



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DEL VIRUS
DEL MOSAICO DE LA PAPAYA (PapMV).

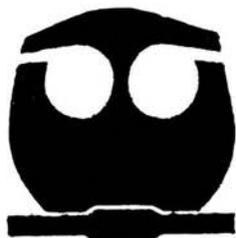
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

A A R O N S I L V A S A N C H E Z



MEXICO, D. F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Saturnino de León Chapa

Vocal: Prof. Patricia Elvira Berrón Ruíz

Secretario: Prof. Constantino III Roberto López Macías.

1er. Suplente: Prof. Enrique Ortega Soto

2o. Suplente: Prof. Mónica Berenice Heras Chavarría

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



Dr. Constantino III Roberto López Macías

ASESOR



Aarón Silva Sánchez

SUSTENTANTE

Dedicatoria.

A mis padres por haberme apoyado y confiado en mí siempre y en contra de cualquier adversidad, los quiero mucho.

A mi hermano, Héctor, por ser siempre mi ejemplo de perseverancia y disciplina, gracias por todo Manon.

A mi Bode, por todas tus ocurrencias que me han iluminado el camino hasta en los momentos más brillantes, te amo.

A Triny por ser como el agua que se abre camino entre las rocas y forma la arena.

A mis abues por toda su paciencia y por enseñarme a disfrutar de los detalles de la vida.

A Irene, Job, Paty y Lorena, sin su amistad la vida no sería tan liviana.

A Rodrigo, Silvia, Alberto y Nahayeli, por que se que siempre cuento con ustedes.

A Luisa, Maricela, Cristina, Rebeca, Nestor y Elizabeth, ustedes son parte fundamental de que los días en el laboratorio sean especiales y siempre diferentes.

Agradecimientos

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

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

Al Dr. Rodolfo Pastelin por su apoyo en el análisis y crítica profunda del presente trabajo. Y A mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Ingebor Becker del laboratorio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Proyecto No. 33137-M y por el Fondo para el Fomento a la Investigación Médica (FOFOI) en los proyectos FP 2002-072 y FP 2001-377.

Índice

Jurado.	1
Dedicatorias.	2
Agradecimientos.	3
I. Abreviaturas.	6
II. Resumen.	8
III. Introducción.	9
IV. Antecedentes.	
1. Vacunas y la necesidad de adyuvantes.	11
2. Clasificación y mecanismo de acción de los adyuvantes.	14
2.1 Sistemas de liberación.	17
a) Aceites y sales minerales.	17
b) Liposomas.	19
c) ISCOMs.	21
d) Micro y nanopartículas.	24
2.2 Moléculas inmunoestimuladoras.	26
a) Productos bacterianos y sus análogos.	26
b) Moléculas pequeñas potenciadoras de la respuesta inmune.	30
c) Partículas similares a virus.	31

3. Influencia de la organización antigénica en la respuesta de los linfocitos B.	33
4. Búsqueda de nuevos adyuvantes.	34
5. Virus del Mosaico de la Papaya.	36
V. Planteamiento del problema.	37
VI. Hipótesis.	37
VII. Objetivos.	38
1. Objetivo general.	
2. Objetivos particulares.	
VIII. Materiales y métodos.	39
1. Modelo experimental.	39
a) OVA	
b) OmpCr	
2. Evaluación del efecto adyuvante del Virus de mosaico de la Papaya.	41
a) Esquema de inmunización para OVA.	
b) Esquema de inmunización para OmpCr.	
3. Determinación del título de anticuerpos anti-OVA y anti-OmpCr.	43
4. Producción y caracterización de antígenos.	44
IX. Resultados.	48
X. Discusión de resultados	57
XI. Conclusiones.	61
XII. Anexos.	62
XIII. Bibliografía.	64

I. ABREVIATURAS

LPS	Lipopolisacárido.
ISCOM	Complejo inmunoestimulador.
SMIP	Moléculas pequeñas inmunopotenciadoras
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno.
VLP	Partículas similares a virus.
PRR	Receptor de reconocimiento de patrón.
TLR	Receptor parecido a Toll.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
PapMV	Virus de mosaico de la papaya.
CTB	Subunidad B de la toxina del cólera.
IFA	Adyuvante Incompleto de Freund.
CFA	Adyuvante Completo de Freund.
TCR	Receptor del linfocito T.
BCR	Receptor del linfocito B.
Th	Linfocito T cooperador.
DC	Célula dendrítica.
APC	Célula presentadora de antígeno.
NK	Células asesinas naturales.
Omp C	Proteína de membrana externa C.
OmpCr	Proteína de membrana externa C recombinante.
Omp F	Proteína de membrana externa F.

