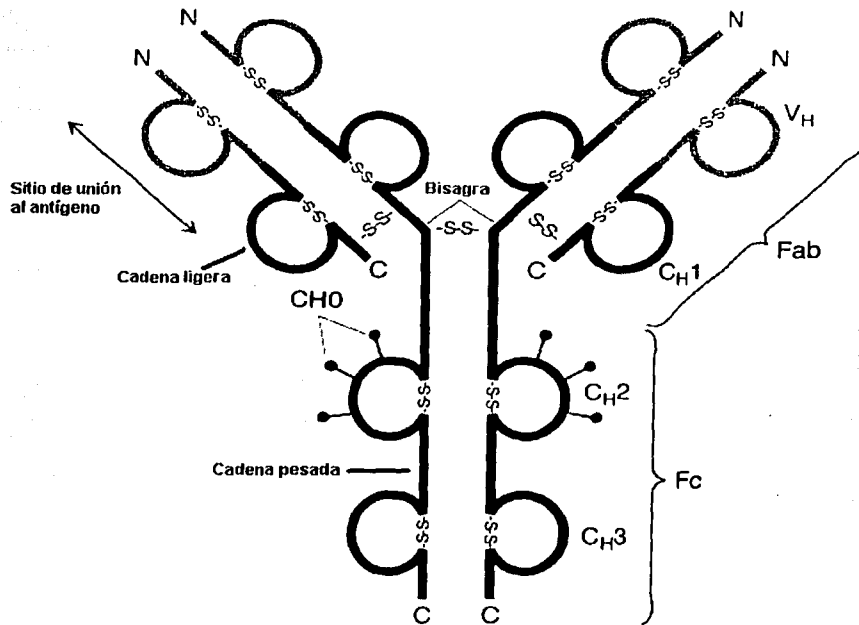


Figura 1. Diagrama esquemático de una molécula de inmunoglobulina. Los sitios de unión al antígeno están formados por los dominios V_L y V_H . Los -S-S- se refieren a puentes disulfuro intercatenarios e intracatenarios; N y C hacen referencia a los extremos amino y carboxilo terminal de las cadenas polipeptídicas, respectivamente; CHO representa grupo carboxilo.

Interacción antígeno-anticuerpo

Un antígeno se define como cualquier molécula capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o a un receptor de las células T (linfocitos que maduran en el timo). Prácticamente cualquier clase de molécula biológica puede ser antígeno, incluyendo metabolitos intermedios, azúcares, lípidos y hormonas, así como macromoléculas del tipo de hidratos de carbono complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Sin embargo, sólo las macromoléculas pueden iniciar la activación linfocitaria necesaria para producir anticuerpos. Las moléculas que originan respuestas inmunitarias se llaman inmunógenos. Para obtener anticuerpos específicos para moléculas pequeñas es necesario acoplarlas a macromoléculas antes de la inmunización. En este sistema, la molécula pequeña se llama hapteno y la macromolécula se llama transportador, este complejo actúa como inmunógeno (Abbas et al 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La región del antígeno que reconoce el anticuerpo se denomina determinante antigénico o epítope. Se puede decir que un hapteno es un determinante exógeno que está unido a una macromolécula. Las macromoléculas contienen típicamente varios epítopes lo que se conoce como multivalencia o polivalencia. En el caso de los polisacáridos, proteínas multiméricas y ácidos nucleicos, los epítopes idénticos pueden estar repartidos uniformemente. En el caso de los fosfolípidos o de los carbohidratos complejos, los determinantes antigénicos son definidos totalmente por la estructura tridimensional de las macromoléculas. Sin embargo, en el caso de los ácidos nucleicos y de las proteínas pueden estar determinados por la secuencia lineal. Se estima que en un antígeno el tamaño del determinante lineal que establece contacto directo con un anticuerpo específico tiene una longitud de unos ocho aminoácidos. (Abbas et al 1999).

El reconocimiento del antígeno por el anticuerpo implica un enlace reversible y no covalente. La fuerza del enlace entre el sitio de combinación de un anticuerpo y un antígeno monovalente recibe el nombre de afinidad de la interacción y puede determinarse experimentalmente. Esta afinidad se expresa habitualmente por una constante de disociación (K_d) que representa la concentración del antígeno necesaria para ocupar la mitad de los lugares de combinación del anticuerpo en solución. La K_d de los anticuerpos específicos para antígenos naturales oscila entre 10^{-7} y 10^{-10} M. En el suero hay una mezcla de estos anticuerpos con distinta afinidad por antígenos específicos, lo cual depende de las secuencias de aminoácidos de las CDR. La afinidad media de las moléculas de anticuerpos en una población aumenta con las inmunizaciones repetidas, fenómeno que recibe el nombre de maduración de la afinidad. Las moléculas de IgG e IgE tienen dos sitios iguales de unión al antígeno, las moléculas de IgM son pentámeros por lo que presenta 10 sitios de unión al antígeno; mientras que la IgA al presentarse en forma de dímero presenta 4 sitios de unión. Aunque no varíe la afinidad de cada lugar de unión, la fuerza total de la unión debe tener en cuenta la interacción en cada uno de estos lugares, esta fuerza total recibe el nombre de avidéz y es mayor que la afinidad de un solo sitio. Matemáticamente, la fuerza de la avidéz aumenta casi geométricamente por cada lugar ocupado (Paul et al 2000).

Funciones de los anticuerpos

Muchas de las funciones de los anticuerpos están mediadas por sus porciones Fc y son específicas para cada isotipo o subtipo en particular. Esto sirve para dirigir la respuesta inmunitaria humoral a lo largo de diferentes vías anatómicas y funcionales, incluyendo las distintas interacciones con los mecanismos de la inmunidad innata y la inflamación.

La señal que inicia la proliferación y activación de las células B, es la unión del antígeno a formas de anticuerpos de membrana expresadas en la superficie de estas células. Los linfocitos B inmaduros expresan IgM, los linfocitos B maduros que no han sido estimulados pueden expresar IgM e IgD, y las células B de memoria, que han sido previamente estimuladas, pueden expresar cualquier isotipo. Estos anticuerpos de membrana se asocian a otras proteínas (Ig α e Ig β) las cuales son las encargadas de generar la señal cuando los anticuerpos son entrecruzados por el antígeno (Abbas et al 1999).

Muchos agentes agresores como toxinas, fármacos, virus, bacterias y otros parásitos, inician el daño celular uniéndose a receptores de superficie específicos. Los anticuerpos secretados pueden dificultar estéricamente esta interacción uniéndose a los determinantes antigénicos del agente agresor, neutralizando de esta forma el proceso tóxico o infeccioso (Ryan et al 2001).

Ciertos isotipos de anticuerpos humanos son capaces de activar el sistema del complemento a través de la vía clásica. Esta respuesta se dispara cuando una proteína del complemento llamada C1q se une a la región Cy2 de la IgG1 o IgG3 en humanos, o a la región C μ de los anticuerpos IgM que se encuentran formando inmunocomplejos, o en la superficie celular. En ratones, los subtipos de IgG que activan el complemento son el IgG2a e IgG2b (Abbas et al 1999).

La opsonización es otra función importante de los anticuerpos. Una partícula es opsonizada cuando es recubierta por moléculas de Ig que se unen a los antígenos que presenta la partícula. Tanto los fagocitos mononucleares como los neutrófilos expresan receptores que unen la porción Fc de las moléculas de IgG (Fc γ R), por lo que pueden reconocer a la partícula opsonizada, lo que sirve para incrementar la eficiencia de la fagocitosis y de la degradación intracelular de las partículas ingeridas. En muchos casos, la lisis celular que realizan los linfocitos T citolíticos y las células NK, requiere que la célula blanco se halle recubierta por una IgG específica. A este proceso se le llama citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En las células NK, la IgG realiza dos funciones: reconocimiento y activación. La función de reconocimiento consiste en que las células a las que se haya unido la IgG serán lisadas preferentemente con respecto a las que no la presentan. La activación se lleva a cabo por la agregación de los receptores para Fc sobre su membrana plasmática. La célula NK activada sintetiza y secreta citocinas, como TNF e IFN γ , las cuales al ser liberadas median funciones inflamatorias. Las proteínas de los gránulos de estas células activadas inducen la función citolítica en células blanco (Abbas et al 1999).

Las células cebadas y los basófilos expresan receptores de alta afinidad (FcεRI) para la porción Fc de las moléculas de IgE, los cuales se encuentran ocupados por IgE monomérica, una diferencia clave con los FcγRIII implicados en la ADCC. El encuentro con el antígeno provoca el entrecruzamiento de las moléculas de IgE ligadas a la superficie y sus receptores, lo que induce en las células cebadas o los basófilos la liberación de mediadores inflamatorios preformados y almacenados en los gránulos y por otra parte la síntesis *de novo* y secreción de mediadores lipídicos y citocinas. La consecuencia de la liberación de estos mediadores es una respuesta vascular e inflamatoria denominada hipersensibilidad inmediata (Wedmeyer et al 2000). Los eosinófilos llevan a cabo lisis contra parásitos como los helmintos mediada por IgE, que permite el reconocimiento y la activación de la célula efectora, a través de los FcεRI. Los eosinófilos también pueden utilizar IgA para realizar lisis a través de los receptores Fcα.

La IgA es el único isotipo de inmunoglobulina que puede ser transportada a través de las barreras mucosas hasta la luz de los órganos revestidos por ellas. Aunque la IgA constituye menos de una cuarta parte de los anticuerpos plasmáticos, en las mucosas de un individuo normal, la IgA se encuentra en mayor cantidad que cualquier otro isotipo. Esto se debe a que su síntesis ocurre principalmente en el tejido linfoide asociado a mucosas y es transportada de forma eficaz a la zona luminal de éstas. Las células epiteliales de órganos como el intestino expresan receptores Fc específicos para moléculas dimericas de IgA; los cuales reciben habitualmente el nombre de receptores de poli Ig o componente secretor. Inicialmente, el componente secretor se une a la IgA en la superficie basal de las células epiteliales en contacto con la sangre; la IgA ligada es transportada a través de la célula hasta la superficie luminal mediante vesículas. La IgA no es simplemente liberada, sino que el componente secretor es escindido específicamente dejando un componente peptídico unido a la molécula de IgA dimerica que se llama pieza secretora. Una vez en la mucosa, la IgA actúa neutralizando los agentes lesivos y dirigiendo la ADCC por células que expresan receptores Fcα (Ryan et al 2001).

Respuesta T-dependiente y T-independiente.

El sistema inmunitario posee la capacidad para responder a distintos tipos de antígenos produciendo diferentes clases de anticuerpos. Por ejemplo, la respuesta de anticuerpos frente a bacterias con cápsulas de polisacáridos es principalmente de tipo IgM que activa el sistema del complemento dando lugar a la opsonización y fagocitosis de las bacterias; la respuesta a muchos virus es mediada por anticuerpos IgG de alta afinidad que bloquean la entrada del virus en las células del hospedero y también facilitan la fagocitosis por macrófagos; o bien, la respuesta sistémica a muchos parásitos helmintos es principalmente a través de la IgE, la cual participa en la destrucción de los helmintos mediada por eosinófilos (Paul et al 2000).

La producción de las distintas clases de anticuerpos se inicia a través de la interacción de los antígenos con un pequeño número de linfocitos B maduros que expresan IgM e IgD específicas. Esta interacción se da principalmente en tejido linfóide periférico. El antígeno al unirse al receptor de las células B (BCR) de la superficie celular los entrecruza y pone en marcha una serie de respuestas que dan lugar a dos cambios principales: proliferación, resulta en la expansión de las clonas que presentan el receptor específico para el antígeno, y diferenciación, siempre y cuando estén presentes citocinas favorables, que produce la progenie de células B capaces de secretar anticuerpos de diferentes isotipos de cadena pesada, o bien da lugar a células de memoria (Abbas et al 1999).

Los antígenos que inducen una respuesta T-dependiente (TD) comúnmente son antígenos proteicos. Estos antígenos son presentados por una célula presentadora profesional (células especializadas en internalizar antígenos) a una población de linfocitos T llamados colaboradores (Th), los cuales son capaces de reconocerlos de manera específica por medio de su receptor para antígeno (TCR). Estos receptores, moléculas de membrana diferentes pero estructuralmente relacionadas con los anticuerpos reconocen sólo antígenos peptídicos unidos a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, las cuales son moléculas que se expresan en la membrana unidas a antígenos que previamente internalizó la célula presentadora. Como resultado, estas células T reconocen y responden a antígenos asociados a la superficie celular pero no a antígenos solubles. En respuesta a la estimulación antigénica la célula T prolifera e interacciona con linfocitos B por medio de ligando-receptor y hormonas proteicas llamadas citocinas que estimulan la secreción de anticuerpos por la célula B que previamente reconoció el mismo antígeno (Renshaw *et al* 1994).

Con la mayoría de los antígenos proteicos, las células B vírgenes requieren dos tipos de señales para su proliferación y diferenciación. Un tipo de señal la proporciona el antígeno al agregar a los receptores de la célula B. El segundo tipo de señal es suministrado por los linfocitos T colaboradores y sus productos secretados, por lo que a este tipo de antígenos se les conoce como T-dependientes o timo dependientes (TD) debido a que en organismos atómicos no inducen producción de anticuerpos. Existe otros tipos de antígenos que inducen proliferación y diferenciación de las células B de manera independiente de linfocitos T, por lo cual a estos antígenos se les denomina T-independientes o timo-independientes (TI), ya que son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos en individuos atómicos (Figura 2).

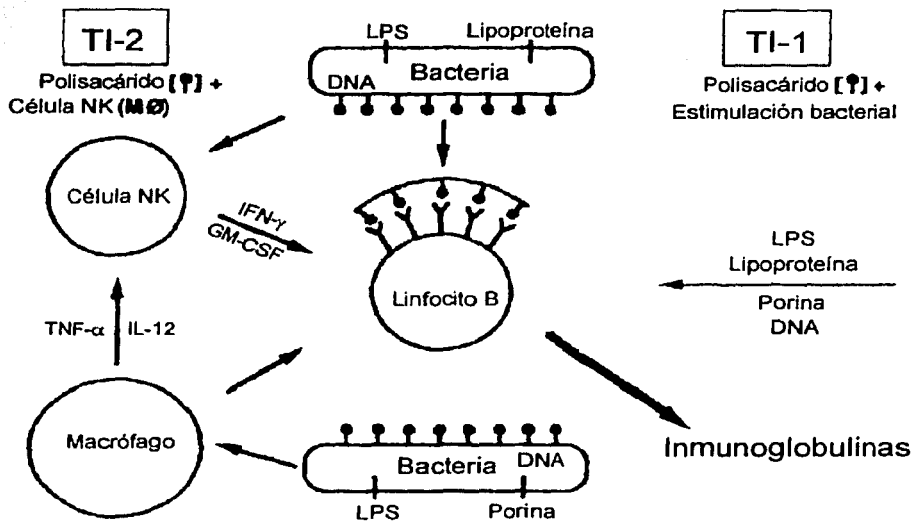


Figura 2. La activación de las células B por antígenos T-independientes se da mediante el entrecruzamiento multivalente de los receptores Ig de membrana por el antígeno, esta activación conduce a proliferación clonal. La secreción de anticuerpos solo ocurre cuando el linfocito B recibe una segunda señal en el caso de los antígenos TI-2 por parte de otros tipos celulares como células NK o macrófagos, que son activados por este tipo de antígenos y los inducen a secretar citocinas como $IFN-\gamma$ y GM-CSF, mientras que en el caso de los antígenos TI-1 esta segunda señal está dada por el mismo antígeno directamente sobre los linfocitos B.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Antígenos T-independiente tipo 1 (TI-1)

La mayoría de los patógenos poseen antígenos TI en su superficie. La respuesta de secreción de anticuerpos por una vía TI parece ser una forma simplificada que provee una respuesta protectora rápida comparada con una respuesta TD. Debido a que la producción de anticuerpos por este tipo de antígenos no está restringida a la presentación por las moléculas del MHC, la colaboración discriminadora entre lo propio y lo extraño de los linfocitos T está ausente (Abbas et al 1999). La respuesta TI se clasifica en T-independiente tipo 1 (TI-1) y T-independiente tipo 2 (TI-2).

Este tipo de antígenos en altas concentraciones tienen la propiedad de ser activadores policlonales de células B, es decir, son mitógenos no específicos de linfocitos B que conlleva a la secreción de anticuerpos no específicos para el antígeno (Snapper et al 1996, Medzhitov et al 1997). Los antígenos TI, tanto del tipo 1 como 2, son moléculas grandes compuestas de múltiples unidades repetidas, por lo que contienen múltiples epítopes antigénicos idénticos además de que persisten mucho tiempo en circulación. Estas características les permiten entrecruzar los receptores de membrana (BCR) y formar grupos de receptores altamente agregados lo cual resulta en una señal persistente que induce la proliferación de la célula B. Sin embargo, la naturaleza y la contribución de la señal proporcionada por antígenos TI-1 y TI-2 es diferente (Snapper et al 1996). Esto se puede ver en que la señalización producida por antígenos TI-1 es independiente de la cinasa de tirosina llamada Btk, mientras que la producida por antígenos TI-2 depende de esta cinasa (Snapper et al 1996, Fargarasan et al 2000, Mond et al 1995, Martin et al 2001, Zhang 1988, Vos et al 2000).

Muchos de los antígenos TI-1 son componentes de paredes bacterianas como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, lipoproteínas, porinas; siendo el LPS el mejor estudiado. A dosis menores a las necesarias para inducir activación policlonal, el LPS conjugado con el hapteno trinitrofenol (TNP-LPS) puede inducir secreción de anticuerpos específicos para el hapteno. La interpretación de este fenómeno es que en estas condiciones las células B específicas para el hapteno unen el antígeno a través de su BCR, lo que produce el entrecruzamiento de estos receptores en pocos grupos con alta densidad de receptores lo cual induce la activación primaria y la proliferación de la célula B. Esta captura del antígeno provee la concentración necesaria de LPS para unirse a los receptores policlonales para LPS de baja afinidad que presenta la célula B generando la señal secundaria que conduce a la secreción de anticuerpos (Paul et al 2000).

Se propone que la necesidad de una señal secundaria para inducir la producción de anticuerpos es un mecanismo que se desarrolló para evitar respuestas autoinmunes contra antígenos

multivalentes propios del organismo (Vos et al 2000). Los antígenos TI-1 presentan motivos intrínsecos que proveen la señal secundaria a los linfocitos B; estos motivos son generalmente estructuras presentes en la mayoría de los patógenos y no en el hospedero, lo que le permite al linfocito B discriminar entre moléculas propias y moléculas asociadas a microorganismos (Medzhitov et al 2000, Snapper et al 1996). Dichas estructuras son llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), y son reconocidas por receptores que se presentan tanto en linfocitos B como en monocitos, macrófagos, neutrófilos, células cebadas, basófilos y eosinófilos (Triantafilou et al 2000).

Entre los principales receptores que pueden reconocer estos PAMP, se ha dado en los últimos años gran énfasis a los receptores semejantes al receptor Toll de *Drosophila*, (TLR del inglés Toll-Like Receptor). La señal a través de los TLRs puede inducir la producción de citocinas proinflamatorias y aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras (Tsuneyasu et al 2002). Los receptores de la familia TLR son proteínas caracterizadas por la presencia de dominios extracelulares ricos en leucina y un dominio intracelular llamado dominio homólogo Toll/IL-1R (TIR) por su similitud con el receptor para IL-1 e IL-18 (Medzhitov et al 2000, Tsuneyasu et al 2002). El TLR4 fue el primer receptor de esta familia que se caracterizó en mamíferos y que reconoce específicamente LPS (Figura 3).

Tanto el receptor para IL-1 como el TLR4, al unirse a su ligando desencadenan una cascada de señalización que inicia con el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88 que se asocia con IRAK, una cinasa de serina y treonina. Esta interacción conduce a la autofosforilación de IRAK, la cual una vez fosforilada forma un complejo con la proteína adaptadora TRAF6 oligomerizandola. Esto conduce a la activación de TAK-1, un miembro de la familia de las cinasas MAP-3, la cual a su vez conduce a la activación de las cinasas IKK1 e IKK2. Estas cinasas fosforilan la proteína I κ B e induce su degradación a través del proteosoma, liberando al factor de transcripción NF- κ B para su traslocación al núcleo (Tsuneyasu et al 2002 y Medzhitov et al 2000) en donde induce la secreción de inmunoglobulinas en los linfocitos B (Abbas et al 1999), además de un incremento de receptores coestimuladores y de la secreción de quimiocinas y citocinas como el IFN tanto en linfocitos B como en macrófagos y células dendríticas. (Tsuneyasu et al 2002 y Medzhitov et al 2000).

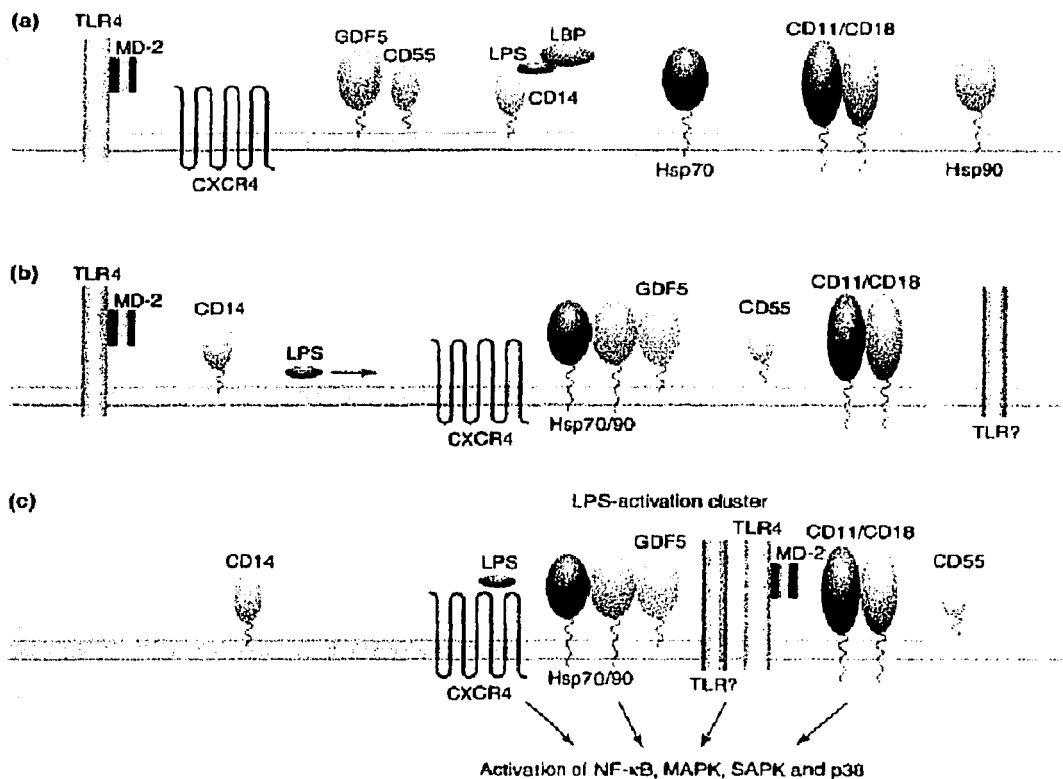
Se ha observado que en macrófagos y células dendríticas de ratones deficientes de MyD88 hay una menor pero persistente activación de NF- κ B con un aumento de moléculas coestimuladoras, y no así en ratones deficientes de TLR4, por lo que se piensa que hay una vía independiente de MyD88 (Kawai et al 1999 en Tsuneyasu et al 2002). Recientemente se identificó una proteína adaptadora que se asocia al dominio TIR del TLR4 por lo que se le llamó TIRAP (TIR domain

containing adapter protein). Esta proteína puede formar homodímeros o heterodímeros con MyD88 y se puede asociar con IRAK-2 y de esta forma relacionarse con la activación de NF- κ B (Tsuneyasu et al 2002).

CD14 es otro receptor que une LPS, pero como no tiene dominios intracelulares, debe interactuar con moléculas capaces de transducir señales como TLR4; también se ha sugerido que podría asociarse a moléculas como CD55 o las integrinas CD11 y CD18 (Triantafilou et al 2002).

A pesar de que el bloqueo de la interacción CD40-CD40L no inhibe la secreción de anticuerpos durante la inmunización con polisacáridos (Snapper et al 1996), esta interacción sinergiza con la señal producida por el antígeno y aumenta la secreción de anticuerpos. Por otra parte se ha visto que cuando se inocula LPS en humanos, ratones y pollos, se produce un decremento en las células T periféricas CD3+, CD4+ y CD8+, lo cual resulta de la redistribución de estas células fuera de la circulación hacia órganos linfoides secundarios para participar en varias funciones inmunes, aunque no se ha observado el consecuente incremento de estas poblaciones en el bazo (Gehad et al 2002). También es posible que el decremento en estas poblaciones de células T pueda deberse a una mayor apoptosis (Hotchkiss et al 1999 en Gehad et al 2002), inducida por la corticosterona que se secreta después de inoculación con LPS. Adicionalmente se ha observado que el porcentaje de monocitos en circulación y el de macrófagos en el bazo se incrementa, lo cual se podría deber a la migración de monocitos del torrente sanguíneo hacia el bazo, en donde podrían participar en la presentación de antígeno (Gehad et al 2002).

Las citocinas que promueven el cambio de isotipo son distintas para los antígenos TI y TD. El INF- γ induce un cambio de isotipo de IgM a IgG_{2a} solo con estímulos TI; TGF- β estimula la secreción de IgA e IgG_{2b}. La IL-4 es un factor que induce secreción de IgG₁ e IgE por linfocitos activados con LPS y con antígenos TD, pero no con antígenos TI-2 (Mond et al 1995). También se ha observado que después de la inoculación con LPS se incrementa la IL-1 plasmática paralelamente a un incremento de IL-1R en linfocitos y neutrófilos, sugiriendo que deben tener una función en la respuesta contra este antígeno (Gehad et al 2002).



TRENDS in Immunology

Figura 3. Modelo hipotético del reconocimiento de LPS. (a) LPS se une a una proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) que cataliza su transferencia a CD14. (b) Moléculas de señalización son reclutadas al sitio de unión de LPS-CD14. LPS es liberado de CD14 en la bicapa lipídica, en donde se une a un complejo de receptores compuesto posiblemente por el receptor de quimiocinas 4 (CXCR4), proteínas de choque térmico 70 y 90, (Hsp70/90), factor de diferenciación y crecimiento 5 (GDF5), y posiblemente CD55. (c) Moléculas de trasducción de señales, como son TLR4 unido con MD-2, TLR y/o integrinas CD11 o CD18 son reclutadas posteriormente al sitio de activación desencadenando múltiples cascadas de señales (Triantafyllou et al 2002).

La respuesta TI-1 está dada por una subpoblación de linfocitos B llamada B-1 (Snapper et al 1996). Estas células se caracterizan por presentar un rearreglo IgH restringido (utilizan muy pocos genes V_H), presentar niveles altos de IgM y CD43, niveles bajos de IgD y Mac1 (CD11b/CD18), y no expresar CD23 (Paul et al 2000). Algunas de estas células expresan bajos niveles de CD5 por lo que son referidas como B-1a, mientras que otras no lo expresan y se denominan como B-1b (Kantor 1991). Las células B-1 se originan durante la vida fetal y el periodo neonatal, existe muy poca o nula producción de esta subpoblación en organismos maduros. Se localizan en la periferia en las cavidades pleural y peritoneal y no están presentes en nódulos linfáticos (Paul et al 2000).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Las células B1 reconocen antígenos bacterianos comunes y también antígenos propios como fosfatidilcolina, Ig, DNA y proteínas de membrana de eritrocitos y timocitos; en las expansiones neoplásicas de este tipo de células se presentan síntomas de autoinmunidad (Fagarasan et al 2000). También tienen un papel en la inmunidad innata ya que secretan anticuerpos IgM sin exposición a antígenos (Fagarasan et al 2000). Se ha demostrado que este tipo de células migran de la Zona Marginal (MZ) al tejido linfoide asociado al intestino donde se diferencian a células plasmáticas. (Fagarasan et al 2000). La MZ es un compartimento localizado entre la pulpa blanca y la pulpa roja en el bazo, que consiste de una banda de células que rodean los folículos del bazo. Está compuesto principalmente de linfocitos B que expresan CD21 y CR tipo 2, un pequeño número de células T y dos tipos de macrófagos (macrófagos de la ZM y metalófilos) (Vos et al 2000).

Muchas células plasmáticas que secretan IgA constitutivamente y en respuesta a antígenos son derivadas de células peritoneales B1 que migran desde este lugar hasta la pared del intestino. (Fagarasan et al 2000). La producción de IgA por estas células es independiente de las células T ya que ratones deficientes de células T producen la misma cantidad de estos anticuerpos por los linfocitos B de la lamina propia que ratones normales. En contraste, el suero de los ratones normales no contiene IgG ni IgA contra bacterias comensales excepto en aquellos casos cuando los microorganismos están presentes en forma sistémica (Fagarasan et al 2000).

Se ha reportado que el antígeno TNP-LPS produce una buena respuesta secundaria en ratas. Esta respuesta secundaria es más intensa y con un patrón de anticuerpos con más IgG e IgA que la primaria. En experimentos de transferencia de células de ratas estimuladas meses antes con TNP-LPS a ratas con cadenas ligeras mutadas, se observó que las ratas que recibieron los linfocitos son capaces de producir una respuesta secundaria, lo que muestra que esta memoria es atribuible a clonas de células B persistentes. La capacidad de generar memoria está asociada con la aparición de células B que unen el antígeno (Zhang et al 1988).

En la regulación negativa de la respuesta inducida por los antígenos TI-1 se piensa que están involucradas moléculas que regulan la señal generada por el entrecruzamiento del BCR tales como CD22, FcγR-II y CD5.

Antígenos T-independiente tipo 2 (TI-2)

Los antígenos independientes de linfocitos T tipo 2 son también polímeros ya que están conformados por una gran cantidad de epítopes repetidos capaces de entrecruzar los receptores de las células B (BCR) de forma multivalente (Snapper et al 1996, Mond et al 1995b, Fagarasan et al 2000, Mond et al 1995, Martin et al 2001, Zhang 1988, Vos et al 2000). Sin embargo, éstos no son activadores policlonales de células B como los antígenos TI-1, es decir, solo activan a la clona de linfocitos B que presenta un BCR específico para el antígeno (Fagarasan et al 2000).

Se han descrito varios tipos de antígenos TI-2, como los polisacáridos capsulares multivalentes de la pared bacteriana, los polímeros sintéticos y sus contrapartes conjugados con haptenos. El polisacárido dextrano acoplado a inmunoglobulinas anti-IgD o IgM (anti-IgD-dextrano) es un antígeno de este tipo que ha sido muy utilizado para estudiar *in vitro* la respuesta TI-2 (Vos et al 2000).

A pesar de su diversidad química, el análisis de la estructura antigénica muestra que comparten un peso molecular mínimo de 100 kDa y epítopes repetidos cada 5-10 nm. El espacio y rigidez que presentan los epítopes es importante para determinar la naturaleza de la respuesta TI-2, está relacionado con la geometría del agregado de inmunoglobulinas membranales (mIg) que inducen sobre la superficie de la célula B (Vos et al 2000). La distancia entre estos receptores sobre la superficie de la célula B en reposo se ha estimado que es de 40 nm (Bell et al 1974 revisado en Vos et al 2000). Análisis de la inmunogenicidad de complejos de dinitrofenil-poliacrilamida muestran que este antígeno requiere presentar una cadena de aproximadamente 460 nm con haptenos para inducir una respuesta TI-2. Esto significa que fue necesario agrupar aproximadamente 50 moléculas de mIg en una forma circular con 460 nm de circunferencia (Dinitzis 1976 revisado en Vos et al 2000). Estudios que emplean complejos hapteno-acarreador, de un número de haptenos definido precisamente, muestran que la estimulación de la célula B resulta del entrecruzamiento de un mínimo de 10 receptores por molécula de antígeno multivalente, a lo que se le llamó "inmunon" (Sulzer et al 1997).

No solo el número total de receptores que agrupa el antígeno es importante, también la cinética de unión es un parámetro crítico para la estimulación. Análisis matemáticos muestran que el cociente entre la velocidad de disociación de la unión inicial y la velocidad de difusión del receptor es crítico para el establecimiento de la unión multivalente (Bell et al 1977). Mediciones de la difusión de los receptores para antígeno de la célula B han revelado que la estimulación TI-2 óptima ocurre cuando el antígeno multivalente causa una reducción de 14 veces en el coeficiente de

difusión de los receptores unidos (Peacock et al 1981 revisado en Vos et al 2000).

Los antígenos TI-2 pueden inducir la activación de la célula B comprometiendo una fracción pequeña de la población de receptores. Se ha estimado que la inducción de proliferación por el modelo anti-IgD-dextrano requiere comprometer aproximadamente 100 receptores por célula, menos de 0.1% del total de receptores para antígeno que presenta la superficie de la célula B (Vos et al 2000), por lo que concentraciones bajas de antígeno TI-2 son suficientes para llegar al umbral de activación de la célula B (Mond et al 1995). Los antígenos no multivalentes necesitan comprometer una fracción mucho más grande de receptores para inducir agrupamientos de 10 a 20 moléculas (Vos et al 2000).

Otra característica importante de este tipo de antígenos es que permanecen mucho tiempo en el torrente sanguíneo de tal forma que esto produce una señal de activación persistente en la célula B (Mond et al 1995).

A diferencia de los antígenos TI-1, los TI-2 activan linfocitos B por un mecanismo que depende de la expresión funcional de la cinasa de tirosina Btk (Zhang 1988, Vos et al 2000, Snapper et al 1996, Fargarasan et al 2000, Mond et al 1995, Martin et al 2001).

La unión del antígeno a los BCRs induce la translocación de Btk a los dominios lipídicos de membrana enriquecidos en el gangliósido G_{M1} , en donde se encuentra la cinasa de tirosina lyn y posiblemente otras cinasas (Cheng et al 1999 en Vos et al 2000) las cuales fosforilan al ITAM (motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptor) de las cadenas Ig- α e Ig- β del receptor (Saouaf et al 1994 revisado en Vos et al 2000). La cinasa de tirosina Syk se une a estos motivos fosforilados y se activa. Syk y lyn también pueden fosforilar y activar a Btk (Rawling et al 1996).

Se sabe que la activación de Btk es dependiente de la cinasa de fosfatidilinositol PI3-K (Li Z et al 1997 revisado en Vos et al 2000), la cual también puede ser reclutada por cinasas de tirosina o por la fosforilación de CD19 (Buhl et al 1999). Después de la estimulación, Btk colocaliza con el receptor agregado mediante un mecanismo dependiente de PI3-K, ya que la generación de fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) y moléculas relacionadas le permiten a Btk unirse a la membrana por su dominio PH. Sin embargo, la concentración de anti-IgD-dextrano que induce proliferación óptima no produce niveles detectables de PIP3 (Salim et al 1996 en Vos et al 2000).

En el análisis de la fosforilación de tirosinas con antígenos bivalentes o multivalentes no se encontraron diferencias cualitativas; sin embargo, la concentración de anti-IgD-dextrano que fue necesaria para inducir una fosforilación de tirosinas detectable fue al menos 100 veces más alta que la requerida para inducir proliferación de la célula B. En cambio, los antígenos bivalentes inducen

una fosforilación detectable y proliferación a la misma alta concentración (Brunswick et al 1992 en Vos et al 2000).

Btk es responsable de una señalización sostenida de calcio, causada por el influjo de iones del exterior de la célula lo que es crítico para la activación y proliferación de los linfocitos B. Las mutaciones en el dominio PH de Btk afecta la respuesta contra Ig bivalente o anti-IgD-dextrano e inducen apoptosis de estas células (Woodland et al 1996 revisado en Vos et al 2000). Sin embargo bajas concentraciones de anti-IgD-dextrano altamente multivalente pueden inducir proliferación y movilización prolongada de calcio en células con o sin Btk (Yamada et al 1993 revisado en Vos et al 2000). Esto indica que un incremento en el tamaño del antígeno y no en el número de agregados de receptores puede compensar el defecto de Btk (Vos et al 2000).

Se propone que la agregación de un pequeño número de agregados densos de receptores que desencadenan los antígenos multivalentes induce la asociación local de moléculas de Btk activadas. Como se mencionó antes, el proceso solo requiere una pequeña fracción de la población de receptores y una pequeña porción de la membrana celular, lo que resultaría en una limitada coagregación de moléculas que induce supresión de la activación de la célula B, tales como CD22 y el FcγIIb (Ono et al 1996 y Lankester et al 1995 revisado en Vos et al 2000). Estos receptores reclutan fosfatasa que reducen los niveles de PIP3, decrementan la asociación de CD19 con PI3-K (Hippen et al 1997 revisado en Vos et al 2000), y otras señales que conducen a la activación de Btk o su unión a la membrana.

Al igual que en una respuesta TI-1, se propone que para evitar respuestas autoinmunes contra antígenos multivalentes propios del organismo como DNA, colágena o actina, evolutivamente se desarrolló un mecanismo en la activación TI-2 que implica una señal secundaria selectiva para que el linfocito B produzca anticuerpos solo contra antígenos extraños. Un antígeno TI-2 no induce esta señal secundaria directamente en el linfocito B, por lo que linfocitos B purificados en reposo proliferan pero no producen anticuerpos contra antígenos TI-2 (Vos et al 2000, Bondada et al 2001).

Las bacterias y otros patógenos presentan en su superficie además de polisacáridos muchas moléculas capaces de proporcionar esta señal secundaria e inducir secreción de anticuerpos en células B purificadas. Un ejemplo de estas moléculas es el LPS, que además de inducir una respuesta TI-1 puede desencadenar la secreción de anticuerpos contra antígenos TI-2 también por medio de los receptores CD14 y TLR4. La adición de LPS más antígenos bivalentes incrementa la síntesis de DNA pero inhibe la secreción de anticuerpos (Kearney et al 1976, 1978 en Vos et al 2000), sin embargo cuando se estimula con anti-IgD-dextrano más LPS se observa un alto grado de sinergia en la inducción de secreción de IgM, lo cual es dependiente de TLR4 (Khan et al 1995 en

Vos et al 2000). Otras moléculas que en combinación con anti-IgD-dextrano son capaces de inducir secreción de anticuerpos contra este antígeno son la lipoproteína D de *Hemophilus influenzae* y lipo-OspA de *Borrelia burgdorferi* por la vía de TLR2 (Brightbill et al 1999 en Vos et al 2000) y las porinas presentes en muchas bacterias Gram-negativas (Kadowaki et al 2001) y el ADN bacterial que contiene motivos CpG no metilados por vía de TLR9 (Krieg et al 1995).

Los antígenos TI-2 pueden unir complemento y activar la vía alternativa o la clásica al unirse a inmunoglobulinas. Esta interacción le permite a los antígenos TI-2 unirse a los receptores tipo 2 del complemento (CD21), facilitando la activación de la célula B. CD21 es parte de un complejo que incluye a CD19, CD81 y Leu-13 (Fujimoto et al 1999 en Vos et al 2000). Mientras que la agregación entre moléculas de CD19 suprime la activación de la célula B, la coagregación con el BCR disminuye el umbral de activación 100 veces. La coagregación del BCR con el CD21 también disminuye este umbral induciendo una movilización persistente de calcio (Carter et al 1992). Se han realizado estudios en ratones deficientes de CD19 o CD21 que muestran que la respuesta a antígenos TI-2 se retrasa 2 días, y necesita mayores concentraciones de agonista para inducir niveles semejantes de proliferación que los ratones normales (Vos et al 2000).

Las citocinas también pueden inducir la secreción de anticuerpos (Snapper et al 1996, Mond et al 1995). Se ha demostrado que varias citocinas tales como IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 la IL-12, IFN- γ , y el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) pueden proveer a la célula B con la señal secundaria. (Pecanha et al 1991, Medzhitov 1997 revisado en Vos et al 2000)

Se sabe que la estimulación a través de CD40-CD40L sinergiza con los antígenos TI-2 (Bondada et al 2001). Los mecanismos de reclutamiento de células T en una respuesta TI-2 dependerán de la naturaleza del inmunógeno. Se ha sugerido que los antígenos multivalentes pueden reclutar directamente células T sin los requerimientos de la presentación del antígeno por MHC (Miliciano et al 1985 revisado en Vos et al 2000)

Otro tipo celular que podría estar involucrado en proveer la señal secundaria a la célula B son los linfocitos T que tienen un TCR $\gamma\delta$, ya que estos pueden reconocer antígenos no peptídicos con fosfato como los carbohidratos y nucleósidos (Norimitsu et al 2002). Cuando se cultivan este tipo de células con células B y se agrega anti-IgD-dextrano, se observa secreción de anticuerpos dependiente de IFN- γ en presencia de oligodesoxinucleótidos (Vos et al 2000). *In vivo* se ha demostrado que los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden mediar una respuesta antiviral también dependiente de IFN- γ (Maloy et al 1998).

Son las células NK las que han sido relacionadas más frecuentemente con la regulación de la respuesta TI-2; son productoras de IFN- γ , implicada en la inducción de secreción de

inmunoglobulinas. En el sistema murino se ha demostrado que células del bazo depletadas de células T pueden ser estimuladas por antígenos TI-2 pero la estimulación depende de la presencia de células NK (Snapper et al 1993, Snapper et al 1994 revisado en Mond et al 1995b). En otros estudios destinados a identificar los factores secretados por las células NK, se encontró que IL-3, IL-2, GM-CSF e IFN- γ inducen secreción de anticuerpos contra antígenos TI-2 por células B purificadas. La combinación de estas citocinas aumenta la producción de anticuerpos 10 a 50 veces, y cuando el IFN- γ es agregado con un retraso de 20 a 24 horas se incrementa 50 a 100 veces (Mond et al 1995). Las células NK también secretan CSF, TNF- α , TGF- β , IL-1, IL-8 (Vos et al 2000) y pueden ser activadas por medio de receptores que incluyen NKR-P1, Fc γ RIII, Ly-49D, Ly-49H, CD2, CD69 (Toellner et al 1998 y revisado en Vos et al 2000). En numerosos reportes se ha demostrado que hay receptores en la célula NK que reconocen polisacáridos, por lo que los antígenos TI-2 podrían activarlas por sí mismos o en combinación con citocinas como IL1, IL2, IL12, IL18 e IL15 llevando a la secreción de elevados niveles de IFN γ (Mond et al 1995).

Las células dendríticas pueden ser estimuladas vía TLR por antígenos TI-2 induciendo la secreción de citocinas como IL1 e IL6 además de que pueden presentar peptidoglicanos y polisacáridos a las células B (Melief et al 1995 revisado Vos et al 2000). En estimulación *in vitro* con TNP-FICOL se ha visto que tanto macrófagos como células dendríticas son suficientes para inducir secreción de anticuerpos anti TNP (Bondada et al 2001).

Los macrófagos también pueden ser estimulados vía TLR por estos antígenos y secretar IL1, IL6, IL12 y GM-CSF para proveer a la célula B de la señal secundaria para la secreción de anticuerpos (Bondada et al 2001).

Las células dendríticas, los macrófagos y células NK presenta receptores de la familia CD1 los cuales presentan glicolípidos (Moody et al 2001) que activan linfocitos T no convencionales (Bondada et al 2001), reclutando células T que activan la secreción de anticuerpos. Tanto en humanos como en ratones las células B de la Zona Marginal presentan una cantidad muy alta de CD1; este sitio es muy importante en la generación de anticuerpos contra antígenos TI (Bondada et al 2001).

En estudios *in vitro* en los que linfocitos B fueron activados con antígenos TI-2 en presencia de IFN- γ , se produjo la secreción de IgG₃ e IgG_{2a}, mientras que con antígenos TI-1 solo se produjo IgG_{2a}. Se sabe que IL4 es un factor que induce IgG₁ e IgE en respuestas TI-1 y TD; sin embargo en células estimuladas con antígenos TI-2 solo induce secreción de IgG₁. Por otra parte TGF- β estimula la secreción de IgA contra antígenos TI-2 y de IgG_{2b} e IgA contra antígenos TI-1 (Mond et al 1995).