CP PapMV	Proteína de la cápside del PapMV.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
s.c.	Subcutánea.
i.p.	Intraperitoneal.
C'	Sistema del complemento.
IFN- γ	Interferón gamma.
IL	Interleucina.
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β .
Fc	Fracción cristalizable de las inmunoglobulinas.
OVA	Ovoalbúmina.
HRP	Peroxidasa de rábano.
PBS	Solución reguladora de fosfatos.
SSI	Solución salina isotónica.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida.

II. Resumen

El presente trabajo es un estudio de la capacidad adyuvante del Virus de Mosaico de la Papaya (PapMV). Se evaluó la capacidad adyuvante en la respuesta de anticuerpos contra la Ovoalbúmina (OVA) y contra las proteínas de membrana externa (PME) de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*), particularmente la porina OmpCr.

En ambos casos se observó un efecto adyuvante, para la OVA, incrementando la producción de anticuerpos de tipo IgG2a e IgG2b, mientras que para la OmpCr el incremento se presentó en la fase temprana de producción de anticuerpos del tipo IgM e IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3.

Es así, que estos resultados indican que el PapMV presenta capacidad adyuvante sobre la respuesta inmune de anticuerpos, así mismo sugieren que el PapMV promueve el cambio de isotipo en los linfocitos B. Por lo tanto el PapMV se propone como un fuerte candidato a ser un adyuvante para uso en humanos.

III. Introducción

La creciente necesidad de desarrollar vacunas efectivas, seguras, de bajo costo y de fácil distribución ha llevado a una intensa investigación de los mecanismos involucrados con el desarrollo de la inmunidad. Como producto de estas investigaciones se han aislado y purificado una gran cantidad de antígenos involucrados en la generación de protección.

Sin embargo el empleo de estos antígenos para la producción de nuevas vacunas se ha visto limitado por su baja inmunogenicidad generando la necesidad de utilizar adyuvantes.

Desde sus inicios, la búsqueda de nuevos adyuvantes estaba basada en el ensayo y error. Con el avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la generación de la respuesta inmune, sobre todo de los relacionados con el reconocimiento por parte del sistema inmune innato a través de los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), en especial de los receptores tipo Toll (TLR's), se ha podido realizar una búsqueda de adyuvantes dirigida, principalmente, a los que estimulen al sistema inmune innato.

Entre los nuevos candidatos como adyuvantes para uso en humanos que han surgido como fruto de estas investigaciones se encuentran los Complejos Inmunoestimuladores (ISCOM's), Moléculas pequeñas potenciadoras de la

respuesta inmune (SMIP's), liposomas, micropartículas y análogos de productos bacterianos.

Así mismo se ha demostrado que la organización y repetitividad antigénicas influyen de manera significativa tanto en el tipo como en la magnitud de la respuesta inmune generada. Es por esto que los virus modificados para ser utilizados como acarreadores han sido objeto de un profundo estudio para la generación de nuevos adyuvantes para uso en humanos.

Las partículas similares a virus (VLP's) tienen la ventaja de que pueden ser utilizadas como sistemas de liberación, moléculas inmunomoduladoras o una combinación de ambas, por ejemplo las VLPs que utilizan la proteína de la cápside del virus de la Influenza A^{1,2} o VLPs del virus de mosaico del tabaco que expresan péptidos heterólogos^{3,4}. Además, la producción de VLP's es de bajo costo y puede realizarse a gran escala. Diversos estudios utilizando VLP's de virus vegetales han probado su eficacia para potenciar la respuesta inmune de tipo Th1.

Con base en los estudios realizados en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional S.XXI, se ha demostrado que el PapMV tiene una excelente capacidad para generar una respuesta inmune humoral elevada y de larga duración, lo cual indica que el PapMV puede activar fuertemente al sistema inmune innato, con base en lo anterior es que se propone evaluar la capacidad adyuvante del PapMV como una partícula inmunoestimuladora.

IV. Antecedentes

1. Vacunas y la necesidad de adyuvantes

Las vacunas pueden ser clasificadas de acuerdo a si contienen microorganismos atenuados o inactivados. Las vacunas con microorganismos atenuados estimulan al sistema inmune por medio de una infección transitoria causada por la replicación del organismo, un ejemplo de esto es la vacuna contra la viruela producida por Jenner en 1796⁵.

A pesar de ser fáciles de producir y de bajo costo, el riesgo intrínseco asociado con los patógenos atenuados ha llevado a producir vacunas con microorganismos inactivados o con componentes subcelulares aislados. Estas vacunas estimulan el sistema inmune de una manera más baja y con menor duración que las vacunas con microorganismos atenuados. Con el fin de aumentar la inmunogenicidad de este tipo de vacunas es que surge la necesidad de buscar sustancias capaces de potenciar la respuesta inmune sin que se añadan riesgos a su uso.

En 1916, Le Moigne y Pinoy⁶ reportaron que las emulsiones de aceites podían incrementar la respuesta inmune en contra de un antígeno. Fue hasta 1926 en que Glenny introdujo en América el único adyuvante aceptado para uso en humanos en América, la alúmina⁶.

Entre 1924 y 1926, Ramón descubrió que la inflamación local causada por bacterias correlacionaba con el incremento en el título de anticuerpos y acuñó el término adyuvante para describir a toda aquella sustancia capaz de incrementar la respuesta de anticuerpos en contra de un antígeno⁶.

En las vacunas inactivadas y las que contienen componentes subcelulares, generalmente los adyuvantes son los componentes que hacen la diferencia entre una vacuna protectora y una que no lo es, sin importar el antígeno usado⁷.

Para que una sustancia pueda ser empleada como adyuvante en humanos debe cumplir con requerimientos muy astringentes, los cuales muy pocas veces pueden ser cumplidos, limitando así la disponibilidad de adyuvantes adecuados⁸. Entre los requisitos que un adyuvante tiene que cumplir para ser de uso humano se encuentran los siguientes⁸:

- No debe ser tóxico o tener efectos secundarios en el rango de dosis en el que se presenta el efecto adyuvante.
- Debe estimular una fuerte respuesta humoral y/o celular.
- Proveer de una buena memoria inmunológica o provocar inmunidad de larga duración.
- No debe inducir autoinmunidad.
- No debe ser mutagénico, carcinogénico, teratogénico o pirogénico.
- Debe ser estable en rangos amplios de tiempo de almacenamiento, temperatura, y pH.

En la actualidad sólo existen dos adyuvantes que pueden ser utilizados en humanos, las antes ya mencionadas sales de aluminio y magnesio, y la microemulsión MF59, que exitosamente se introdujo en el mercado europeo en 1997 para ser coadministrada con una vacuna para Influenza⁹⁻¹¹.

La producción de nuevas vacunas requerirá de adyuvantes que estimulen la respuesta inmune apropiada, por lo tanto, la investigación dirigida hacia el desarrollo de nuevos adyuvantes para uso en humanos es de central importancia para el desarrollo de nuevas vacunas.

En la actualidad un adyuvante puede ser definido como los diversos componentes que mezclados y coadministrados con las determinantes antigénicas, potencien la respuesta inmune específica de antígeno *in vivo*^{7, 12, 13}.

2. Clasificación y mecanismo de acción de los adyuvantes.

Normalmente se espera que un adyuvante promueva la generación de una respuesta inmune elevada y de larga duración, en la actualidad un buen adyuvante no debe cumplir solamente con la parte cuantitativa sino que también se exige que induzca la mejor respuesta biológica posible¹⁴.