Otra característica de la respuesta TI-2 es que no se presenta en neonatos y en ratones aparece entre las 3 a 6 semanas de edad (Bondada et al 2001, Vos et al 2000). En humanos parece ocurrir algo parecido; por ejemplo la vacuna de *H. influenzae* (TI-2) compuesta de polisacáridos capsulares induce una fuerte respuesta de anticuerpos solo en niños mayores de 2 años. En niños menores esta vacuna se tiene que aplicar conjugada a un antígeno proteico (Ahonkhai et al 1991). Existen datos que sugieren una diferencia intrínseca entre las poblaciones de células B del adulto y del neonato y no entre otras poblaciones de leucocitos que podrían ocasionar esta deficiencia en los neonatos. Algunos estudios muestran que los neonatos carecen de un subgrupo de células B caracterizadas por expresar Lyb5 (Mond et al 1995). El análisis bioquímico revela que las células B neonatales presentan un defecto en la expresión de las cinasas de tirosina Fgr y Fyn (Monroe 1996 en Bondada et al 2001) y así como una expresión reducida de CD21 (Paciorkowski et al 2000 en Bondada et al 2001). Por otro lado, el reemplazo de las células accesorias de neonatos por células de adultos más IL1, causa una respuesta contra TNP-FICOL igual a la de los adultos (Chelvarajan et al 1998 en Bondada et al 2001).

Existen distintas poblaciones de células B que responden contra antígenos TI-2; sin embargo, se sabe que la población de linfocitos B de la Zona Marginal tiene una especial importancia en respuestas TI-2 ya que estas células pueden montar una respuesta TI-2 más intensa que otras subpoblaciones celulares. Además, temporalmente la aparición de este subgrupo de células B coincide con el inicio de la capacidad para responder a los antígenos TI-2; en humanos a los 2 años de edad.

Ciertas clonas de la Zona Marginal sufren una selección positiva dependiente de CD19 y Btk. Además se ha visto que existen células especializadas en esta zona que son capaces de capturar y concentrar antígenos TI-2 del torrente sanguíneo (Martin et al 2000). Recientemente se ha encontrado que ratones deficientes en Pyk-2 muestran una deficiencia en el desarrollo de linfocitos B de la ZM y una menor producción de anticuerpos contra TNP-FICOL (Guinamard et al 2000). También se ha demostrado que linfocitos B enriquecidos en CD21^{alto} CD23^{bajo} de la Zona Marginal constituyen la mayoría de las células productoras de IgM contra antígenos TI-2, esta respuesta llega a su máximo a los 3 o 4 días después de la inoculación (Martin et al 2000).

Sin embargo, otras subpoblaciones como los linfocitos B foliculares también pueden montar una respuesta eficiente TI-2 (Lanzavecchia et al 2000). Recientemente se ha visto que la estimulación *in vitro* con antígenos TI-2 produce una mayor activación en las células foliculares que en las de la Zona Marginal (ZM). Sin embargo, en presencia de IL5, la población de células B de la Zona

Marginal tiene mayor capacidad para producir anticuerpos que las células B foliculares (Vos et al 2000, Martin et al 2000).

En otras zonas del bazo también se ha observado una respuesta TI-2. En ratas y ratones se demostró la formación de células plasmáticas en los canales y en la pulpa roja de los compartimentos del bazo, seguida de una proliferación generalizada de las células B (Martin et al 2000).

Aunque la generación de memoria inmunológica contra los antígenos TI-2 no es clara se sabe que son capaces de inducir formación de centros germinales (Sverremark et al 1998). En algunas investigaciones se han encontrado células de memoria en la Zona Marginal contra algunos antígenos T-independientes (Martin et al 2000). Otros experimentos demuestran que en varios sistemas se produce una respuesta secundaria más grande en magnitud que la respuesta primaria y con un patrón de isotipos diferente con preponderancia de IgG e IgA (Mond et al 1995b). También se ha demostrado formación de centros germinales *in vitro* con células productoras de anticuerpos específicas para $\alpha(1-3)$ dextrano las cuales fueron caracterizadas como células de memoria, aunque solo secretan anticuerpo IgM (Kolb et al 1993). Otro antígeno TI-2 como el 2,4-dinitrofenil-hidroxietil almidón (DNP-HES), asociado con LPS, produjo una respuesta secundaria más intensa que la primaria y un patrón de anticuerpos con mayor proporción de IgG e IgA. También se observó la aparición de células B con receptores específicos para el hapteno DNP en la Zona Marginal del bazo (Zhang et al 1988).

La formación de centros germinales depende de linfocitos T ya que en ratones atímicos no se forman (Sverremark et al 1998). Los linfocitos T en respuesta a antígenos TI-2 podrían secretar citocinas como TNF ya que formación de centros germinales no se produjo en ratones TNF^{-/-} mientras que la respuesta humoral fue semejante a la de los ratones normales. Se piensa que la falta de memoria inmunológica se debe a una ineficiente colaboración de los linfocitos T durante la formación del centro germinal (Sverremark et al 1998).

ANTECEDENTES

Biotina

La biotina (Figura 4), aislada en 1936, es una de las vitaminas hidrosolubles del complejo B. Funciona como un cofactor esencial de varias enzimas que catalizan la incorporación de CO_2 a compuestos orgánicos (Zempleni et al 1999, Voet et al 2000), tanto en microorganismos como en animales y plantas. La biotina funciona como acarreador carboxílico, es decir, transfiere un grupo carboxilo de una molécula donadora a una molécula aceptora (Scott et al 1995, Zempleni et al 1999, Voet et al 2000). Esta vitamina es esencial en el metabolismo de carbohidratos, en la síntesis y catálisis de ácidos grasos y en la incorporación de aminoácidos a las proteínas removiendo el grupo amino (Stanley 2002, Zempleni et al 1999, Zempleni et al 2001, Helm et al 2001).

La biotina se une a la apoenzima por una unión covalente de tipo amida entre el ácido pentanoico (valerato) de la cadena lateral y el ϵ -amino terminal de un residuo específico de lisina en la proteína (Zempleni et al 1999). Esta unión es catalizada por la holocarboxilasa sintetasa (HCS), la cual es altamente específica para la D-biotina y puede actuar sobre las distintas apoenzimas, posiblemente porque la secuencia de aminoácidos que rodea a la lisina del sitio de biotilación es conservado en las distintas carboxilasas de las especies estudiadas (Hommes 1986 citado en Baez-Saldaña 1998). Las holoenzimas presentan la secuencia Ala-Met-biocitina-Met involucrada en la transferencia del CO_2 , por lo que se piensa que la secuencia Ala-Met-Lis-Met puede funcionar como un sitio de reconocimiento para la biotilación (Baez-Saldaña 1998).

Este dímero biotina-lisina es conocido como biocitina y le provee un brazo de aproximadamente 14 \AA de largo, el cual es capaz de moverse acarreado el grupo carboxilo para transferirlo de la molécula donadora a la molécula aceptora (Scott et al 1995, Voet et al 2000). Durante el proceso de carboxilación la biotina se carboxila en el átomo $\text{N}(1')$ por el ión bicarbonato en una reacción impulsada por la hidrólisis de ATP a ADP. Este grupo carboxilo puede, por tanto, transferirse sin consumo ulterior de energía libre, la biotina acarrea el grupo carboxilo sobre el átomo de nitrógeno opuesto a la cadena lateral (Scott et al 1995, Voet et al 2000).

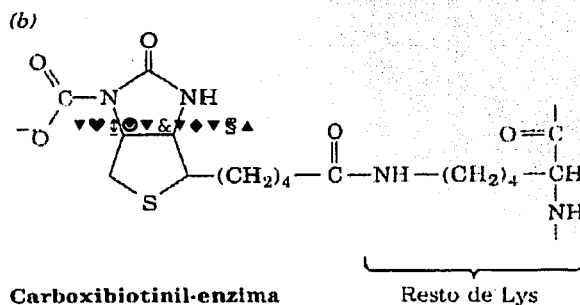
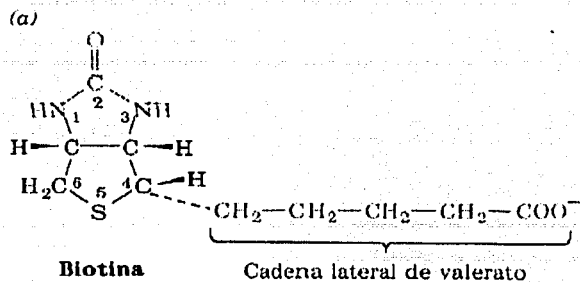


Figura 4. (a) La Biotina (hexahidro-2-oxo-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-ácido pentanoico) está constituida por un anillo de imidazolona que se halla condensado en cis a un anillo de tetrahidrotieno que es portador de una cadena lateral de valerato. Las posiciones 1, 2 y 3 constituyen un grupo ureido. (b) Carboxybiotina unida a una enzima: el grupo carboxilo se encuentra unido al carbono N(1) del grupo ureido, la biotina se encuentra unida a la enzima por un enlace amida entre el grupo carboxilo del valerilo y el grupo ϵ -amino del residuo de lisina de una cadena lateral de la enzima (Voet et al 2000).

Antagonistas de la biotina

Los homólogos de la biotina que tienen la cadena lateral más larga o más corta como la norbiotina, homobiotina o la α -dehidrobiotina son antagonistas estructurales muy potentes. Estos antagonistas proteínas como la avidina, estreptavidina y estravidina que se unen a la biotina formando complejos producen deficiencia en esta vitamina ya que impiden la síntesis de las holocarboxilasas (Bonjour 1984).

Se sabe que la clara de huevo contiene avidina, una glicoproteína con un peso molecular de 67

kDa con una estructura tetramérica de subunidades idénticas, cada una con un sitio de unión a biotina. Las modificaciones en el anillo de tiofeno o en la cadena lateral de la biotina no afectan la formación del complejo con la avidina, el cual es estable en un rango muy amplio de pH con una constante de disociación de $K = 10^{-15}$. Además, la avidina no es degradada en el tracto intestinal, por lo que su ingesta ha sido utilizada para producir deficiencia de biotina en animales de experimentación en muchas investigaciones (Helm et al 2001, Rodríguez-Meléndez et al 2001, Mock et al 1999, Baez-Saldaña 1998, Mock N. et al 1997, Moretti et al 1990, Rabin 1983, Petrelli et al 1981, Petrelli et al 1980, Kumar et al 1978, Pruzansky 1955).

Carboxilasas

En mamíferos la biotina es cofactor de 4 enzimas, las cuales son: Propionil CoA carboxilasa, Acetil CoA carboxilasa, Piruvato carboxilasa, y Metilcrotonil CoA carboxilasa (Figura 6).

Piruvato carboxilasa (PC)

La PC, descubierta en 1959 por Merton Utter es una proteína de 120 kD con estructura tetramérica de subunidades idénticas que unen cada una a una molécula de biotina. Es una enzima clave en la gluconeogénesis, además de que provee un intermediario del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. En la primera parte de la reacción, la biotina se carboxila en el átomo N(1') por el ión bicarbonato en una reacción impulsada por la hidrólisis del ATP a ADP; en la segunda parte, el grupo carboxilo activado se transfiere de la carboxibiotina al piruvato para formar oxaloacetato. Estas dos etapas se realizan en sitios distintos de la enzima y el brazo de 14A° de la biotina actúa transfiriendo el anillo de la carboxibiotina entre los 2 sitios (Figura 5). Esta es la reacción más importante que repone los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, ya que cuando no hay suficiente oxaloacetato u otros intermediarios la velocidad del ciclo disminuye y se acumula la acetil CoA, la cual activa a la PC produciendo mayor cantidad de oxaloacetato y aumentando la velocidad del ciclo. Si el ciclo del ácido cítrico es inhibido en algún otro paso el aumento en la concentración de oxaloacetato no será suficiente para activarlo, y en este caso el exceso de oxaloacetato se equilibra con el malato, el cual es transportado fuera de las mitocondrias para su uso en la gluconeogénesis (Voet et al 2000).

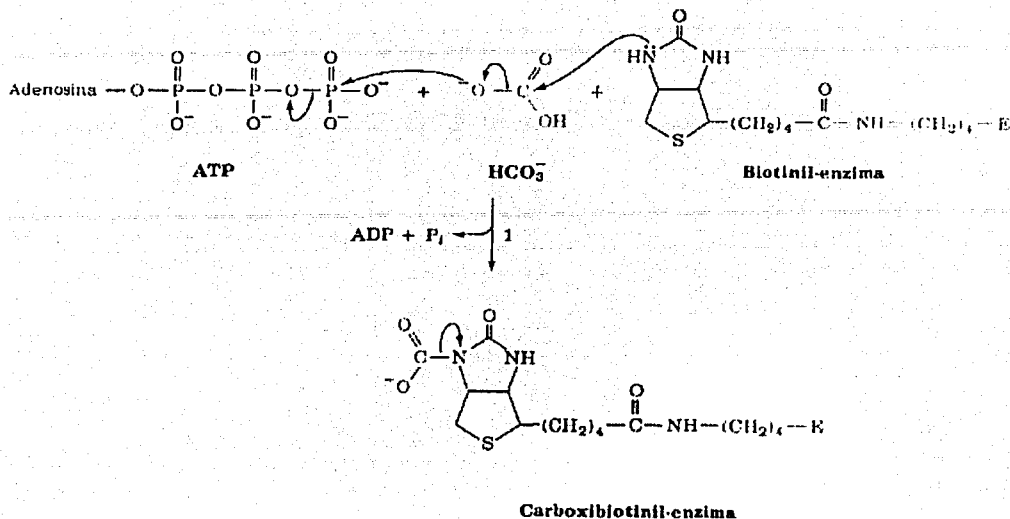


Figura 5. La biotina se carboxila en el átomo N(1') por el ión bicarbonato en una reacción impulsada por la hidrólisis del ATP (Voet et al 2000)

Propionil CoA carboxilasa (PCC).

Es una enzima tetramérica relacionada con la producción de oxaloacetato a partir del propionato el cual proviene de la oxidación de ácidos grasos de cadena impar o de la degradación de aminoácidos de cadena ramificada. La PCC cataliza la primera de tres reacciones necesarias para la conversión del propionil-CoA en succinil-CoA, ya que lleva a cabo la formación de metilmalonil CoA a partir de propionil CoA, el cual subsecuentemente es convertido en succinil CoA (Voet et al 2000). Estas reacciones son esenciales para el metabolismo de isoleucina, valina, metionina, treonina, colesterol y ácidos grasos de cadena no saturada y para la degradación de carbohidratos por microorganismos intestinales (Zempleni et al 1999). La carboxilación catalizada por esta enzima es muy semejante a la reacción de la piruvato carboxilasa que también se realiza en dos etapas; la primera es la carboxilación de la biotina y la segunda es la transferencia estereoespecífica del grupo carboxilo activado desde la carboxybiotina hacia el propionil CoA para formar (S)-metilmalonil-CoA. Esta etapa se produce por un ataque nucleofílico sobre la carboxybiotina por un carbanión en C(2) del propionil-CoA (Voet et al 2000).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Acetil CoA carboxilasa (ACC).

Existen 2 formas de esta enzima, una mitocondrial ($ACC\alpha$) y una citoplásmica ($ACC\beta$). Ambas isoformas catalizan la formación de malonil CoA mediante la carboxilación del acetil CoA; la malonil CoA es utilizada por el complejo ácido graso sintetasa para la producción de palmitato (Zempleni et al 1999). El mecanismo de esta enzima es también muy semejante al de la PCC, con una primer etapa de activación de CO_2 y en seguida una carboxilación. A pesar de que las formas α y β catalizan la misma reacción tienen una función metabólica distinta debida a su localización subcelular. La $ACC\alpha$ controla la síntesis de ácidos grasos en el citosol ya que provee el sustrato malonil-CoA. En contraste, la $ACC\beta$ en la mitocondria controla la oxidación y el transporte de ácidos grasos y también es importante para el almacenamiento de la biotina (Zempleni et al 1999). La síntesis de esta enzima es inhibida por el ayuno, mientras que su actividad es inhibida por el palmitoil-CoA y por la fosforilación dependiente de AMPc estimulada por glucagon y es activada por el citrato y por la fosforilación estimulada por la insulina (Voet et al 2000).

Metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC)

Esta enzima participa en el catabolismo de la leucina. Cataliza la formación de 3 metilglutaconil CoA a partir de 3-metilcrotonilo, para finalmente producir acetil CoA y acetoacetato (Baez-Saldafia 1998). La leucina se oxida por una combinación de reacciones semejantes a las que se llevan a cabo en la β oxidación y la síntesis de cuerpos cetónicos. Sin embargo, en el hígado de los mamíferos existen varias vías para la degradación de la lisina una de las cuales incluye la formación de la sacaropina a partir de α -cetoglutarato sin la participación de la MCC. Se cree que esta ruta es la predominante en mamíferos porque un defecto genético en la enzima que cataliza la primera reacción de la vía, produce hiperlisinemia e hiperlisinuria así como retraso mental y físico (Voet et al 2000).

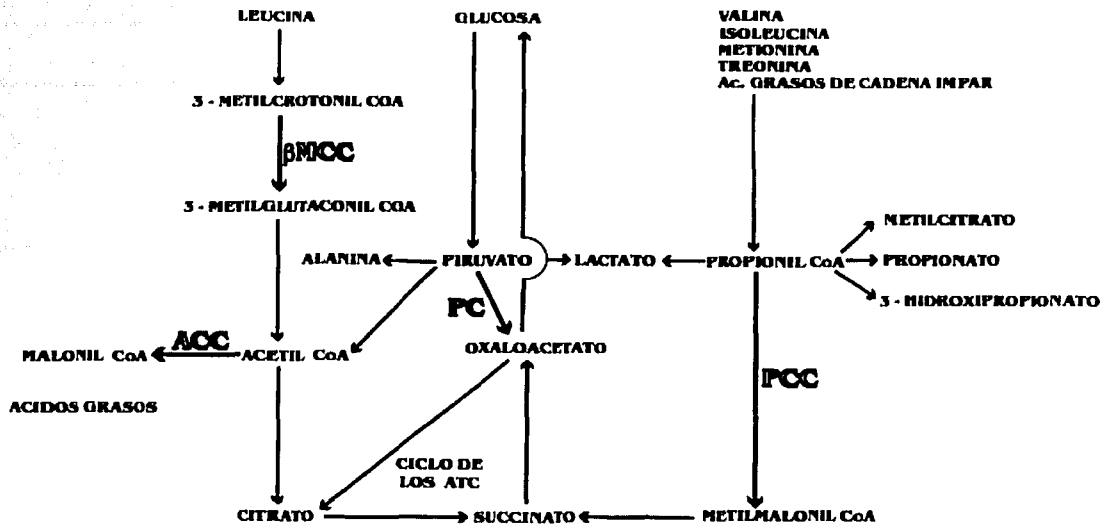


Figura 6. Rutas metabólicas en las que participan las enzimas biotiniladas. PCC = Propionil CoA carboxilasa; β MCC = β -metilcrotonil CoA carboxilasa; PC = piruvato carboxilasa; ACC = acetil CoA carboxilasa (Wolf *et al* 1995).

Ciclo de la biotina

En el metabolismo las carboxilasas activas son degradadas hasta péptidos biotinilados. La hidrólisis secuencial de estos péptidos conduce a la formación de biocitina (ϵ -N-biotinil-L-lisina), la cual es hidrolizada por la biotinidasa produciendo biotina y lisina. La biotinidasa también hidroliza biocitín sulfóxido y biocitín sulfona y en el suero humano se han identificado al menos nueve isoformas de biotinidasa (Zempleni *et al* 1999).

Estas proteínas y péptidos biotinilados están presentes en grandes cantidades en el alimento. Algunas enzimas gastrointestinales hidrolizan las proteínas biotiniladas fragmentándolas en péptidos biotinilados y solamente la biotinidasa intestinal puede liberar a la biotina para su reutilización. Se discute la absorción intestinal de péptidos biotinilados sin una hidrólisis previa (Zempleni *et al* 1999).

Se propone que en el intestino, la biotina es absorbida por un transporte dependiente de sodio y de gradiente electroneuro, y que a grandes concentraciones la biotina entra por difusión pasiva.

La salida de la biotina de los enterocitos es mediada por un acarreador electrogénico independiente de sodio, que no transporta biotina en contra de gradiente. Algunos estudios sugieren que la biotinidasa sirve como transportador de biotina dentro de la célula. Se ha determinado que alrededor del 80% de la biotina permanece libre, menos del 10% unida reversiblemente y 12% unida covalentemente a proteínas plasmáticas. Hepatocitos, capilares cerebrales y células mononucleares sanguíneas periféricas (CMSP) acumulan biotina libre por un sistema de transporte saturable dependiente de sodio. Estudios en estas células muestran que el influjo y la salida de biotina son mediadas por el mismo transportador (Zempleni et al 1999).

Otro mecanismo mediado por otro acarreador dependiente de Na se ha propuesto para la internalización de biotina a través de la membrana apical de colonocitos, el cual teóricamente absorbe la biotina sintetizada por la microflora del colon. Este mecanismo también es compartido por el ácido pantoténico que también es sintetizado por esta microflora (Said 1999).

Se ha establecido que la internalización de la biotina en linfocitos no proliferantes es mediada por un transportador que es específico para biotina, porque no compiten los ácidos lipoico y hexanoico ni la bilirrubina del medio. Este proceso requiere energía metabólica así como cotransporte de biotina y sodio (Zempleni et al 2000).

Cuando se dieron dosis farmacológicas de biotina a humanos, la cantidad de la vitamina y sus metabolitos recuperados en la orina fue la misma cuando se administró por vía intravenosa como por vía oral. Estos datos sugieren que la absorción intestinal de la biotina es completa (Zempleni et al 1999b).

El catabolismo de la biotina se realiza en la cadena lateral del ácido valérico y en el azufre del anillo de tiofeno por procesos de oxidación distintos. El corte de unidades de carbono por β -oxidación de la cadena lateral conduce a la formación de bisnorbiotina, tetranorbiotina y metabolitos relacionados. No se sabe si estos procesos se llevan a cabo en la mitocondria o en peroxisomas. El sulfuro en el anillo heterocíclico es oxidado a biotin-*l*-sulfóxido, biotin-*d*-sulfóxido y biotin sulfona. Esta oxidación de la biotina ocurre en el retículo endoplásmico liso. La oxidación en ambos sitios de la molécula producen compuestos como bisnorbiotina sulfona (Zempleni et al 1999).

Los mamíferos no son capaces de sintetizar biotina, la obtienen de los alimentos y también es producida por bacterias del tracto intestinal (Zempleni et al 1999). Se encuentra ampliamente distribuida en los nutrientes de los animales, por lo que fácilmente se ingiere la cantidad necesaria.

La ingesta adecuada para la biotina se calcula que es de 30 $\mu\text{g}/\text{día}$ para adultos, 35 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante la lactancia y 5 $\mu\text{g}/\text{día}$ para infantes de 0 a 5 meses (Yates et al 1998 citado en Zempleni et al 1999). Se considera que la población ingiere cada día tres o cuatro veces la cantidad calculada (Baker 1962 citado en Baez-Saldaña 1998).