Los adyuvantes pueden ejercer su efecto inmunopotenciador a nivel de la respuesta inmune innata, estimulando a las DCs y macrófagos a tomar antígeno del medio. La activación de estas células es a través de los PRRs. El adyuvante también facilita la endocitosis del antígeno evitando que este se diluya, es decir localizándolo⁸.

Una vez activadas, las DCs migran al órgano linfoide secundario donde presentarán el antígeno a los linfocitos T CD4+ y CD8+. El cambio fenotípico que sufren las células dendríticas durante la migración implica la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40 y CD86¹⁵. Algunos adyuvantes junto con el antígeno pueden llegar al órgano linfoide secundario y activar a los linfocitos B de manera TI.

La respuesta inmune celular adquirida comprende a los linfocitos T (LT) CD8+ y CD4+, estos son activados cuando los antígenos, previamente procesados, son presentados por las APCs (DCs, Linfocitos B(LB) y macrófagos) en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y de clase II (MHCI y MHCII) respectivamente.

Los LT CD4⁺ reconocen a los antígenos exógenos que son presentados en moléculas del MHC de clase II, cuando esto ocurre, los LT CD4⁺ se diferencian a subclases funcionales llamadas LT cooperadores 1 (Th1) o LT cooperadores 2 (Th2).

La diferencia entre estas dos subclases radica en el perfil de citocinas que secretarán, siendo el interferón gamma (IFN- γ) la citocina característica para los Th1 mientras que la Interleucina 4 (IL-4) es la citocina característica para los Th2.

Los LT CD8⁺ reconocen antígenos endógenos asociados a las moléculas del MHC de clase I, la forma en que realizan sus funciones efectoras puede ser por medio de la liberación de IFN- γ y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o bien por un proceso citolítico directo¹⁴. El IFN- γ juega un papel importante en el mecanismo de adyuvancia, el IFN- γ incrementa la capacidad fagocítica de las DCs y macrófagos así como la expresión de moléculas coestimuladoras¹⁵ (Figura 1).

Para que los linfocitos B sean activados se requiere que su receptor de antígeno (BCR) reconozca a su antígeno, si este reconocimiento implica, debido a la estructura y repetitividad antigénicas, la participación de varios BCRs el linfocito B se activará y producirá anticuerpos de clase IgM¹⁶⁻¹⁸. Las citocinas generadas por los LT cooperadores promueven el cambio de isotipo en los linfocitos B produciendo así las otras clases de anticuerpos (tabla 1).

Tabla 1. Efecto de las citocinas sobre el cambio de isotipo en linfocitos B.

Humano ¹⁹		Ratón ²⁰	
Interleucina	Isotipo	Interleucina	Isotipo
IL-10	IgG1	IL-4	IgG1
¿?	IgG2	IFN- γ	IgG2a
IL-10	IgG3	TGF- β	IgG2b
IL-4 + IL-13	IgG4	INF- γ	IgG3
IL-4 + IL-13	IgE	IL-4	IgE
IL-10 + TGF- β	IgA1 e IgA2	TGF- β , IL-4, IL-6	IgA

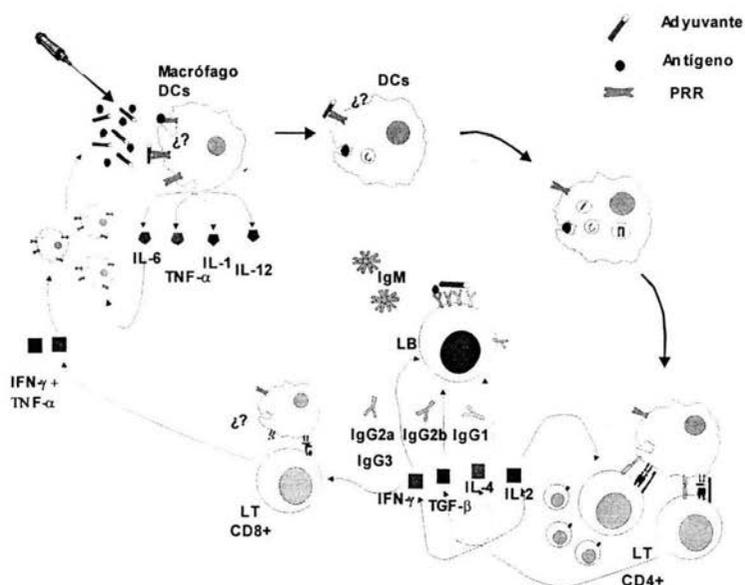


Figura 1. Mecanismo de acción de los adyuvantes.