Actualmente se tienen evidencias que sugieren que la microflora intestinal por si sola no puede satisfacer la demanda de biotina, ya que la alimentación parenteral libre de biotina causa deficiencia. (Higuchi et al 1996 citado en Zempleni et al 1999, en Donald 1999, y citado en Mock NI. 1997).

El Instituto Americano de Nutrición recomienda para los ratones una dieta que contenga 0.2 mg de biotina/kg de alimento (National Res Council 1995). Estos organismos practican la coprofagia lo cual es un hábito que les proporciona gran parte de la biotina necesaria.

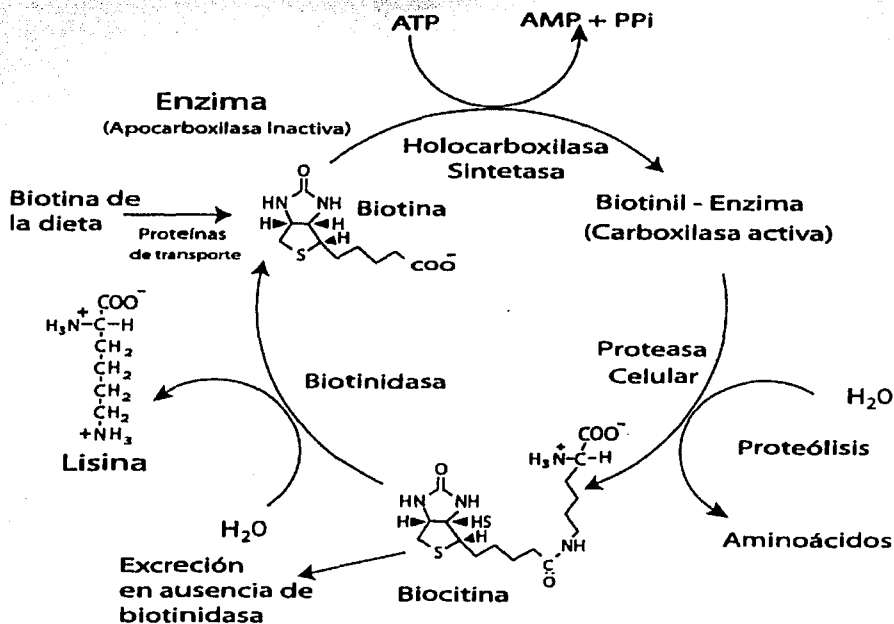


Figura 7. Ciclo metabólico de la biotina. La biotina es ingerida en la dieta, la enzima holocarboxilasa sintetasa une covalentemente a la biotina a las diferentes apocarboxilasas inactivas con lo cual se transforman en carboxilasas activas. Posteriormente las carboxilasas son degradadas por proteasas celulares dejando libre a la biocitina, de la que la biotina es liberada por la enzima biotinidasa. Una parte de la biotina se excreta, otra se recicla (Baez-Saldaña 1998).

Otras funciones de la Biotina

Además de su papel como cofactor de las carboxilasas mencionadas antes, la biotina se ha relacionado con la regulación de la expresión génica. Se ha reportado que la biotina modifica la cantidad de mRNA que codifica para las carboxilasas y para la holocarboxilasa sintetasa. Estos efectos pueden ocurrir durante la transcripción o el procesamiento del mRNA. Ratas alimentadas con una dieta deficiente de biotina muestran niveles de HCS significativamente menores que ratas controles; cuando se les inyectó biotina los niveles de mRNA alcanzaron valores normales a las 24 horas de la administración (Rodríguez-Meléndez et al 2001). También se demostró que la biotina regula la expresión de la glucocinasa en el hígado aumentando la cantidad de mRNA cerca de 20 veces después de 12 horas de administración de 1 mg/kg biotina en el alimento (Chauhan y Dakshinamurti 1991). En ratas deficientes de biotina, el mRNA de la glucocinasa pancreática disminuye cerca del 50% (Romero-Navarro et al 1999).

Por otro lado se ha demostrado que las histonas son biotiniladas en residuos de lisina por la biotinilasa a través de una reacción covalente (Hymes et al 1995; citado en Steven et al 2001). La biotinilación de las histonas sugiere que la biotina puede tener un papel importante en la transcripción, replicación o reparación del DNA, como ocurre con otras modificaciones como son la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y ADP-ribosilación de histonas (Lewin et al 2000). En células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC), durante la proliferación celular, el porcentaje de biotina que se encuentra en el núcleo aumenta de un 0.7 a un 1% además se incrementa la biotinilación en todas las clases de histonas. Esta biotinilación se incrementa tempranamente en la fase G1 y permanece alta durante las fases tardías (S, G2 y M) en comparación con las células en reposo, mientras que la cantidad de mRNA que codifica para la biotinilasa ni su actividad se incrementan (Steven et al 2001).

Indicadores de deficiencia de biotina

Se han descrito diversos parámetros que se consideran indicadores de deficiencia de biotina. La concentración de biotina o bisnorbiotina en la orina se consideran indicadores tempranos en la mayoría de los sujetos experimentales, algunos humanos con deficiencia no severa, los cuales

recibieron una dieta con suficiente avidina para capturar 7 veces la cantidad de biotina de los alimentos durante un periodo de 20 días, presentaron concentraciones en el límite inferior de los rangos normales (Sempleni et al 1999, Mock 1999). En cambio las concentraciones de biotina libre y de sus metabolitos (bisnorbiotina y biotin-*d,l*-sulfoxido) en el suero no se consideran buenos indicadores de deficiencia, ya que ninguno de ellos disminuye significativamente con este tratamiento (Mock 1999).

Las actividades específicas de las carboxilasas se consideran mejores indicadores del estado funcional de la biotina. Se propone que la actividad de PCC y de β -MCC carboxilasa son mejores indicadores que la actividad de ACC y PC, debido a que estas últimas son enzimas claves en vías metabólicas esenciales (Garett et al 1995 en Zempleni et al 1999), por lo que se piensa que es más factible que con una deficiencia de biotina no severa se vean afectada la actividad de enzimas menos importantes para el organismo (Zempleni et al 1999). En ratas y ratones deficientes de biotina, la actividad de propionil-CoA carboxilasa y β -metilcrotonil-CoA carboxilasa en el hígado y en linfocitos de bazo están reducidas (Zempleni et al 1999, Baez-Saldaña 1998). En pacientes que recibieron dieta parenteral sin biotina por 24 a 40 días la actividad de propionil-CoA en linfocitos de sangre periférica disminuyó al menos 50% (Velásquez et al 1990).

La actividad reducida de β -MCC causa un bloqueo en el catabolismo de la leucina, lo que ocasiona que la degradación tome una vía alternativa que la lleva a la formación de ácido 3-hidroxisovalérico (3HIA) y 3-hidroxicrotonil glicina (Mock N. et al 1997). Estudios de deficiencia de biotina en humanos muestran que la secreción de 3HIA se incrementa significativamente en individuos que tenían 3 a 20 días recibiendo alimento depletante de biotina (Mock 1999, Mock N. 1997) por lo que se considera que éste es un indicador sensible de deficiencia ligera de biotina. Estudios en ratas alimentadas con dieta depletante de biotina también reportaron un incremento significativo en la excreción de 3HIA a los 14 días de recibir la dieta (Zempleni et al 2001).

En humanos que consumieron 1200 μ g de biotina por día durante 14 días se encontró que la concentración en el suero de biotina, bisnorbiotina y sulfóxido de biotina se incrementó aproximadamente 15 veces desde la primera toma. Sin embargo, la proporción del total de biotina y sus metabolitos no cambió significativamente lo que sugiere que el catabolismo de la biotina no fue substancialmente inducido y que no es fácilmente saturable (Mock et al 1997).

Efecto de la biotina en el sistema inmune

Deficiencia de biotina

Como ya se mencionó, la deficiencia en biotina es poco frecuente debido a que la cantidad necesaria para el organismo es fácilmente ingerida en los alimentos. Sin embargo en humanos se han descrito distintas causas que la producen: en pacientes con deficiencias congénitas en la biotinidasa o HCS (Wolf 1995), en pacientes que reciben alimentación parenteral sin suplementación de biotina (Mock et al 1986 citado en Zampleni et al 1999 y en Mock 1999), en individuos que consumen gran cantidad de huevo crudo (Sydenstricker 1942) y en pacientes que reciben por mucho tiempo terapias con los anticonvulsivantes carbamazepina, fenitoina, y primidona (Mock et al 1998b). En estos casos se presenta alopecia, pérdida de color en el pelo, escaldaduras en la piel, erupciones alrededor de la nariz, boca y otras áreas periorificiales del cuerpo, conjuntivitis, anemia, pérdida de apetito, náusea, letargo, dolor muscular, hormigueos y parestesia de extremidades, dermatitis seborréica y eczematosa, desarrollo deficiente, hipotonía, ataxia, acidosis orgánica y láctica, depresión y alucinaciones (Mock 1999; Zampleni et al 1999).

La deficiencia de biotina conduce a una actividad reducida de la enzima acetil-CoA carboxilasa, la cual a su vez causa síntesis anormal de ácidos grasos de cadena larga, incluyendo ácidos grasos polinsaturados, lo que resulta en anomalías en el metabolismo de prostaglandinas y sustancias relacionadas (Kramer et al 1984, Mock 1988, Munnich et al 1980, citado en Zampleni et al 1999).

La deficiencia de biotina causa en el cerebro una disminución en la actividad de la enzima piruvato carboxilasa por lo cual se acumula ácido láctico que es de la causa de la hipotonía, temblores, ataxia, depresión y alucinaciones (Sander 1982 et al, Diamantopoulos et al 1986 en Zampleni et al 1999).

En el humano se han descrito dos tipos de deficiencias en el ciclo de utilización de la biotina que ocasionan Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC). La DMC Neonatal o de aparición temprana, es producida por un trastorno en la biotilación a causa de la deficiencia de la holocarboxilasa sintetasa. La DMC Juvenil o de aparición tardía es causada por la deficiencia de la biotinidasa, lo que ocasiona un defecto en el reciclamiento de la biotina. Los niños con deficiencia en alguna de las carboxilasas no responden al tratamiento oral con biotina, mientras que la mayoría de los individuos con algún tipo de DMC mejoran algunos de los síntomas con la administración de

biotina (Zempleni et al 1999).

Se han encontrado efectos adversos en diversas funciones del sistema inmune tanto en sistemas experimentales como en pacientes que presentan algún defecto que ocasiona deficiencia de biotina.

De los pacientes que se han reportado con DMC Juvenil, la mayoría presentaron infecciones en la piel por *Candida*, una gran proporción presentó conjuntivitis y también muchos de ellos presentaron enfermedades respiratorias, lo que se considera como indicativo de un sistema inmune deprimido.

En una familia se diagnosticaron tres niños con deficiencia de biotinidasa, los tres mostraron dermatitis causada por *Candida*. El primero presentó neumonía, alopecia e infecciones por *Candida* en la cara e ingule, muriendo de neumonía intersticial. El segundo también presentó candidiasis, conjuntivitis y neumonía, así como ausencia de hipersensibilidad retardada en pruebas dérmicas y en pruebas *in vitro* contra antígenos de *Candida*, no presentó una respuesta a la inmunización contra polisacáridos de pneumococo y KLH (Hemocianina de *Megathura crenulata*) y presentó una cantidad de IgA total disminuida mientras que la respuesta a la estimulación *in vitro* de linfocitos con fitohemaglutinina (PHA) fue normal. El tercero fue evaluado a los 6 y 18 meses. A los 6 meses presentó una cantidad de linfocitos B disminuida, ausencia de hipersensibilidad retardada en pruebas dérmicas y en pruebas *in vitro* contra antígenos de *Candida*, ausencia de respuesta a la inmunización contra polisacáridos de pneumococo y KLH, sin embargo, *in vitro* la respuesta de los linfocitos a la estimulación con PHA fue normal y la cantidad de IgA sérica también fue normal. A los 18 meses presentó una cantidad de linfocitos B normal, sin embargo los linfocitos T estaban disminuidos, la respuesta de hipersensibilidad retardada contra *Candida* fue reducida, mientras que la respuesta a la inmunización con KLH y polisacárido fue normal, *in vitro* la respuesta de los linfocitos a la estimulación contra *Candida* y PHA fue normal (Cowan et al 1979).

Como se puede observar, en estos reportes las características inmunológicas que presentan los individuos con defectos en la utilización de biotina no son las mismas, aún siendo de la misma familia, y por lo tanto un fondo genético similar aún en el mismo individuo, puede presentar deficiencia en la respuesta de anticuerpos a una edad determinada y meses después sin haber recibido tratamiento con biotina presentar una respuesta normal contra los mismos antígenos. Se ha reportado que la candidiasis crónica mucocutánea causa deficiencia de IgA e hipergammaglobulinemia (Edwards et al 1979, Aurulantham et al 1979, citado en Cowan et al 1979). La deficiencia de IgA también podría deberse a un efecto secundario de la terapia que

recibió el niño en cuestión (Cowan et al 1979).

En otros reportes de infantes con DMC también se muestra una respuesta inmune deprimida pero las características del sistema inmune tampoco son constantes entre los individuos. Un reporte de un niño con DMC presentó conjuntivitis y dermatitis periorificial causada por *Candida*, tuvo proporciones normales de linfocitos periféricos T y B y respondió normalmente a la prueba dérmica de hipersensibilidad retardada contra *Candida* (Thoene et al 1981). Otro paciente con DMC también presentó conjuntivitis y dermatitis por *Candida*, mostró cantidad normal de linfocitos T y B, así como respuesta de proliferación y citotoxicidad celular normal. Sin embargo este paciente presentó hipergammaglobulinemia, un defecto en la actividad *in vitro* de los linfocitos periféricos supresores y baja producción de prostaglandina E₂ por los macrófagos. La administración de biotina condujo a la restauración total de estas funciones (Munnich et al 1981).

Al igual que los reportes clínicos, los reportes experimentales del efecto de la deficiencia de biotina en el sistema inmune son muy controvertidos. En un estudio donde se administró por 4 semanas una dieta depletante de biotina utilizando clara de huevo, se demostró que las ratas deficientes de biotina al ser inoculadas con antígeno toxoide diftérico, presentaron títulos de anticuerpos menores que las ratas Sprague-Dawley que recibieron la misma dieta más 4 µg de biotina diariamente (Pruzansky et al 1955). En un estudio posterior en donde se inocularon intravenosamente eritrocitos de carnero a ratas Holtzman se demostró que la deficiencia de biotina produjo un menor desarrollo de células de bazo sintetizadoras de anticuerpos hemolíticos que el observado en las ratas control, estas ratas deficientes recibieron la dieta depletante durante 8 semanas antes de la inoculación. (Kumar et al 1978).

Ratas Lewis inmunizadas con proteína básica de mielina (PBM) de cobayo, después de cuatro semanas de recibir dieta deficiente de biotina y con clara de huevo, no desarrollaron encefalomiелitis alérgica. En cambio, las ratas alimentadas con la misma dieta pero adicionada con 2 mg de biotina por kg de alimento si presentaron los síntomas de encefalomiелitis alérgica causados por la inmunización. En el mismo estudio se realizaron experimentos transfiriendo linfocitos de bazo de animales deficientes y suficientes de biotina inoculados con la PBM a animales no inoculados. Cuando se transfirieron los linfocitos de animales suficientes, tanto las ratas deficientes como las no deficientes, desarrollaron encefalomiелitis, sin embargo fue más grave en las ratas no deficientes; en cambio cuando se transfirieron linfocitos de ratas deficientes, las ratas deficientes no desarrollaron la enfermedad y solo algunas ratas suficientes presentaron algunos

síntomas de encefalomiелitis. Además el análisis de la respuesta de anticuerpos contra eritrocitos de camero mostró que las ratas deficientes presentaron una respuesta deprimida a la inoculación, así como una marcada reducción en la celularidad y tamaño del timo, mientras que en el bazo no se encontraron diferencias significativas (Rabin 1983).

Otros estudios mostraron que las ratas Spague-Dawley deficientes de biotina tuvieron disminución en la velocidad de crecimiento corporal así como menor peso de timo, bazo y nódulos linfáticos intestinales. La organización globular en el timo de las ratas deficientes estaba alterada, los septos conectivos eran mucho más delgados que los de las ratas control, además presentaban capilares en lugar de infiltrados y las áreas corticales y medulares no eran distinguibles. (Moretti et al 1990, Petrelli et al 1980). La incorporación de 3H-timidina al DNA del bazo y de los nódulos linfáticos de las ratas deficientes de biotina fue mayor que en las ratas control. Todos los efectos fueron reversibles con la administración de biotina. (Petrelli et al 1985).

En cobayos hembra la alimentación depletante de biotina causó cambios en la cantidad y en las proporciones de los leucocitos circulantes. El número de leucocitos se duplicó debido principalmente al incremento en la cantidad de neutrófilos sin embargo los linfocitos B y T disminuyeron. *In vitro* estas poblaciones alcanzaron valores normales previa incubación con biotina, el porcentaje de linfocitos T de animales normales no se modificó con el mismo tratamiento (Petrelli et al 1981).

En otro estudio con ratas Sprague-Dawley deficientes no se observaron cambios en los linfocitos B y solo se encontraron cambios muy ligeros en las subpoblaciones de linfocitos T del bazo. Estos estaban disminuidos a los 28 y 40 días en el bazo, y los linfocitos CD8 estaban disminuidos en la sangre y en el timo a los 40 días. Estos cambios no tuvieron efecto en las funciones como proliferación y secreción de las citocinas IFN- γ e IL-4 en respuesta a PHA. Tampoco se observaron diferencias entre las ratas suficientes y las ratas deficientes en la respuesta de anticuerpos (IgG) al ser inmunizadas con polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* conjugado con toxoide tetánico (Helm et al 2001).

En nuestro laboratorio se adoptó un modelo experimental murino que permite estudiar el efecto de la biotina en el sistema inmune. Este modelo se basa en el uso 3 grupos de ratones machos Balb/cAnN que reciben dieta depletante de biotina (con clara de huevo seca como única fuente de proteína), dieta suplementada con biotina (0.004 g. de biotina/kg de alimento) o dieta control (alimento para animales en experimentación). La cantidad de biotina que reciben los ratones

suficientes representa un exceso de la que puede secuestrar la avidina en la clara de huevo, lo que asegura que los ratones puedan recibir la biotina recomendada. Con este modelo se publicaron algunos efectos de la deficiencia en el sistema inmune (Baez-Saldaña et al 1998). La concentración de biotina libre sérica en los ratones deficientes (2.1-4.5 nM) fue significativamente menor que en los ratones controles (9.9-54.1 nM) y en los suplementados (10.2-74.6 nM). De acuerdo con previas publicaciones los ratones con dieta depletante tuvieron una menor ganancia de peso y desarrollo del hígado en comparación con los ratones de los grupos control y suplementado. La actividad específica de las enzimas PCC y PC también fueron significativamente menores en los animales del grupo deficiente. En este trabajo también se describe que los ratones deficientes presentaron un menor desarrollo del bazo además de una menor celularidad. También se encontraron alteraciones en la proporciones de las subpoblaciones de linfocitos de bazo de los ratones deficientes, en donde el porcentaje de células B (sIg⁺) fue significativamente menor y el porcentaje de células T (CD3⁺), principalmente de las células del fenotipo CD4⁺, fue significativamente mayor.

Otros resultados no publicados obtenidos en el laboratorio muestran que los ratones deficientes presentan un aumento significativo de los linfocitos T inmaduros, CD4⁺CD8⁻ con una disminución de las células inmaduras intermedias CD4⁺CD8⁺ lo que podría indicar un arresto de la maduración de los linfocitos antes de su conversión a células dobles positivas. Por otra parte, en la producción de anticuerpos contra DNP-OVO no se encontraron diferencias entre los grupos, probablemente debió a un esquema de inmunización diseñado para inducir una respuesta vigorosa con adyuvante y varias inmunizaciones o porque el inmunógeno utilizado no fue el adecuado (Baez-Saldaña 1998).

Suplementación con biotina

La suplementación con biotina no tuvo un efecto claro en la producción de anticuerpos en puercos. La cantidad de inmunoglobulinas en respuesta a la inoculación intramuscular con eritrocitos de carnero fue más alta en puercos que recibieron 220 y 440 ppb (partes por billón) de biotina en el alimento en comparación con los puercos que no recibieron la suplementación; sin embargo los puercos que recibieron 880 ppb de biotina presentaron una cantidad de anticuerpos menor. La respuesta contra lisozima y PHA no cambió significativamente con las tres concentraciones de biotina con que fueron suplementados los animales (Kornegay et al 1988).

En otro estudio se demostró que la administración oral de dosis farmacológicas de biotina a

individuos sanos causa un decremento en la proliferación de CMSP estimuladas con mitógenos, así como en la síntesis de IL-1 β e IL-2. La IL-1 β es producida por monocitos, activa neutrófilos y células NK. Uno de los mecanismos que podría explicar este fenómeno sería la regulación de la expresión génica de citocinas por la biotina, ya sea directa o indirectamente; el efecto de la disminución en la proliferación de las CMSP podría deberse al decremento en la síntesis de citocinas, ya que la proliferación de estas células estimuladas con mitógenos *in vitro* no se ve afectada con la suplementación de biotina en el medio de cultivo (Zempleni et al 2001).

La administración de biotina a ratas normales aumentó la reactividad inmune, favoreciendo mayor producción de hemolisina en respuesta a la inoculación con eritrocitos de carnero y protegiendo de la infección con *Haemobartonella* a ratas esplectomizadas (Petrelli y Marsili 1969 citado en Petrelli 1981). La administración de biotina a ratas y humanos normales produjo un aumento de la fagocitosis *in vivo* e *in vitro* de *Staphylococcus epidermis* por neutrófilos (Petrelli y Marsili 1969 citado en Petrelli 1981).

Papel de la Biotina en la proliferación celular

Recientemente se demostró que en CMSP de humanos normales durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular se incrementa casi 3 veces la expresión del ARN que codifica para el transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) que internaliza a la biotina. En contraste, la cantidad de proteína del SMVT permaneció constante; los autores sugieren que esto se puede deber a que se esté expresando por "splicing" alternativo una isoforma del transportador, ya que el anticuerpo utilizado para cuantificar la cantidad de proteína reconoce al transportador SMVT de 69kD y a una proteína más pequeña de 48kD. También en este trabajo se demostró que durante la proliferación celular se incrementan la actividad y la expresión de las carboxilasas MCC y PCC así como la expresión de la HCS (Stanley et al 2002).