La clasificación de los adyuvantes puede hacerse de acuerdo al mecanismo de acción involucrado en la adyuvanticidad, siendo así se propone la siguiente clasificación^{7, 12, 21};

2.1 Sistemas de liberación.

Su función principal es la de evitar la difusión de los antígenos presentes en la vacuna y de permitir el reconocimiento de estos por las células presentadoras de antígeno (APCs)⁷. El efecto principal de este tipo de adyuvantes es el de incrementar la cantidad de antígeno que llega a los órganos linfoides secundarios.

a) Aceites y sales minerales

El mecanismo de acción de este tipo de adyuvantes consiste en evitar que el antígeno difunda aumentando así la concentración local del mismo y facilitando el reconocimiento por las células del sistema inmune innato²².

Dentro de estos se encuentran la alúmina, único adyuvante para uso en humanos compuesto de $AlPO_4$ y $Al(OH)_3$ ²³, y el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA).

El IFA es una emulsión de agua en aceite. Este adyuvante se utilizó en humanos durante la década de los 50s pero fue prohibido a mediados de la década de los

60s por las reacciones adversas que producía (absceso estéril, granulomas, induración muscular)²⁴.

La composición del IFA es de 85% aceite mineral (por ej. Drakeol 6VR, Bayol F, Medic Way M7) y 15% del emulsificante²⁴ monooleato de manida, un éster que contiene un residuo hidrofílico de manitol y un residuo hidrofóbico de ácido oleico C₁₈.

A pesar de que son poco aceptados para su uso en humanos (Adju-phos, Alhydrogel, CPA)²² no son reconocidos como inmunopotenciadores eficientes, además se ha reportado relación del uso de estos adyuvantes con el desarrollo de miofasciitis macrofágica y miopatía inflamatoria^{25, 26}.

El IFA se ha asociado con tres mecanismos de acción:

- 1) La formación de un depósito del antígeno en el sitio de inyección que permite una liberación continua y gradual.
- 2) Provee de un vehículo capaz de transportar al antígeno a través del sistema linfático a lugares alejados del sitio de inyección (ej. Bazo).
- 3) Interacción con APC's²⁴.

b) Liposomas

Los liposomas comprenden una gran cantidad de compuestos anfifílicos como fosfolípidos y detergentes²³ que puedan formar estructuras bilaminares de tamaño menor a un micrómetro, en su interior pueden contener compuestos hidrofílicos mientras en la superficie pueden incorporar otros compuestos anfifílicos o hidrófobos.

Su estructura básica consiste de una bicapa de fosfolípidos con moléculas de colesterol intercaladas con el fin de aumentar su rigidez y estabilidad²³.

Para conferir una carga neta y mayor rigidez a la estructura se añaden lípidos con carga y diferentes puntos de fusión²³.

Los liposomas pueden ser clasificados de acuerdo a su composición y sus propiedades inmunológicas (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación y propiedades de los liposomas.

Tipo de liposoma	Composición	Propiedades	Mecanismo de acción
Virosomas	Vesícula unilaminar de lípidos + HA.	Capacidad de unión a células con ácido siálico.	Unión de la hemaglutinina (HA) al ác. Siálico de las DC's. Fusión de virosoma con el endosoma.
Transferosomas	Policarbonato + Colato (9:2).	Ultra-deformables con capacidad de penetrar la piel.	Localiza al antígeno.
Archeosomas	Phytanil C-20, C-25, C-40 ramificado.	Resistente a pH alcalino, estrés oxidativo, alta temperatura. Efecto comparable con CFA.	Facilita la endocitosis por las APCs.
Niosomas	Estructuras unilaminares de surfactantes no ionicos.	Estabilidad química elevada. Efecto comparable con el CFA.	Facilita la endocitosis por las APCs.
Cocleados	Bicapas no vesiculares de Fosfatidil-etanolamina + Fosfatidilserina cargada negativamente + colesterol.	Estructura tridimensional en forma de rollo.	Facilita la endocitosis por las APCs.