En un estudio que utilizó linfocitos periféricos humanos estimulados con Concanavalina A y PHA, se observó que la internalización de biotina fue de 2.78-7.22 veces mayor que en linfocitos no estimulados. Este incremento se considera específico pues no se asocia a un incremento en el transporte global ya que el transporte de otras moléculas como la urea permaneció constante. Se propone que puede deberse a un incremento en la síntesis de uno o más tipos de transportadores específicos para biotina. Las posibles causas que se proponen para esta mayor internalización

durante la proliferación de los linfocitos es la necesidad de biotinar las histonas que se unirán al ADN durante la replicación, o bien por un incremento en la demanda de carboxilasas biotiniladas ya que se encontró que la actividad de β -metilcrotonil-CoA fué 2.5 veces mayor en linfocitos en proliferación que en linfocitos no proliferantes (Zempleni et al 2000).

Se sabe que las células HeLa sufren un arresto en la fase G_0 cuando son incubadas en medio libre de biotina (Dakshinamurti *et al* 1985). Otro estudio demostró que se requiere de biotina en el medio de incubación para la generación *in vitro* de linfocitos T citotóxicos de bazo de ratón, posiblemente debido a su papel en la lipogénesis como grupo prostético de la ACC (Kung et al 1979).

JUSTIFICACIÓN

La información descrita anteriormente sugiere que la biotina además de su papel en el metabolismo, juega un papel importante en la respuesta inmune ya sea directa o indirectamente como cofactor de las carboxilasas. Para contribuir a dilucidar este supuesto papel, se caracterizó los efectos que sobre la respuesta inmune humoral provoca la deficiencia de biotina. Como se señaló anteriormente, en estudios previos de nuestro laboratorio se estableció un modelo experimental de ratones con deficiencia puntual de biotina que permite estudiar los mecanismos en los que esta vitamina está implicada.

Los estudios del efecto de la deficiencia de biotina en la producción de anticuerpos que se han realizado tanto en rata como en pacientes con DMC son muy controvertidos. Además se han utilizado solamente antígenos proteicos y la respuesta contra estos antígenos es T-dependiente. Sin embargo, los antígenos T-independientes tipo I y II, como se mencionó anteriormente, involucran procesos y poblaciones diferentes tanto de linfocitos B como de otros tipos celulares; por lo que es importante analizar el efecto de la deficiencia en biotina en la respuesta humoral usando el modelo de ratones que se tiene en el laboratorio, de esta manera se podrá detectar si la deficiencia de biotina afecta alguno de estos procesos o células en especial. De igual forma, ya que la producción de los diferentes isotipos de anticuerpos está regulada por distintos factores, la determinación de la cantidad de las distintas clases de anticuerpos (IgG, IgM e IgA) que inducen estos antígenos permitirá detectar procesos que pudieran estar siendo afectados.

HIPÓTESIS

La deficiencia de biotina afectará la cantidad y el tipo de anticuerpos que producen los ratones al ser inoculados con distintos antígenos.

OBJETIVOS GENERALES

Determinar el efecto de la deficiencia de biotina sobre la producción de anticuerpos específicos contra antígenos T-dependientes y T-independientes tipo I y tipo II, y sobre la cantidad de anticuerpos totales en suero.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Inmunizar animales de cada uno de los grupos experimentales (deficientes, suficientes y controles) con los siguientes antígenos:

- a) DNP-KLH (Antígeno T-dependiente)
- b) TNP-LPS (Antígeno T-independiente tipo 1)
- c) TNP-FICOL (Antígeno T-independiente tipo 2)

2.- Obtener muestras de suero de cada grupo de animales inmunizados con cada uno de los antígenos anteriores a diferentes tiempos después de la inoculación.

3.- Cuantificar entre los grupos experimentales los anticuerpos en suero específicos para TNP de los isotipos IgG, IgM e IgA.

4.- Comparar entre los grupos experimentales la cantidad total de anticuerpos (no específicos) de los isotipos IgG, IgM e IgA.

MÉTODOS

Animales

Se utilizó el modelo experimental establecido anteriormente (Baez et al 1998) con ratones machos Balb/cAnN de 4 semanas de edad proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los ratones de cada lote fueron pesados semanalmente como un control de su estado físico general y del efecto de la deficiencia sobre el crecimiento.

Alimentación

El grupo de ratones control se alimentó con una dieta comercial de mantenimiento para ratones en experimentación (Harlan Teklad, Cat. 7012, EUA). Los ratones del grupo deficiente recibieron una dieta depletante de biotina, que además de que carece de biotina contiene 30% de clara de huevo desecada como única fuente de proteína (Test Diet, Purina Cat. 44474). Los animales del grupo suficiente recibieron una dieta igual a la del grupo deficiente pero a la que se le adicionaron 4 mg de biotina/kg de alimento (Test Diet, Purina Cat. 44475).

Esquema de inmunización

Las inoculaciones se iniciaron a las 4 semanas de recibir la alimentación respectiva, puesto que a este tiempo ya se estableció la deficiencia de biotina (Baez et al 1998). En el caso de los antígenos timo dependientes cada ratón fue inoculado por vía intraperitoneal con 100 μg de DNP-KLH en 100 μl de PBS, y en el caso de los antígenos timo independientes con 25 μg de TNP-LPS o TNP-FICOL, en 100 μl de PBS. Se administraron 4 estímulos a los días 0, 14, 28 y 42 (la fecha del primer estímulo se considera el día 0). Se realizaron sangrados vía ocular, anestesiando a los ratones con éter, obteniendo de cada ratón aproximadamente 250 μl de sangre, y de esta 40 μl de suero mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 m. Los ratones fueron sangrados de manera alternada, es decir a la mitad de los ratones los días 0 y 30, a la otra mitad los días 15 y 42; el día 56 todos los ratones se sangraron a blanco y se sacrificaron por dislocación cervical.

Determinación de anticuerpos específicos para TNP y DNP por ELISA

Para comparar la cantidad de anticuerpos que fueron producidos en respuesta a los antígenos inoculados, se determinó los anticuerpos específicos para el hapteno 2,4-dinitrofenol (α -DNP) del antígeno mediante un análisis inmunosorbente ligado a una enzima (ELISA, del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) estandarizado en el laboratorio, el cual se describe a continuación.

Placas de fondo plano para ELISA se trataron 200 μ l/pozo de BSA (albúmina sérica bovina) al 1% en amortiguador Tris-HCL 0.125M, pH 9.5, durante 2h a 37°C. La placa se lavó cuatro veces con PBS (100 μ l/pozo) y una vez con amortiguador de boratos pH 8.5 (ácido bórico 0.2 M NaCl 0.15 M) y posteriormente se agregó ácido trinitrobencen sulfónico (TNBS) 1 mM en amortiguador de boratos (100 μ l/pozo) para obtener grupos TNP unidos a la albúmina pegada a la placa; a los blancos solo se agregó amortiguador de boratos (100 μ l/pozo). La placa se incubó 1 h a 37°C y se bloqueó con BSA al 2% en PBS (200 μ l/pozo) a 4°C toda la noche, cubierta de la luz. Después, se retiró la solución de BSA y se adicionaron 100 μ l/pozo de las diluciones del suero por analizar en PBS con BSA al 0.1%, así como un control positivo (Monoclonal 4F8 del isotipo IgG2b anti DNP: 1.17 mg/ml a una dilución 1:50) y uno negativo (solución de BSA al 0.1%). Los sueros problema se agregaron a una dilución determinada por ensayos previos de titulación de anticuerpos en los cuales se utilizaron varias diluciones de algunos sueros preinmunes e inmunes, con el propósito de asegurar que la cantidad de anticuerpos en cada pozo sea suficiente y permita ver diferencias entre los sueros. La placa con los sueros se incubó 2 h a 37°C, se lavó 4 veces con PBS (100 μ l/pozo) y luego se agregó el conjugado anti IgG, anti IgA o anti IgM de ratón hecho en cabra acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) en PBS con BSA al 0.1% (100 μ l/pozo) diluido 1:1250 para la IgG y 1:1000 en el caso de IgM e IgA. La placa nuevamente se incubó 2 h a 37°C y se lavó 4 veces con PBS antes de agregar 100 μ l/pozo del sustrato *p*-nitrofenil fosfato disódico (1mg/ml) en amortiguador de dietanolamina al 10% pH 9.8. Se incubó a temperatura ambiente hasta observar la aparición de un color amarillo y la reacción se paró agregando 50 μ l/pozo de NaOH 2N. La absorbancia se leyó a 405 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan *Ascen*).

ELISA para inmunoglobulinas totales.

Para comparar la cantidad de anticuerpos totales entre los grupos experimentales, se realizó una prueba de ELISA tipo sándwich que se describe a continuación:

Placas de fondo plano para ELISA se trataron con 100 μ l/pozo de anticuerpos hechos en conejo anti ratón IgG, IgM o IgA (Zymed) a una dilución 1:2 000 en PBS (a los blancos solo se les agregó PBS), a 4°C durante la noche. La placa se lavó cuatro veces con PBS (100 μ l/pozo) para eliminar el exceso de anticuerpo y luego se bloqueó con BSA al 2% en PBS (200 μ l/pozo) por 1 h a 37°C. Después de 4 lavados con 100 μ l de PBS con 0.05% de Tween 20 para eliminar el exceso de BSA, los sueros problema se agregaron a una dilución determinada por ensayos previos de titulación de anticuerpos en los cuales se utilizaron varias diluciones de algunos sueros, con el propósito de asegurar que la cantidad de anticuerpos en cada pozo sea suficiente y permita ver diferencias. Para determinar IgG se utilizó una dilución de 1:50 000, para IgA fue de 1:4 000 y para IgM de 1:3 000. Se agregaron 100 μ l/pozo de las diluciones de cada suero así como los controles (Monoclonal 4F8 IgG 2b Anti DNP 1.17 mg/ml a una dilución 1:50 y solución de BSA al 0.1%). La placa con los sueros se incubó durante 2 h a 37°C después de lo cual se lavó 3 veces con PBS-T y una vez con agua destilada. A continuación, se agregaron conjugados anti IgG, anti IgM o anti IgA de ratón hecho en cabra acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) diluido 1:1250 para la IgG y 1:1000 para IgM e IgA, en PBS con BSA al 0.1% (100 μ l/pozo) por 2 h a 37°C y se lavó como antes. Para revelar se utilizó el sustrato p-nitrofenil fosfato disódico (Zymed), a 1mg/ml en 100 μ l de amortiguador de dietanolamina al 10% pH 9.8. Se incubó a temperatura ambiente hasta observar la aparición de un color amarillo y se detuvo la reacción agregando 50 μ l/pozo de NaOH 2N. La absorbancia se leyó a 405 nm en el lector de ELISA.

Análisis estadísticos

Para analizar los datos del peso de los ratones y los datos de absorbancia de las pruebas de ELISA, se utilizó Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías no balanceados, con lo cual se determinó si existía diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. Para determinar entre cuáles grupos se encontraba las diferencias, se realizaron las pruebas estadísticas de Newman-Keuls, usando el programa **Statistica for Windows** (Stat Soft, Inc.)

RESULTADOS

I - Efecto de la deficiencia de Biotina sobre el peso de los ratones.

Los ratones utilizados en todos los experimentos fueron pesados semanalmente como un control de su estado físico, ya que como se mencionó anteriormente, estudios realizados en el laboratorio mostraron que los ratones con dieta depletante tuvieron una ganancia de peso menor en comparación con los ratones de los grupos control y suficiente (Baez-Saldaña et al 1998).

En todos los lotes de ratones estudiados, no hubo diferencia significativa entre el peso de los animales que recibieron las dietas control y suficiente; en cambio en todos los lotes de ratones con dieta depletante tuvieron, en algún momento de la experimentación, menor peso que los animales controles y suficientes (Figura 8A-F). Como se puede ver las diferencias estadísticamente significativas en el peso de los ratones deficientes se presentaron en diferentes semanas la 3ª, la 11ª, la 11ª, la 12ª y la 5ª respectivamente en los 5 lotes. Este comportamiento no puede ser atribuible a los antígenos ya que aún en los tres lotes inoculados con TNP-FICOL se observaron diferencias.

Aunque al inicio de la experimentación el peso de los ratones que recibieron la misma dieta fue estadísticamente diferente, en el curso de las 3 primeras semanas hasta el final del estudio el comportamiento de los distintos lotes con la dieta control o la dieta suficiente fue el mismo. En los 5 lotes de los ratones con dieta control, el peso se incrementó de manera continua con una ganancia de 5.2 a 7.2 g al final del estudio (Figura 8A-E). A su vez, los 5 lotes de los ratones con la dieta suficiente tuvieron el mismo comportamiento que los ratones control y la ganancia de peso fue de 5.7 a 7.8 g. (Figura 8A-E) En cambio las gráficas de peso de los ratones deficientes fueron estadísticamente diferentes entre sí. Presentaron un incremento de peso con una variación mayor entre los lotes, entre 1.5 y 6.8 g a partir del peso inicial, alcanzando el peso máximo entre las 8 y 10 semanas de iniciada la dieta, excepto en el lote inoculado con TNP-LPS donde no aumentan de peso a lo largo del experimento.

Cuando se analiza globalmente el peso de los ratones de todos los lotes, se observa que los ratones deficientes presentaron un peso estadísticamente menor que los controles y suficientes a partir de aproximadamente 7 semanas de recibir la dieta. Al igual que en el análisis individual de los lotes, no hubo diferencia significativa entre los pesos de los ratones control y suficientes. La ganancia de peso de los ratones con dieta suficiente y control fue de 6.5 y 6.8 g, respectivamente, alcanzando el promedio máximo a las 11 semanas; en cambio el grupo deficiente presentó una ganancia de peso total de 3.19 g alcanzando el peso máximo a las 9 semanas (Figura 9).

Peso corporal promedio

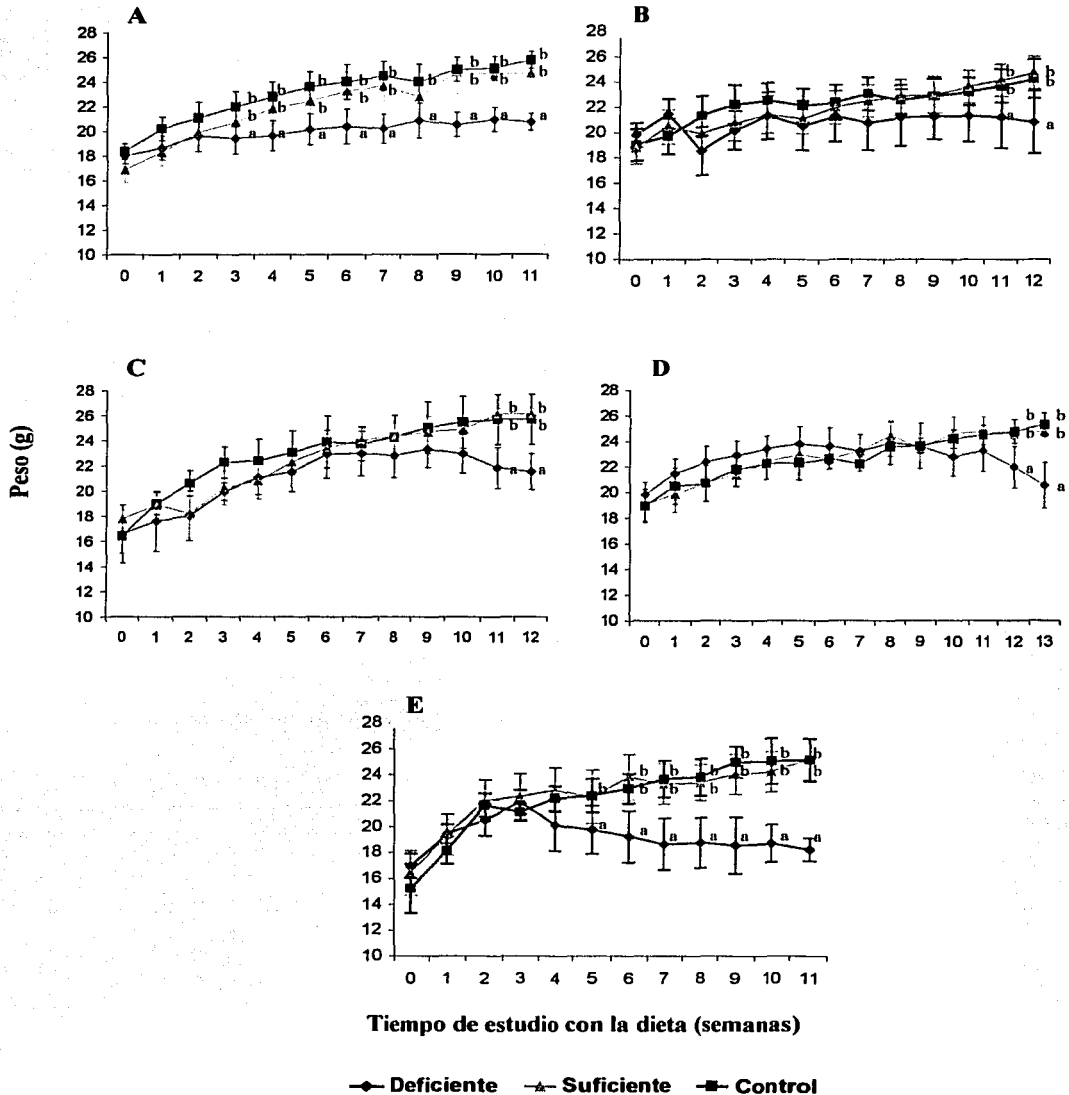


Figura 8. Promedio de peso corporal de los ratones inoculados con: DNP-KLH (A), TNP-LPS (B), TNP-FICOL primer lote (C), segundo lote (D) y tercer lote (E). Según el ANOVA de dos vías los ratones deficientes presentaron un peso distinto al de los ratones controles y suficientes en todos los lotes. Las diferencias significativas ($p < 0.01$) se indican con letras diferentes (a, b)

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Peso promedio corporal global.

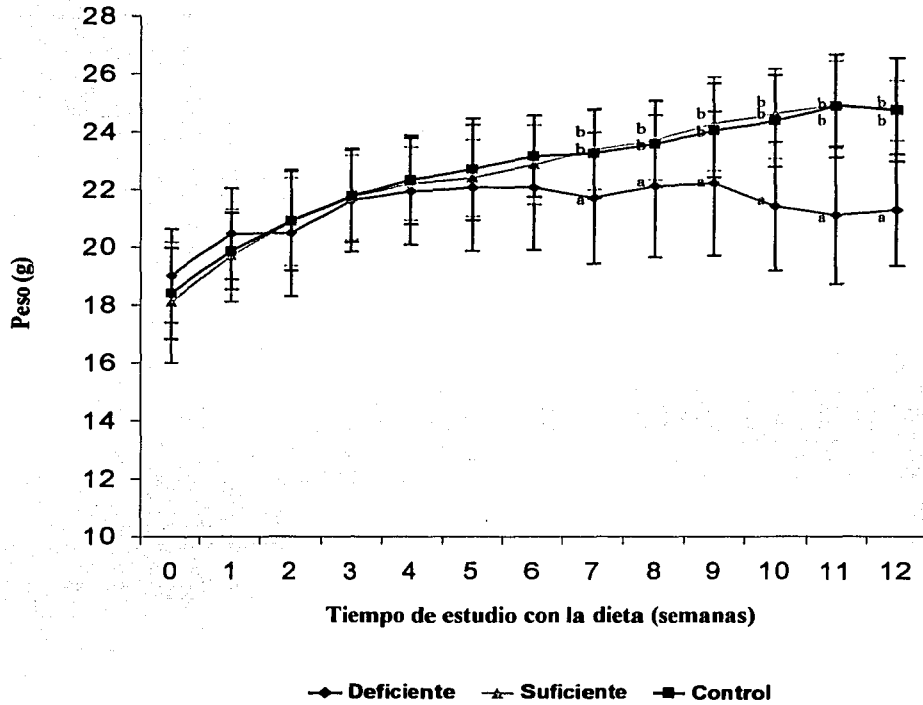


Figura 9. Promedio global de peso corporal. Según el ANOVA de dos vías los ratones deficientes presentaron un peso distinto al de los ratones controles. Las diferencias significativas ($p < 0.01$) se indican con letras diferentes (a, b).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II - Producción de anticuerpos contra el antígeno T-dependiente DNP-KLH

Para analizar el efecto de la deficiencia de biotina en la producción de anticuerpos contra antígenos timo dependientes, tres grupos experimentales fueron inoculados con DNP-KLH y se determinaron los anticuerpos específicos producidos contra el hapteno (DNP).

Se inició la experimentación con 6 grupos de ratones (2 grupos por dieta); los grupos de ratones deficientes y suficientes fueron de 7 individuos y los grupos de ratones control fueron de 6 individuos. Sin embargo, debido a la muerte de algunos ratones durante la experimentación (1 control, 3 deficientes y 4 suficientes), el análisis en algunos tiempos se realizó con un número menor de animales, en todos los casos fueron al menos 5 ratones por dieta.

Anticuerpos IgG específicos para DNP

Para analizar la producción de IgG anti DNP en respuesta al antígeno TD, se realizó un ELISA en todos los sueros diluidos 1:1000 debido a que la cantidad de anticuerpos en respuesta a este antígeno fue muy elevada. Se lograron detectar inmunoglobulinas del isotipo IgG específicas para DNP desde las 2 semanas de haber recibido el primer estímulo, las cuales se incrementaron con las inoculaciones posteriores. Hubo una alta variación entre los ratones que recibieron la misma dieta, principalmente entre los ratones que recibieron la dieta control a las 6 y 8 semanas (Figura 10A).

Los resultados del análisis de varianza de dos vías indican que hubo diferencias significativas ($p < 0.01$) en el patrón general de producción de anticuerpos entre los grupos que recibieron las distintas dietas. La prueba de Newman-Keuls, que considera el conjunto de todos los tiempos de muestreo indica que no hubo diferencia entre el grupo suficiente comparado con los otros dos grupos mientras que sí las hubo entre los ratones deficientes y los ratones control ($p < 0.01$), aunque esto sólo se observó a la 8 semanas cuando se analizó cada tiempo por separado (Figura 10A).

Anticuerpos IgA específicos para DNP

Se realizó un ELISA de todos los sueros extraídos en cada uno de los tiempos de sangrado para medir los anticuerpos IgA anti DNP. La dilución de suero usada en este ELISA fue 1:100.

Las inmunoglobulinas IgA apenas fueron detectables a las 2 semanas después del primer estímulo. La cantidad de IgA aumentó a las 4, 6 y 8 semanas en respuesta a las inmunizaciones posteriores. La densidad óptica en todos los casos fue baja; sin embargo, fue estadísticamente superior a la observada en los sueros preinmunes, $p < 0.01$ (Figura 10B).

Algunos ratones deficientes presentaron a las 8 semanas una cantidad de anticuerpos considerablemente más alta que el promedio, lo que ocasiona que la desviación estándar para este punto sea grande. El resto de los datos no presentó una alta dispersión.

Según el análisis de varianza no hubo una diferencia significativa en la producción de anticuerpos IgA anti DNP entre las dietas en respuesta a DNP-KLH (Figura 10B).

Anticuerpos IgM específicos para DNP

Para medir IgM anti DNP en los sueros de cada uno de los tiempos de estudio se realizó un ELISA utilizando las muestras diluidas 1:100 en PBS.

El promedio de la densidad óptica a las 2 semanas fue más alto que el de los sueros preinmunes, pero esta diferencia no fue significativa. A las 4 semanas se pudo detectar una respuesta pobre de IgM, misma que se mantiene constante hasta las 6 y 8 semanas. La cantidad de IgM detectada fue baja, debido probablemente a que la primera muestra de sangre se tomó dos semanas después de la inmunización y el máximo nivel de la respuesta de IgM pudo ocurrir antes de este tiempo. Sin embargo la densidad óptica obtenida para los sueros tomados a las 4, 6 y 8 semanas es estadísticamente mayor que la obtenida para los sueros preinmunes (Figura 10C). Como se puede ver en la gráfica no hubo una diferencia significativa entre los grupos experimentales en la producción de IgM anti DNP en respuesta a la inoculación con DNP-KLH.

Anticuerpos específicos para DNP en respuesta a DNP-KLH

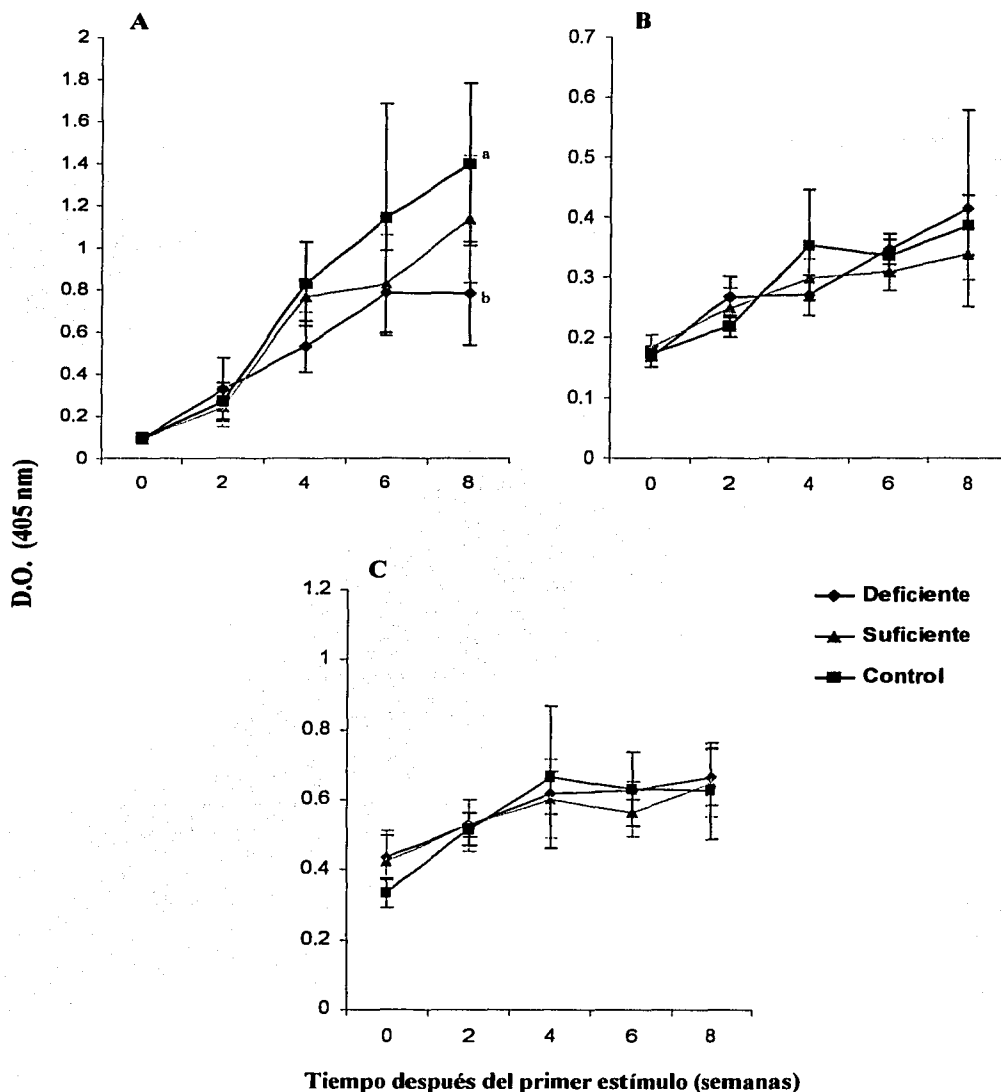


Figura 10. Producción promedio de IgG (A), IgA (B) e IgM (C) específicos para DNP en respuesta a inoculaciones con DNP-KLH. Según el ANOVA de dos vías no hubieron diferencias significativas para IgA e IgM entre los tres grupos de ratones mientras que para IgG hubo diferencia significativa entre el grupo control y el deficiente pero no entre el grupo suficiente y deficiente. Las letras distintas (a, b) indican las diferencias ($p < 0.01$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III - Producción de anticuerpos contra un antígeno T-independiente 1 (TNP-LPS)

Para analizar el efecto de la deficiencia de biotina en la producción de anticuerpos contra antígenos T-independientes tipo 1, los tres grupos experimentales fueron inoculados con TNP-LPS y se determinaron los anticuerpos producidos contra el hapteno (TNP).

Se inició la experimentación con 6 grupos de ratones (2 grupos por dieta). Los grupos de ratones deficientes y suficientes fueron de 7 individuos y los grupos de ratones control fueron de 6 individuos. Sin embargo debido a la muerte de 2 deficientes, 2 controles y 1 suficiente, no todos los datos se refieren al número inicial de individuos. No obstante, el análisis en todos los tiempos se realizó con al menos 5 ratones por dieta.

Anticuerpos IgG específicos para TNP

En el ensayo de ELISA para analizar la producción de anticuerpos IgG específicos para TNP se diluyeron los sueros 1:500. Desde las 2 semanas después de la primera inoculación la respuesta de IgG ya es detectable. A las 4 semanas, es decir dos semanas después de la segunda inoculación la respuesta de IgG aumentó marcadamente y continuó aumentando hasta las 6 semanas para mantenerse igual a las 8 semanas (Figura 11A).

La dispersión de los datos en los tres grupos en todos los tiempos es reducida, a diferencia de lo observado con los otros tipos de antígenos.

Los valores de densidad óptica se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, el cual indicó que no hubo diferencias significativas en la cantidad de anticuerpos producidos en ningún tiempo entre los grupos de ratones alimentados con las diferentes dietas.

Anticuerpos IgA específicos contra TNP

Para medir inmunoglobulinas del isotipo IgA anti TNP, se realizó un ELISA con sueros diluidos 1:100.

Los anticuerpos del isotipo IgA fueron detectados a las 2 semanas después de la primera inoculación y permanecieron constantes en los 4 tiempos de muestreo; sin incrementaron con las inoculaciones posteriores (Figura 11B).

Según el ANOVA de dos vías hubo diferencias en la cantidad de IgA entre los grupos de ratones alimentados con las diferentes dietas. La prueba de Newman-Keuls, indicó que la producción de anticuerpos por el grupo suficiente fue estadísticamente menor que los grupos control y deficientes $p < 0.01$ mientras que no hubo diferencia significativa entre los grupos control y deficiente. La comparación entre los 3 grupos en todos los tiempos no mostró diferencias significativas.

Anticuerpos IgM específicos para TNP

Los sueros analizados en el ELISA para el subtipo de anticuerpos IgM específicos para TNP se diluyeron 1:50.

La mayor cantidad de IgM se encontró a las 2 semanas después de la primera inoculación; la respuesta disminuyó para la semana 4 (dos semanas después de la segunda inoculación) y fue aún menor a las 6 y 8 semanas, después del tercer y cuarto estímulo respectivamente (Figura 11C).

El ANOVA de dos vías mostró que hubo diferencias en la cantidad de IgM entre los grupos de ratones alimentados con las diferentes dietas. Según la prueba de Newman-Keuls, tomando en cuenta todos los tiempos en conjunto, esta diferencia se encuentra entre el grupo suficiente y el grupo control, pero entre el grupo deficientes y el suficiente. Sin embargo comparando a los grupos en todos los tiempos por separado, no se encontraron diferencias significativas entre ningún grupo.

Anticuerpos específicos para TNP en respuesta a TNP-LPS

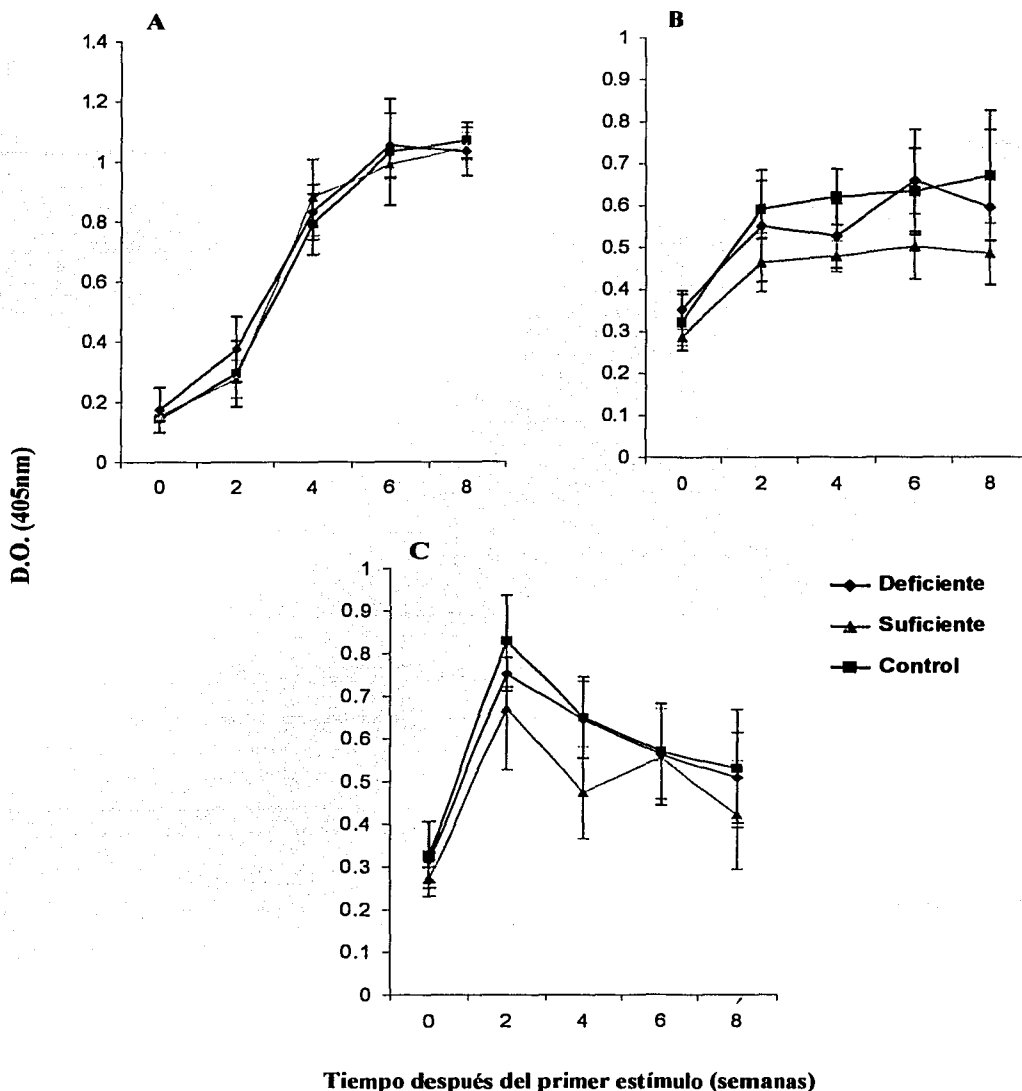


Figura 11. Producción promedio de IgG (A), IgA (B) e IgM(C) específicos para TNP en respuesta a TNP-LPS. Para el isotipo IgM hubo diferencias significativas ($p < 0.01$) en el patrón general entre los ratones control y suficientes, no entre los ratones suficientes y deficientes. Para el isotipo IgA hubo diferencias significativas al comparar con todos los tiempos a los deficientes y control contra los suficientes ($p < 0.01$). No se observaron diferencias comparando cada tiempo por separado.

IV - Producción de anticuerpos contra el antígeno T-independiente 2 (TNP-FICOL)

Para analizar el efecto de la deficiencia de biotina en la producción de anticuerpos contra antígenos T-independientes tipo 2 se experimentó con tres lotes de animales inoculados con TNP-FICOL y se determinaron los anticuerpos producidos contra el hapteno (TNP).

Debido a que los ratones deficientes presentaron infecciones en los ojos después del sangrado, para evitar los efectos de esta manipulación sobre la producción de anticuerpos y confirmar los resultados obtenidos en los lotes 1 y 2 los ratones del lote 3 fueron sangrados solo a las 6 y 8 semanas.

En el primer lote se inició la experimentación con 2 grupos de 3 ratones por dieta, sin embargo durante el tiempo de experimentación murieron 4 ratones deficientes, 4 ratones suficientes y 1 ratón control, por lo que en algunos tiempos de experimentación solo se analizaron 3 ratones por dieta. Para el segundo lote se utilizaron 2 grupos de 6 ratones con dieta control, 7 con dieta deficiente y 7 suficiente; debido a que durante la experimentación murieron 2 ratones deficientes y 1 suficiente en algunos tiempos solo se analizaron 5 ratones de alguna de las dietas. Para el tercer lote debido a la muerte de un ratón suficiente en todos los tiempos se analizaron 4 ratones suficientes, 5 deficientes y 5 controles.

Debido a que los ratones del lote 3 no fueron sangrados antes de la inoculación, para la determinación de anticuerpos de estos animales se utilizaron sueros preinmunes de los ratones del lote 2 y de los que fueron inoculados con KLH.

Anticuerpos IgG específicos para TNP

El ensayo se hizo con los sueros diluidos 1:50.

A pesar de que se siguió el mismo esquema de inmunización, el comportamiento que siguieron los distintos lotes fue diferente.

El análisis estadístico mostró que el primer lote que se inoculó con TNP-FICOL, hubo diferencia significativa entre los grupos de ratones alimentados con las diferentes dietas ($p < 0.02$). Según la prueba de Newman-Keuls, el patrón general de producción de IgG del grupo suficiente fue diferente a los de los grupos deficiente y control, presentándose a las 6 semanas un valor significativamente menor ($p < 0.01$). Cuando se comparan los tres grupos en cada tiempo, a las 6 semanas existe una diferencia significativa entre el grupo suficiente y deficiente ($p < 0.01$).

(Figura 12A). En cambio, en el segundo y tercer lote el análisis de varianza mostró que no hubo diferencias significativas entre los grupos que recibieron las distintas dietas ($p > 0.01$) (Figura 12B y C).

Con los tres grupos experimentales del primer lote, a las 2 semanas no se obtuvo una densidad óptica estadísticamente mayor a la de los sueros preinmunes mientras que en el segundo lote a las 2 semanas si pudo ser detectada una cantidad considerable de IgG. En el grupo control a las 4, 6 y 8 semanas, comparadas con la semana 2 y preinmune la concentración de IgG aumentó en mucha mayor proporción en el lote 1 que en el lote 2. En el grupo suficiente permaneció más o menos constante a las 2, 4, 6 y 8 semanas en los tres lotes. El grupo deficiente al igual que el suficiente permaneció constante desde las 2 a las 8 semanas en los lotes 2 y 3, mientras que en el lote 1 presenta un comportamiento similar al del grupo control, con un aumento significativo a las 4, 6 y 8 semanas con respecto a las 2 semanas (Figura 12).

Para analizar los datos combinados de los tres lotes, se normalizaron los datos con respecto a los valores de los sueros preinmunes de la siguiente forma:

Se obtuvo el promedio general de las medias de los sueros preinmunes de los tres lotes y se restó a todos los datos de cada lote la diferencia entre la media de los preinmunes del lote en cuestión y el promedio general, de forma que se nivelaran las medias de los sueros preinmunes (Figura 12D). El análisis estadístico indicó que no hubo diferencia significativa.

Anticuerpos IgA específicos para TNP

Para el análisis por ELISA de la respuesta anti DNP de tipo IgA los sueros se diluyeron 1:50.

Los resultados del análisis de varianza indican diferencias significativas entre las dietas en los tres lotes inoculados con TNP-FICOL; según la prueba de Newman-Keuls los ratones suficientes produjeron una cantidad de anticuerpos IgA significativamente menor que los ratones controles y deficientes en los tres lotes ($p < 0.01$). No hubo diferencias significativas entre los ratones deficientes y control (Figura 13). Analizando cada tiempo por separado, en el primer y tercer lote, hubo diferencia entre los ratones suficientes comparados con los ratones deficientes y control en las semanas 6 y 8 (Figura 13A); en el segundo lote hubo diferencias entre el grupo suficiente comparado con el deficiente a las 6 y 8 semanas y con el control solo a las 6 semanas (Figura 13B), sin embargo los ratones control no fueron diferentes de los deficientes en los tres lotes.

Al igual que para el isotipo IgG, la producción de IgA no fue igual en los tres lotes, fue mayor en el lote 1 y 3. En el lote 2 la concentración de IgA de los controles y deficientes a las 2 y 4 semanas no fue detectable (no hubo diferencia significativa comparando con preinmunes ($p>0.01$), mientras que en lote 1 la concentración de IgA en estas semanas si pudo ser detectada; a las 6 y 8 semanas la concentración de IgA de deficientes y controles fue detectable en los tres lotes, alcanzando cantidades más altas en los lotes 1 y 3. En los sueros del grupo suficiente en el lote 2 en ningún tiempo fue estadísticamente mayor que en los preinmunes, a diferencia de los lotes 1 y 3 donde en las semanas 6 y 8 la IgA si pudo ser detectada, aunque en ambos lotes fue baja (Figura 13).

Para analizar los datos combinados de los tres lotes, se normalizaron de la misma forma que para IgG. A pesar de las diferencias entre los lotes descritas anteriormente, el análisis de varianza de estos datos indica que los ratones suficientes produjeron una menor cantidad de inmunoglobulinas del isotipo IgA que los ratones controles y deficientes, sin diferencias significativas entre estos dos últimos grupos. El análisis de cada tiempo indica que las diferencias se encontraron a las 6 y 8 semanas ($p<0.01$) (Figura 13D).

Anticuerpos IgM específicos para TNP

Para analizar por ELISA la respuesta de anticuerpos anti DNP del isotipo IgM se utilizaron los sueros diluidos 1:50.

Según el análisis de varianza no hubo diferencias significativas en la producción de IgM entre ninguna de las dietas en ninguno de los lotes analizados (Figura 14).

A diferencia de lo que ocurre con los isotipos IgG e IgA, la respuesta de IgM fue un poco más alta en el lote 1 y 3 que en el lote 2. Los tres grupos experimentales del lote 2 presentaron una respuesta de IgM detectable (estadísticamente mayor que en los preinmunes) desde las 2 semanas después del primer estímulo, aumentando para la semana 4 y se mantuvo igual en las semanas 6 y 8. En los lotes 1 y 3 la concentración de IgM en los ratones controles y deficientes fue detectable en las semanas 6 y 8, y en los ratones suficientes solo en la semana 8 (Figura 14).

Para analizar los datos combinados de los tres lotes se normalizaron como ya se describió para IgG e IgA. El análisis estadístico indica que no hubo diferencias significativa entre las dietas ($p>0.01$).