La principal desventaja que tienen los liposomas, con excepción de los virosomas, es que el efecto adyuvante observado es bajo²⁷. Además los liposomas no pueden ser dirigidos hacia un solo tipo de célula ya que este puede fusionarse con la membrana de una célula de cualquier otro tejido²⁸.

Los liposomas en comparación con los ISCOMs son más resistentes al estrés oxidativo, altas temperaturas, pH alcalino, fosfolipasas y sales biliares^{29, 29, 30}.

c) ISCOMs

Los ISCOMs son estructuras micelares de alrededor 40nm³¹ y se distinguen de los liposomas en que los ISCOMs tienen una gran versatilidad de composición, tamaño, propiedades fisicoquímicas e inmunológicas²³.

Estas estructuras esféricas micelares están compuestas de la saponina Quil A, colesterol y fosfolípidos, en sus membranas acarrean antígenos anfifílicos, principalmente proteínas presentes en las membranas de los microorganismos patógenos. Generalmente la composición de estas estructuras consiste en 60 - 70% Quil A, 10 - 15% de lípidos y 5 - 20% de proteínas²³.

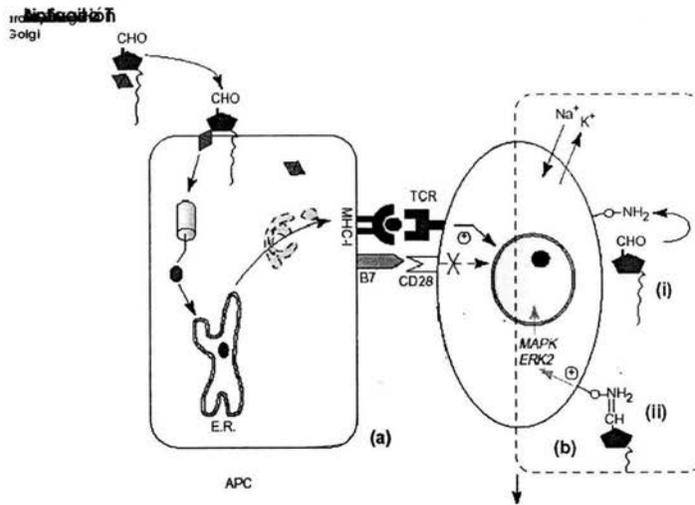
Se ha demostrado que gran parte del mecanismo de acción de los ISCOMs reside en la mezcla utilizada de Quil A²³. La composición de la Quil A es compleja, ya que

al realizar un análisis por cromatografía de fase reversa se encontraron 25 picos correspondientes a diferentes saponinas^{32, 33}.

Las saponinas de la Quil A son compuestos bipolares³⁴ ya que en su estructura química contienen un núcleo de triterpeno unido a un aldehído y dos cadenas de oligosacáridos, una de las cuales se encuentra acilada por dos ácidos alifáticos lipofílicos unidos a una fucosa por un enlace ester^{8, 35, 36}.

Los aldehídos presentes en las saponinas pueden formar iminas al reaccionar con los grupos ϵ -amino de algunos receptores de las células T, lo cual constituye la señal de coestimulación para la activación de los linfocitos de T, proceso que se lleva a cabo independientemente de los ligandos de CD80^{37, 38}.

La formación de la imina resulta en cambios en el transporte de los iones Na^+ y K^+ lo cual, sumado a la señalización del TCR vía la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) ERK2 y la subsecuente liberación de Ca^{2+} , favorece la producción de IL-2 e IFN- γ , y por lo tanto una respuesta inmune de tipo Th1³⁹.



Modificado de Marciani, D.J., 2003.

Figura 2. Mecanismo de activación de los linfocitos T por las saponinas.

Sin embargo, las saponinas que carecen de cadenas de oligosacáridos aciladas no estimulan la respuesta inmune de tipo Th1 sino la respuesta inmune de tipo Th2.