Anticuerpos IgG específicos para TNP en respuesta a TNP-FICOL

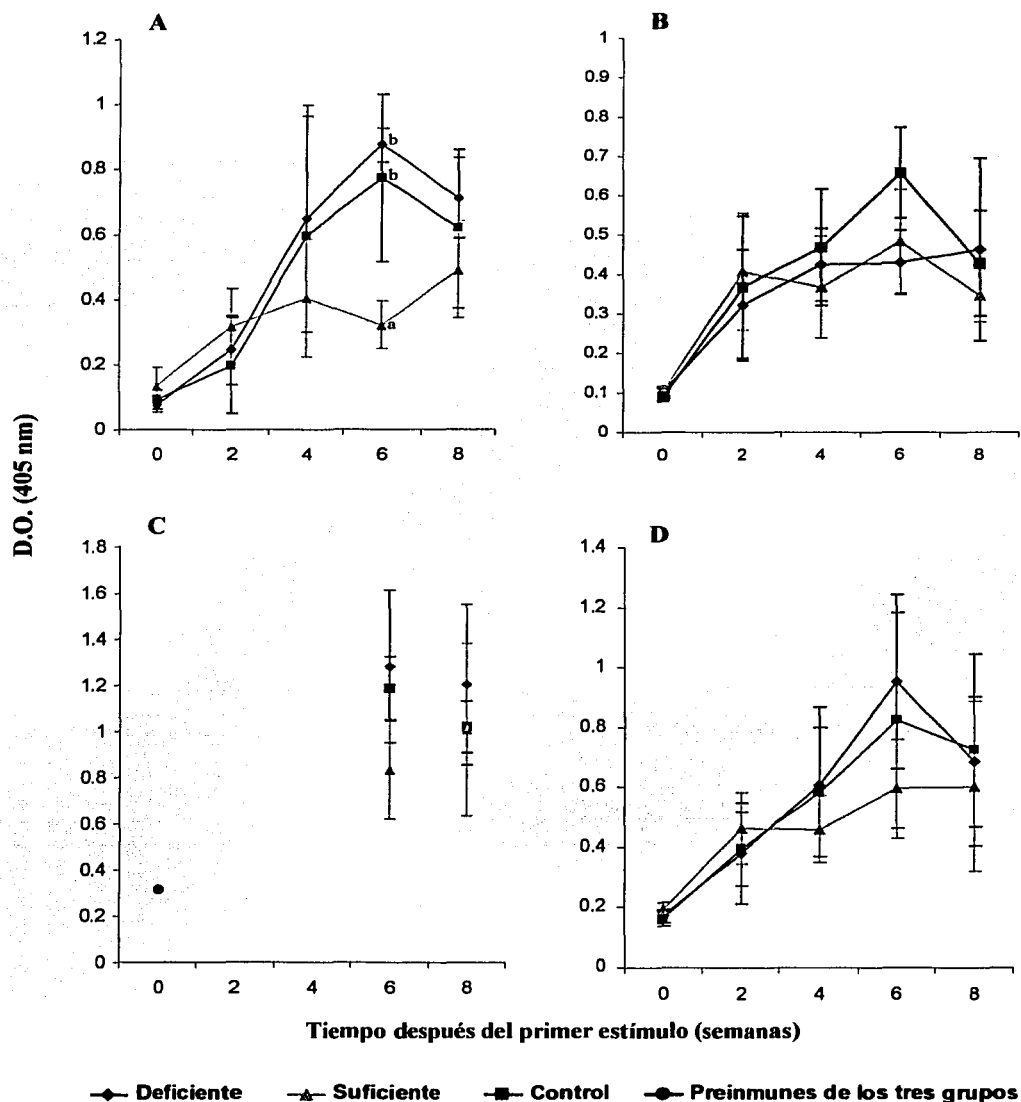


Figura 12. Promedio por dieta de la producción de anticuerpos IgG anti TNP en los tres lotes de ratones inmunizados con TNP-FICOL. Primer lote (A), Segundo lote (B), Tercer lote (C). Promedio de los 3 lotes, normalizados con el valor del promedio de los preinmunes (D). Según el ANOVA de dos vías existe diferencia en el primer lote comparando el grupo suficiente con el control y el deficiente. Las diferencias significativas ($p < 0.01$) se indican con letras diferentes (a, b).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anticuerpos IgA específicos para TNP en respuesta a TNP-FICOL

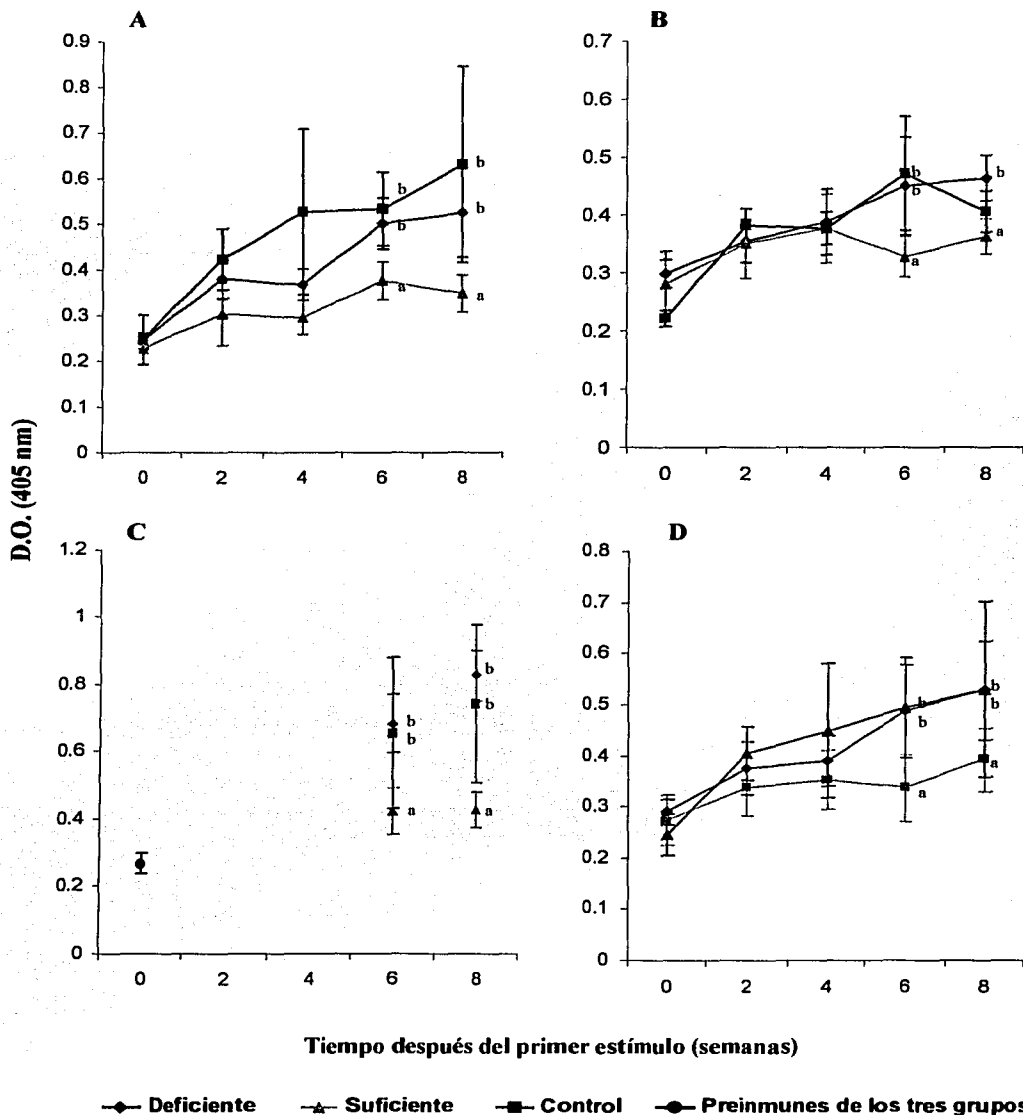


Figura 13. Promedio por dieta de la producción de anticuerpos IgA anti TNP en los tres lotes de ratones inmunizados con TNP-FICOL. Primer lote (A), Segundo lote (B), Tercer lote (C). Promedio de los 3 lotes, normalizados con el valor del promedio de los preinmunes (D). Existen diferencias ($p < 0.01$) en el patrón general entre el grupo suficiente comparado con el control y deficiente. Las diferencias significativas ($p < 0.01$) se indican con letras diferentes (a, b).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anticuerpos IgM específicos para TNP en respuesta a TNP-FICOL

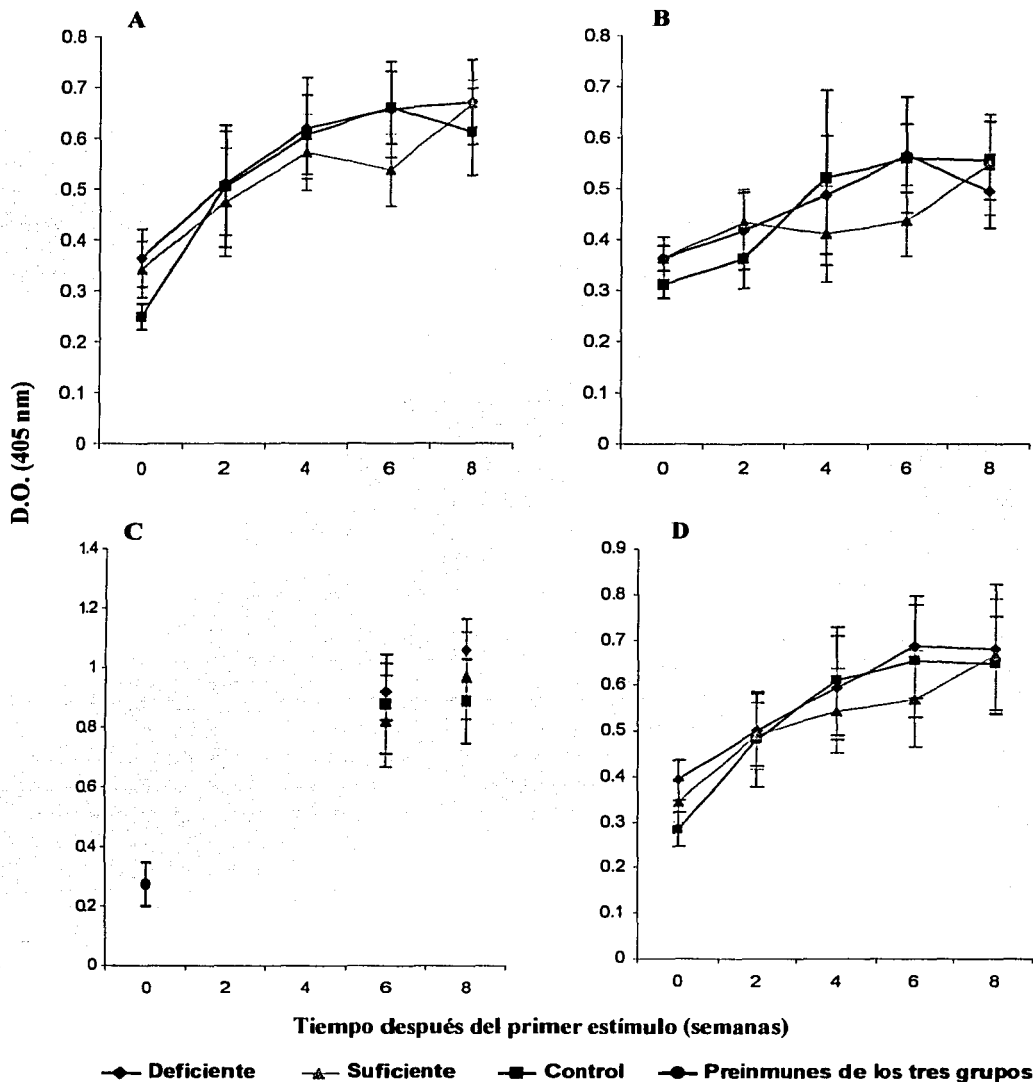


Figura 14. Promedio por dieta de la producción de anticuerpos IgM anti TNP en los tres lotes de ratones inmunizados con TNP-FICOL. Primer lote (A), Segundo lote (B), Tercer lote (C). Promedio de los 3 lotes, normalizados con el valor del promedio de los preinmunes (D). El tiempo 0 para analizar el tercer lote se utilizó un suero preinmune de cada dieta de otros lotes de ratones (TNP-KLH y TNP-FICOL). No existen diferencias significativas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V - Concentración total de anticuerpos

IgG total

Para comparar la cantidad de anticuerpos IgG en el suero de los animales de los distintos grupos experimentales se realizó un ELISA tipo sándwich. Se probaron los sueros obtenidos de los animales inmunizados con TNP-FICOL a una dilución 1:50 000.

Según el análisis de varianza existe una diferencia significativa entre los grupos. El análisis de datos con la prueba de Newman-Keuls mostró que el grupo deficiente comparado con los grupos suficiente y control presentó una mayor cantidad de anticuerpos tomando en cuenta todos los tiempos ($p < 0.01$). Comparando cada tiempo se encuentran diferencias a las 8 y 12 semanas de recibir la dieta. (Figura 15A).

IgM total

Para medir la cantidad de anticuerpos IgM totales se utilizaron los sueros diluidos 1:4000 de los ratones que fueron inoculados con TNP-KLH. Según el análisis estadístico no hubo diferencias en la cantidad de IgM total entre las dietas en ningún tiempo (Figura 15B).

IgA total

Para medir IgA total se realizó el ELISA utilizando una dilución 1:3000 de los ratones que fueron inoculados con TNP-KLH y TNP-FICOL.

No hubo diferencias significativas en la cantidad de anticuerpos entre los grupos con las diferentes dietas (Figura 15 C y D).

Concentración total de anticuerpos

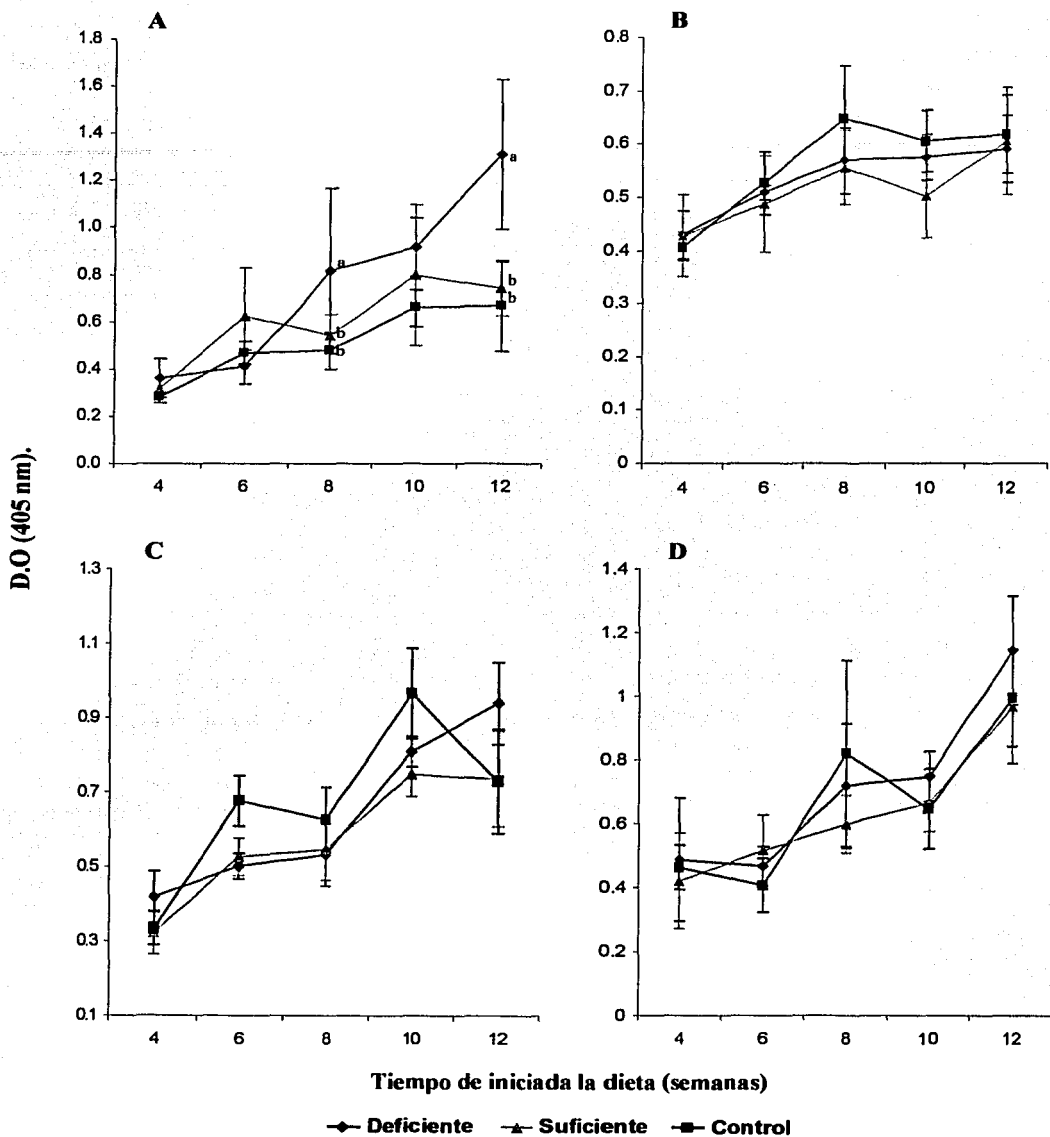


Figura 15. Promedio por dieta de la concentración total de anticuerpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) total de ratones inmunizados con TNP-FICOL. (D) IgA total en el lote inoculado con DNP-KLH. Solo hay diferencias significativas ($p < 0.01$) en la producción de IgG entre el grupo deficiente comparado con los grupos suficiente y control. Las diferencias en cada tiempo se indican con letras distintas (a, b).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Uno de los parámetros más utilizados para medir deficiencias nutricionales es el peso corporal, en el presente estudio se observaron las diferencias significativas en el peso de los ratones deficientes a partir de la séptima semana de experimentación, lo que concuerda con el reporte previo de nuestro laboratorio en donde las diferencias fueron significativas a partir de la sexta semana (Baez-Saldaña et al 1998).

A pesar de que se utilizaron lotes de ratones de la misma cepa y edad, se observaron algunas diferencias entre los lotes que recibieron el mismo tratamiento; se desconocen las causas de estas diferencias. Una posibilidad es que los lotes fueron estudiados en diferentes meses y horas. Algunos se pesaron alrededor de las 11:00 am y otros aproximadamente a las 5:00 pm. Se sabe que los organismos presentan ciclos cronobiológicos endógenos (presentan oscilaciones espontáneas en condiciones ambientales constantes) de ingesta de alimento, de tasas metabólicas y de peso corporal, los cuales está demostrado que se presentan en roedores tanto de manera anual como circadiana (Dennis et al 2001, Steven et al 2002). Debido a que la biotina desempeña un papel importante en el metabolismo, su utilización y por lo tanto su requerimiento podría estar modificado por estos ciclos biológicos; por lo tanto, la falta de esta vitamina podría afectar de manera distinta a los ratones en diferentes épocas del año. Adicionalmente, ya que la ingesta de alimento también se modifica durante el año, la cantidad de avidina que consumieron los ratones pudo ser diferente, y por consiguiente la cantidad de biotina disponible en los animales deficientes también pudo ser diferente. Con respecto a la hora en que fueron pesados, es posible que las diferencias en el peso entre los grupos experimentales sean mayores a diferentes horas del día, ya que se sabe que el peso corporal cambia de manera circadiana, de manera dependiente de la ingesta de alimento y de agua; como los animales control y suficientes ingieren mayor cantidad de alimento su peso se vería modificado en mayor proporción que el peso de los animales deficientes.

Las observaciones de las características físicas y clínicas de los ratones fueron utilizadas como indicadores del estado funcional de la vitamina. Desde las 4 semanas después de iniciada la experimentación, casi todos los ratones del grupo deficiente presentaron el pelo erizado y

adoptaron la posición encorvada también llamada de canguro. También desde este momento, los ratones del grupo deficiente presentaron evidencias de un sistema inmune deprimido, situación característica de los animales deficientes de la vitamina, ya que entre el 70 y 100% de los ratones presentaron infección en los ojos subsecuentes al sangrado o sin causa aparente, también presentaron diarreas recurrentes y dermatitis perianal. Adicionalmente la mayoría de los ratones deficientes presentaron alopecia periorificial a partir de la semana 10 aunque ninguno llegó a presentar alopecia generalizada. Ninguno de los síntomas mencionados se observaron en los ratones con dietas control y suficiente.

También se realizaron determinaciones de actividad específica de las carboxilasas (ACC, PCC y PC) en el hígado de un ratón por dieta, del lote inoculado con TNP-KLH a las 4, 8 y 10 semanas de iniciada la experimentación. En estos ensayos, los animales del grupo deficiente presentaron entre 60 y 80% menor actividad específica de estas enzimas en comparación con los ratones control y suficientes (datos no mostrados). Este análisis se considera como uno de los indicadores más precisos de la deficiencia de biotina, y aunque en este estudio solo se analizó un ratón de cada dieta, en el laboratorio se hicieron estas determinaciones en un número mayor de ratones involucrados en un proyecto simultáneo y los resultados también fueron similares a los reportados anteriormente (Baez et al 1998).

A diferencia de algunos estudios en ratas deficientes de biotina donde la producción de anticuerpos fue menor en respuesta a la inoculación con los antígenos T-dependientes toxoide diftérico y eritrocitos de carnero (Pruzansky et al 1955, Kumar et al 1978 y Rabin 1983), en el presente estudio la deficiencia de biotina en ratones Balb/cAnN no afectó la respuesta humoral de los isotipos IgG, IgM e IgA contra el antígeno T-dependiente TNP-KLH. Nuestros resultados concuerdan con un trabajo reciente en donde ratas deficientes de biotina no presentaron una producción de IgG disminuida después de la inoculación con polisacárido capsular de *H. influenzae* conjugado con toxoide tetánico (Helm et al 2001). Este conjugado, al presentar polisacáridos y proteínas, induce la producción de anticuerpos mediante las vías T-dependiente y T-independiente (Mond et al 1995). No obstante, las discrepancias con los trabajos de Pruzansky et al 1955, Kumar et al 1978 y Rabin 1983 podrían deberse a que la deficiencia de biotina afectara de manera distinta a las ratas y a los ratones ya que la utilización de las vías metabólicas

por las dos especies no es exactamente igual (Shuet-Hing et al 1998, Inoue et al 1999).

Como se mencionó en los antecedentes, en algunos niños con DMC se observó disminución en la respuesta inmune humoral ya que no presentaron respuesta contra antígenos de *Candida* ni KLH, con baja concentración total de IgA, y niveles normales de IgM e IgG (Cowan et al 1979). Sin embargo, estas determinaciones fueron normales en otros pacientes con DMC (Cowan et al 1979, Throene et al 1981). Las alteraciones en la respuesta inmune humoral tanto en los modelos experimentales como en los pacientes con DMC podrían ser una consecuencia de otros padecimientos colaterales que sufren estos sujetos, como por ejemplo, la candidiasis crónica mucocutánea la cual está reportado que causa deficiencia de IgA e hipergammaglobulinemia (Edwards et al 1979, Aurulanantham et al 1979, en Cowan et al 1979). Podría decirse que esta infección es característica en los individuos con DMC ya que casi todos los pacientes la presentaron y se sabe que ocasiona dermatitis periorificial. Cabe mencionar que en los reportes de animales deficientes de biotina se indica frecuentemente que tuvieron dermatitis periorificial aunque no se hizo el análisis específico de esta infección.

No se encontraron antecedentes donde se estudie exclusivamente la producción de anticuerpos contra antígenos TI en animales deficientes de biotina. En este trabajo se analizó la respuesta humoral contra TNP-LPS un antígeno TI-1 y contra TNP-FICOL un antígeno TI-2. Se observó que los ratones deficientes no presentaron una respuesta humoral deprimida de ninguno de los isotipos analizados (IgM, IgG, o IgA) en respuesta a ambos tipos de antígenos. Sin embargo, el grupo suficiente presentó una cantidad de anticuerpos de la clase IgA específicos para TNP, estadísticamente menor ($p < 0.01$) que los grupos deficiente y control en respuesta a los dos antígenos T-independientes. En este grupo la respuesta a TNP-FICOL tuvo una diferencia significativa tomando en cuenta todos los tiempos y si se compara cada tiempo mediante la prueba de Newman-Keuls, se observaron diferencias significativas a las 6 y 8 semanas de experimentación, $p < 0.01$. Cuando los ratones suficientes fueron inoculados con TNP-LPS solo presentaron diferencias al comparar con controles y deficientes si se toma en cuenta todos los tiempos en conjunto, pero no comparando cada tiempo en particular mediante la prueba de Newman-Keuls.