Aparentemente la fracción lipofílica de las saponinas aumenta la disponibilidad de los aldehídos a las células T potenciando las respuestas de tipo Th1; las saponinas desaciladas pueden ser reconocidas por las lectinas presentes en las APCs facilitando su endocitosis y potenciando la respuesta de tipo Th2³⁹⁻⁴¹.

Las saponinas presentan dos inconvenientes, su alta toxicidad e inestabilidad, la cual puede producir cambios en el tipo de respuesta inmune estimulada⁴⁰.

d) Micro y nanopartículas

Las micropartículas están compuestas del polímero biodegradable, poli(lactido-glicólidos) (PLG), el cual ha sido usado como sistema de liberación para fármacos, el rango de tamaño va desde 1µm hasta 10µm.

Las nanopartículas son partículas sólidas que miden desde 1nm hasta 1000nm y pueden estar compuestas de poli(metil metacrilato) (PMMA), poliacrilamida y poli(alquil cianoacrilatos).

Las nanopartículas formadas de poliacrilamida o poli(alquil cianoacrilatos) requieren largos procesos de producción que involucran grandes cantidades de solventes orgánicos, además el efecto adyuvante observado es bajo.

Con las micropartículas el antígeno se encuentra encapsulado, mientras que con las nanopartículas el antígeno puede encontrarse disuelto, encapsulado, atrapado, adsorbido o unido químicamente a la superficie.

Las micropartículas hechas a base de poli(lactido-glicólidos) (PLG) son los principales candidatos a formar parte de vacunas para uso humano ya que este polímero ha sido utilizado por muchos años como sistema de liberación controlada para fármacos peptídicos⁴².

Se ha demostrado que el tamaño de las micropartículas juega un papel importante en el efecto adyuvante ya que las partículas con un diámetro menor a los $10\mu\text{m}$ son significativamente más efectivas que las partículas con diámetro mayor a los $10\mu\text{m}$ ^{43, 44}.

La entrada del antígeno a los nódulos linfáticos se promueve al encapsularlo en las micropartículas, esto provoca un incremento en la concentración local y permanencia del antígeno⁴⁵.

Se ha demostrado que las micropartículas también estimulan la interacción del antígeno encapsulado con las APCs²⁴.

En cuanto a las nanopartículas, el mecanismo de acción es similar al de las micropartículas. En experimentos utilizando nanopartículas marcadas con ^{14}C , se demostró que más del 99% de las nanopartículas permanecen en el sitio de inyección⁴⁶.

Las nanopartículas de PMMA son ideales debido a su baja toxicidad, lenta biodegradación y producción de bajo costo. Además han sido utilizadas ampliamente en implantes de hueso.²⁴.

2.2 Moléculas inmunoestimuladoras

Este tipo de adyuvantes activan al sistema inmune innato principalmente por medio de los PRRs, en especial los TLRs^{28, 47-50}.

a) Productos bacterianos y sus análogos

Comprende una gran variedad de adyuvantes que van desde los que contienen al microorganismo completo inactivado, como *Mycobacterium* en el Adyuvante Completo de Freund (CFA), hasta los que están compuestos de estructuras subcelulares, como el lipopolisacárido (LPS), CpG-DNA bacteriano, β -glucanas, toxinas inactivadas (LTK63, CTB)^{11, 51}.

- Lipopolisacárido (LPS).

El LPS, componente de la membrana de las bacterias Gram negativas, tiene una región hidrofílica compuesta de polisacáridos y una región lipofílica compuesta de un fosfolípido (Lípido A)⁸.

El lípido A puede estimular la producción excesiva de citocinas proinflamatorias provocando choque séptico⁵². Usando células transfectadas se ha demostrado que la activación celular inducida por el LPS requiere de la participación de un complejo formado por tres receptores⁵³.

Inicialmente, el LPS libre o el complejo soluble LPS-Proteína de unión al LPS (LBP) se unen a CD14, una proteína que se puede encontrar soluble o en la membrana celular, activando la unión al TLR4. Se requiere una tercer proteína, MD-2, para que se active la cascada de señalización inducida por el LPS^{53, 54}.