La producción de IgG específica para TNP en respuesta a la inmunización con TNP-LPS no fue diferente entre los ratones que recibieron las tres dietas ($p > 0.01$). En los ratones suficientes,

solo en el primer lote inoculado con TNP-FICOL, la cantidad de IgG específica para TNP fue estadísticamente menor que en los deficientes y controles. Sin embargo, en el tiempo donde se presenta la diferencia se tuvo solo 3 ratones por dieta, en lugar de por lo menos 5, además la diferencia desapareció en el análisis global de los resultados. Estos resultados nos permiten concluir que la respuesta de IgG no es afectada por la deficiencia de biotina contra antígenos T-independientes.

Por otra parte la respuesta de IgM contra los antígenos T-independientes inoculados, al igual que la respuesta de IgG no fue afectada por la deficiencia de biotina, ya que no hubo diferencia significativa ($p > 0.01$).

Aunque el protocolo experimental que se aplicó a los tres lotes de ratones inoculados con TNP-FICOL fue el mismo, como se describe en los resultados, el comportamiento en la producción de anticuerpos fue distinto. Consideramos que estas diferencias pudieran ser también una consecuencia de los ciclos cronobiológicos. Como se mencionó anteriormente los lotes de ratones fueron manejados en diferentes épocas del año y en distintos horarios. La inoculación al segundo lote con TNP-FICOL se realizó entre las 10 am y la 1 pm; el primer lote se inoculó alrededor de las 6 pm (un poco antes de iniciar el periodo de oscuridad), y al tercer lote con TNP-FICOL entre 3 y 5 pm. Se sabe que la respuesta inmune tanto celular como humoral presenta ritmos tanto circadianos (Deprés-Brummer et al 1997, Esquifito, 1996, Smolensky et al 1999, Petrovsky et al 1998, Plytyez et al 1997, Russel et al 1999) como circanales (Smolensky et al 1999, Mann et al 2000, Plytyez et al 1997) relacionados con modificaciones hormonales cíclicas. Se ha reportado que en los ratones hay ritmos circadianos en la producción de citocinas ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-1, IL-12) con una mayor secreción durante la noche y al amanecer cuando los niveles de cortisol son más bajos (Petrovsky et al 1998). También se han descrito ritmos circadianos en la concentración sérica de IL-1- β , IL-6 e IL-10 (Gudewill et al 1999 en Petrovsky et al 1997). En humanos, se ha visto que la proporción de las secreciones de $IFN-\gamma/IL-10$ en respuesta a la estimulación con LPS o toxoide tetánico presenta oscilaciones diarias, con el mayor pico en la mañana cuando la concentración de cortisol en el plasma es más alta y la concentración de melatonina es menor. Debido a que estas citocinas son marcadores de las respuestas Th1 y Th2 respectivamente, se concluye que el balance entre las respuesta Th1/Th2

presenta ritmicidad circadiana con una tendencia hacia una respuesta tipo Th1 durante la noche y en la mañana (Petrovsky et al 1997). En ratones Balb/c también se han reportado ritmos circadianos en la respuesta inmune humoral al ser inoculados con SRBC y con antígenos T-independientes como polivinilpirrolidona. Se observaron dos picos de producción de anticuerpos, el más alto en la mañana y el menor al inicio de la fase de oscuridad, lo cual correlaciona con ciclos circadianos en la cantidad de linfocitos T y B en el bazo (Hayashi et al 1982, 1985). Entre los principales reguladores de estos ciclos se encuentra los corticosteroides (Kawate et al 1981 citado en Hayashi et al 1982).

En los ratones suficientes la menor producción de IgA en respuesta a antígenos T-independientes en comparación con los animales control podría deberse a un exceso de biotina, es decir, que en los ratones suficientes la cantidad ingerida que no es capturada por la avidina del huevo sea mayor que la biotina que ingieren los animales control. Se ha reportado que cerdos suplementados con 880 ppb de biotina tuvieron una disminución en la cantidad de anticuerpos producidos contra eritrocitos de carnero (Kornegay et al 1988). En humanos se ha visto que la administración de dosis farmacológicas causa un decremento en la proliferación de linfocitos y en la síntesis de IL-1 β e IL12. Se propone que entre los mecanismos que podrían explicar este fenómeno se encuentra el efecto de la biotina en la regulación de algunos genes, específicamente los de citocinas (Zempleni et al 2001).

Otra posibilidad podría ser que la diferencia en la producción de IgA entre los ratones suficientes y controles esté relacionada con la composición del alimento respectivo ya que se sabe que los componentes del alimento modifican el funcionamiento del sistema inmune. El de los suficientes contiene 30% de clara de huevo cruda y el alimento control está preparada con 19% de proteínas de distintas fuentes y no tiene clara de huevo, por lo que las dietas presentan diferente contenido de aminoácidos. Sin embargo, con excepción de la biotina, la composición de la dieta de los animales deficientes y la de los suficientes es la misma, por lo que se puede concluir que la diferencia entre los ratones suficientes y deficientes se debe a la diferencia en la cantidad de biotina de que disponen estos ratones.

El factor más importante que regula el cambio de isotipo hacia IgA es el TGF- β . *In vitro* induce selectivamente la secreción de IgA por linfocitos activados con LPS (TI-1) y con IgD-

dextrana (TI-2). TGF- β también estimula la secreción de IgG2b en linfocitos activados por LPS. *In vivo* esta citocina también incrementa la secreción de IgA por linfocitos B estimulados por células T, por LPS o por anticuerpos anti IgD acoplados a dextrano. Algunos estudios indican que TGF- β incrementa entre 20 y 25 veces la cantidad de linfocitos activados por LPS que secretan IgA. Sin embargo, esta citocina por sí sola induce un incremento relativamente pequeño en el porcentaje de linfocitos B mIgA⁺, lo cual sugiere que *in vivo* hay otros estímulos que colaboran en la producción de IgA. Entre estos estímulos se encuentran citocinas como IL-5 e IL-4 que selectivamente incrementan la secreción de IgA promoviendo la maduración de los linfocitos B mIgA⁺, pero no el cambio de isotipo de linfocitos B mIgA⁻ (Paul et al 1999). Adicionalmente, se sabe que TGF- β inhibe la proliferación de células B y resulta interesante que inhibidores del ciclo celular como la timidina e hidroxIUrea, al igual que TGF- β , incrementan selectivamente el número de linfocitos B que secretan IgA en respuesta a LPS (Paul et al 1999). Estos datos sugieren dos posibilidades: (a) que los resultados descritos se deban a que la biotina podría participar *in vivo* como un inhibidor fisiológico de la proliferación de células B, y de manera semejante a la timidina e hidroxIUrea, inducir el cambio de isotipo hacia IgA ó (b) que los ratones deficientes de biotina podrían tener una mayor cantidad de TGF- β que los ratones suficientes y consecuentemente que los resultados descritos se deban a esto, por lo cual sería interesante medir niveles de TGF- β , tanto en animales deficientes como en animales a los que se les suministre dosis altas de biotina.

En lo que respecta a la cantidad de anticuerpos IgG totales en suero, se observó que en ratones deficientes que fueron inoculados con TNF-FICOL se obtuvo una mayor concentración de anticuerpos que los ratones control y suficientes a las 8 y 12 semanas de iniciada la dieta ($p < 0.01$). Mientras que no se encontraron diferencias significativas en la concentración total de IgA en los sueros de ratones inoculados con TNP-FICOL o con DNP-KLH.

En la cantidad de anticuerpos IgM e IgA totales en suero no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

En general con estos resultados se puede concluir que la respuesta humoral no es deprimida por la deficiencia de biotina en los ratones; por el contrario, observamos un aumento discreto

pero significativo en la producción de IgA en respuesta a los antígenos T-independientes I y II, en los ratones deficientes. Estas diferencias no se reflejaron en la cantidad total de IgA. Sin embargo presentaron una cantidad mayor de IgG sérica total. Como se mencionó en los antecedentes, en los reportes publicados antes de iniciar el presente estudio, se observó una respuesta deprimida en ratas con el mismo tiempo de tratamiento. Esto podría sugerir que la respuesta humoral de los ratones Balb/c es menos susceptible a la deficiencia de biotina que la de las ratas y aunque en el momento de inocular a los ratones las actividades de las carboxilasas estaban deprimidas entre 60 y 70% (Baez et al 1998), la biotina remanente podría ser suficiente para cubrir las necesidades de la célula implicadas en la respuesta humoral. Sin embargo en acuerdo con nuestros resultados en un estudio más reciente (Helm et al 2001), también efectuado en ratas con 4 semanas de tratamiento, no se encontró una respuesta de IgG disminuida al ser inmunizadas con polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* conjugado con toxoide tetánico en los animales deficientes. Como ya se comentó, a las 4 semanas de experimentación los ratones deficientes presentaron claras evidencias de un sistema inmune deprimido, además de alteración el peso y las poblaciones de linfocitos T (Baez et al 1998). Por lo tanto, proponemos que la depresión del sistema inmuneológico en los ratones deficientes de biotina se debe principalmente a alteraciones en la inmunidad celular más que en la humoral, posiblemente en la inmunidad innata ya que los ratones deficientes presentaron infecciones oculares entre las 24 y 48 horas después del sangrado por esa vía.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahonkhai VI, Lukacs LJ, Jonas LC, Calandra GB. 1991. **Clinical experience with PedvaxHIB, a conjugate vaccine of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-*Neisseria meningitidis* outer membrane protein.** Vaccine, 9(suppl):38-41.
- Báez Saldaña Armida. 1998. **Cambios en las proporciones de los linfocitos de bazo y timo causados por la deficiencia de biotina.** Tesis para obtener el título de Doctora en Bioquímica. Facultad de Química. UNAM.
- Báez-Saldaña A, Díaz G, Espinoza B, Ortega E. 1998. **Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice.** Am J. Clin Nutr, 67:431-7
- Baumgartner R, Sourmala T. 1999. **Inherited defects of biotin metabolism.** Biofactors, 10:287-94.
- Bondada S, Wu HJ, Robertson DA. 2001. **Accessory cell defect in unresponsiveness of neonates and aged to polysaccharide vaccines.** Vaccine, 19:557-569.
- Bülow GU, Deursen JM, Bram JR. 2001. **Regulation of the T-independent humoral responses by TACI.** Immunity, 14:573-582.
- Caetano RS. 2001. **Dendritic cells as sensors of infection.** Immunity, 14:495-498.
- Carandente F, Angeli A, De Vecchi A, Dammacco F, Halberg F. 1988. **Multifrequency rhythms of immunological functions.** Chronobiology, 15:7-23.
- Chauhan J, Dakshinamurti K. 1991. **Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats.** The Journal of Biological Chemistry, 266:100035-100038.
- Collins JC, Paietta E, Green R, Morell AG, Stocker RJ. 1988. **Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2.** The Journal of Biological Chemistry, 263:11280-11283.
- Cowan MJ, Wara DW, Packman S, Ammann AJ, Yoshino M, Sweetman L, Nyhan W. 1979. **Multiple biotin dependent carboxylase deficiencies associated with defects in T-cell and B-cell immunity** Lancet, 2:112-8.
- Deprés-Brummer, P, Bourin P, Pages N, Metzger G, Lévi F. 1997. **Persistent T lymphocyte rhythm despite suppressed circadian clock outputs in rat.** Am. J. Physiol, 273:R1892-9.
- Esquifino AI, Selcas L, Arce A, Maggiore DV, Cardinali DP. 1996. **Twenty-four-hour rhythms in immune responses in rat submaxillary lymph nodes and spleen: effect of cyclosporine.** Brain, Behavior and Immunity, 10:92-102.

- Fagarasan S, Honjo T. 2000. **T-Independent immune response: new aspects of B cell biology.** *Science*, 290:89-92.
- Gehad AE, Lillehoj HS, Hendricks III, Mashaly MM. 2002. **Initiation of humoral immunity. II. The effects of T-independent and T-dependent antigens on the distribution of lymphocyte populations.** *Developmental and Comparative Immunology*, 26:761-771.
- Gumperz JE, Brenner MB. 2001. **CD1-specific T-cells in microbial immunity.** *Current Opinion in Immunology*, 13:471-478.
- Haus E, Smolensky MH. 1999. **Biologic rhythms in the immune system.** *Chronobiol*, 16(5):581-622
- Hayashi O, Kikuchi M. 1985. **The influence of phase shift in the light-dark cycle on humoral immune responses of mice to sheep red blood cells and polyvinylpyrrolidone.** *The Journal of Immunology*, 134(3):1455-61
- Hayashi O, Kikuchi M. 1982. **The effects of the light-dark cycle on humoral and cell-mediated immune responses of mice.** *Chronobiol*, 9(3):291-300.
- Helm RM, Mock NI, Simpson P, Mock DM. 2001. **Certain immune markers are not good indicators of mild to moderate biotin deficiency in rats.** *J. Nutr*, 132:3231-3236.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB. 1999. **Phylogenetic perspectives in innate immunity.** *Science*, 284(21):1313-1318.
- Inoue H, Castagnoli K, Schyf CVD, Mabic S, Igarashi K, Castagnoli N. 1999. **Species-dependent differences in monoamine oxidase A and B-catalyzed oxidation of various C4 substituted 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinyl derivatives.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 291:856-863.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt R, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. 2001. **Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptor and respond to different microbial antigens.** *J. Exp. Med*, 194(6):863-869.
- Kaisho T, Akira S. 2002. **Toll-like receptors as adjuvant receptors.** *Biochimica et Biophysica*, 1598:1-13.
- Kantor AB. 1991. **The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells).** *Immunol Today*, 12:389-391.
- Kolb C, Fuch D, Weiler E. 1993. **The Thymus-independent antigen $\alpha(1-3)$ dextran elicits proliferation of precursors for specific IgM antibody-producing cell (memory cells), which are revealed by LPS stimulation in soft agar cultures and detected by immunoblot.** *Eur J. Immunol*, 23:2959-2966.

- Kornegay ET, Heugten PHG, Blodgett DJ. 1989. **Effects of biotin and high copper levels on performance and immune response of weanling pigs.** *J. Animal Sci*, 67:1471-1477.
- Kumar M, Axelrod AE. 1978. **Cellular antibody synthesis in thiamin, riboflavin, biotin and folic acid-deficient rats.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 157:421- 423.
- Kumar R. 1996. **Nutrition, Immunity and Infection: From basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival.** *Proc. Natl. Acad. Sci*, 33:14304-14307.
- Kung JT, Mackenzie CG, Talmage DW. 1979. **The requirement for biotin and fatty acids in the cytotoxic T cell response.** *Cell Immunol*, 48:100-101.
- Lane P. 1996. **Are Polysaccharide antibody responses independent: the T cell enigma?** *Clin Exp. Immunol*, 105:10-11.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. 2000. **Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cell.** *Science*, 290(6).
- Lee Chiu SH, Huskey SEW. 1998. **Species differences in N-glucoronidation.** *Drug Metabolism and Disposition*, 26(9):838-845.
- Lewin B. 1997. **Genes.** Oxford University Press, New York.
- Man DR, Akinbami MA, Lunn SF, Fraser HM, Gould KG, Ansari AA. 2000. **Endocrine-immune interaction: alterations in immune function resulting from neonatal Treatment with a GnRH antagonist and seasonality in male primates.** *Am J. Reprod Immunol*, 44(1):30-40
- Martin F, Oliver AM, Kearney JF. 2001. **Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens.** *Immunity*, 14:617-629.
- Medzhitov R, Janeway C Jr. 2000. **The toll receptor family and microbial recognition.** *Trends in Microbiology*, 8(10):452-428.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. 1997. **Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition.** *Cell*, 91:295-298.
- Mock DM, Mock NI. 1997. **Serum concentrations of bisnorbiotin and biotin sulfoxide increase during both acute and chronic biotin supplementation.** *J. Lab. Clin. Med*, 129:384-8.
- Mock DM. 1999. **Biotin status: which are valid indicators and how do we know?** *J. Nutr*, 129:498S-503S.
- Mock NI, Malik MI, Stumbo PJ, Bishop WP, Mock DM. 1997. **Increased urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid and decreased urinary excretion of biotin are sensitive early**

indicators of decreased biotin status in experimental biotin deficiency. Am J. Clin Nutr, 65:951-8.

○ Mond J, Brunswick M. 1987. **A role for IFN-g and NK cells in immune responses to T cell-regulated antigens type 1 y 2.** Immunological Reviws, 99:105-121.

○ Mond JJ, Lees A, Snapper CM. 1995. **T cell-independent antigens type 2.** Annu. Rev. Immunol, 13:655-92.

○ Mond JJ, Vos Q, Lees A, Snapper CM. 1995. **T cell independent antigens.** Current Opinion in Immunology, 7:349-354.

○ Moretti P, Petrelli C, Petrelli F, Gabrielli MG, Palatroni P. 1990. **Relationships between biotin and thymus morphology, and thymic and plasma peptides controlling DNA transcription.** Tymus, 15:79-92.

○ Munnich V, Fischer A, Saudubray JM, Griscelli C, Coude FX, Coude X, Ogier C, Charpenther C, Frezal J. **Biotin-responsive immunoregulatory dysfunction in multiple carboxylase Deficiency.** J. Inher. Metab. Dis, 4:113-114.

○ Paul WE. 1999. **Fundamental Immunology.** Four Edition. Lippincott-Raven Publishers, New York.

○ Petrelli F, Moretti P, Campanati G. 1981 **Studies on the relationships between biotin and the behaviour of B y T lymphocytes in the guinea-pig.** Experiencia, 37:1204-1206.

○ Petrelli F, Moretti P, Paparelli L, Guglielmi L, Barra D. 1980. **Behavior in biotin-deficient rats of thymic peptides controlling DNA transcriptions.** Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, 88:163-168.

○ Petrelli F, Moretti P, Sciarresi, Dahir AM. 1985. **Relationships between biotin and DNA contents and DNA turnover in lymphoid organs: thymus, lymph nodes and spleen.** Acta Vitaminol. Enzymol, 7(3-4):199-206.

○ Petrovsky N, Harrison L. 1997. **Diurnal rhythmicity of human cytokine production.** Journal on Immunology, 158:5163-5168.

○ Plytycz B, Seljelid R. 1997. **Rhythms of immunity.** Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 43(2-3):157-162.

○ Pruzansky J, Axelrod AE. 1955. **Antibody production to diphteria toxoid in vitamin deficiency states.** Proc Soc Exp Med, 157:421-3.

○ Rabin BS 1983 **Inhibition of experimental induced autoimmunity in rats by biotin deficiency.** J. Nutr, 113:2316-22.

- Reiter RJ, Maestroni JMG. 1999. **Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation.** *J. Mol Med.* 77:36-39.
- Renshaw B, William F, Richard A, Kim C, Denny L, Barry D. 1994. **Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice.** *J. Exp Med*, 180:1889-1997.
- Rodríguez-Meléndez R, Cano S, Méndez ST, Velázquez A. 2001. **Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats.** *J. Nutri.* 131:1909-1913.
- Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German SM, Matschinsky FM, Velásquez A, Wang J, Fernandez-Mejia C. 1999. **Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats.** *Endocrinology*, 140: 4595-4600
- Ryan EJ, Daly LM, Mills KHG. 2001. **Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes.** *Trends in Biotechnology*, 19(8):293-303
- Said HM. 1999. **Cellular uptake of biotin: mechanisms and regulation.** *J. Nutr*, 129:490S-493S.
- Scott A. Henderson, Jacqueline O'Connor, Alan R. Rendina, G. Paul Savage, and Gregory W. Simpson. 1995 **The synthesis and biological activity of "crippled biotin".** *Aust. J. Chem*, 48: 1907-1917
- Snapper CM, Mond JJ. 1996. **A model for induction of T cell-independent humoral immunity in response to polysaccharide antigen.** *J Immunol*, 157:2229-2233.
- Stanley SJ, Mock DM, Griffin JB, Zemleni J. 2002. **Biotin uptake into human peripheral blood mononuclear cells increases early in the cell cycle, increasing carboxylase activities.** *J. Nutr*, 132:1854-1859.
- Steven SJ, Griffin JB, Zemleni J. 2001. **Biotinylation of histones in human cell.** *Eur. J. Biochem*, 268:5424-5429.
- Sulzer B, Perelson AS. 1997. **Immunons revised: binding of multivalent antigens to B cells.** *Molecular Immunology*, 34:63-74.
- Suormarla MT, Baumgartner ER, Wick H, Scheibenreiter S, Schweitzer S. 1990. **Comparison of patients with complete and partial biotinidase deficiency: biochemical studies.** *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 13:76-92.
- Sverreremark E, Fernandez C. 1998. **Role of T cells in germinal center formation in the generation of immune responses to the thymus-independent carbohydrate dextran B512.** *The Journal of Immunology*, 161: 4646-4651.

- Sydenstricker VP, Singal SA, Briggs AP, DeVaughn NM, Harris I. 1942. **Observations on the "egg white injury" in man.** J. Am Med ASS, 118:1199-1200
- Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rölinghoff M, Bölskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL. **Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptors.** Science, 291(23):1544-1547.
- Triantafilou M, Triantafilou K. 2002. **Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS activation cluster.** Trends in Immunology, 23(6)301-305.
- Venkataraman C, Shankar G, Sen G, Bondada S. 1999. **Bacterial lipopolysaccharide induced B cell activation is mediated via a phosphatidylinositol 3-kinasa dependent signaling pathway.** Immunology Letters, 69:233-238.
- Voet D, Voet GJ, Pratt C. 1999. **Fundamentals of Biochemistry.** John Wiley & Sons, Inc. USA
- Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. 2000. **B-cell activation by T-cell independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganism.** Immunological Reviews, 176:54-170.
- Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. 2000. **Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity.** Current Opinion in Immunology, 12:624-631.
- Wortis HH, Berland R. 2001. **Cutting edge commentary: origins of B-1 cell.** The Journal of Immunology, 166:2163-2166.
- Zempleni J, Helm RM, Mock DM. 2001. **In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release.** J. Nutr, 131:1479-1484.
- Zempleni J, Mock DM. 1999. **Biotin biochemistry and human requirements.** J. Nutr. Biochem. 10:128-138.
- Zempleni J, Mock DM. 1999b. **Bioavailability of biotin given orally to human in pharmacologic doses.** Am J Clin Nutr, 69:504-8
- Zempleni J, Mock DM. 2000 **Utilization of biotin in proliferating human lymphocytes utilization of biotin in proliferating human lymphocytes.** J. Nutr, 130:335S-337S.