Si se elimina un residuo de fosfato del LPS se obtiene el Monofosforil lípido A (MPL), esta molécula mantiene la adyuvancia pero tiene menor toxicidad. Se ha visto que la $\beta(1-6)$ diglucosamina hexacilada con tres residuos 3-n-alcanoilxitetradecanoil o con seis ácidos grasos es necesaria para la adyuvancia⁵⁵.

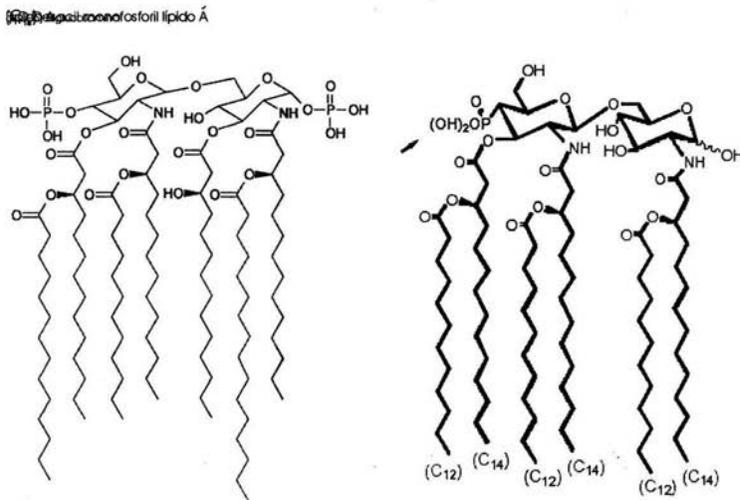


Figura 3. Diferencias estructurales entre el Lípido A y MPL.

- β -Glucanas

Las β -glucanas, polisacáridos de levaduras, son polímeros de $\beta(1-3)$ glucosa que pueden presentar cadenas laterales de glucosa $\beta(1-6)$ adquiriendo una conformación de hélice o triple hélice⁵⁶.

Las propiedades inmunomoduladoras de las β -glucanas dependen del tamaño, ramificaciones y conformación, siendo las conformaciones de una sola hélice las más efectivas⁵⁷.

Las β -glucanas de alto peso molecular pueden ser reconocidas por el receptor de complemento tipo 3 (CR3) presente en monocitos y neutrófilos, activando la degranulación y liberación de citocinas en ausencia de los LT.

Las β -glucanas de bajo peso molecular pueden unirse al CR3 activando a macrófagos, neutrófilos y células NK para ejercer su actividad citotóxica en patógenos o células opsonizados con iC3b⁵⁷.

Investigaciones recientes han demostrado que las β -glucanas activan un receptor que contiene un dominio de receptor Toll / Interleucina 1 (TIR) y que producen TNF- α . Ésta producción de TNF- α es dependiente de NF- κ B⁸.

- CpG DNA bacteriano

El DNA bacteriano contiene motivos CpG poco comunes en el DNA de eucariotes, estos motivos son reconocidos intracelularmente por el TLR 9

activando a la respuesta inmune innata y promoviendo la liberación de citocinas de tipo Th1⁴⁹.

Debido a las diferencias en la secuencia de aminoácidos que conforman el dominio de unión a motivos metil-CpG (MBD1) del TLR 9 de diferentes especies, la afinidad del TLR 9 por los oligonucleótidos de CpG dependerá de la secuencia óptima de nucleótidos para cada especie⁵⁸.

Los CpGs se han podido clasificar de acuerdo al tipo de respuesta inmune que estimulen, los CpGs tipo D estimulan la producción de interferón alfa (IFN- α) e IFN- γ por las DCs y células NK, no estimulan eficientemente a las células B y tienen una cadena quimérica con un núcleo de CpG con enlaces fosfodiéster flanqueado por secuencias de PTO-poliguanosina; los CpGs tipo K estimulan la proliferación de los linfocitos B y la liberación de IL-6 por los monocitos⁵⁹.

La respuesta Th1 de mayor especificidad inducida por los CpGs – ODNs (oligodeoxinucleótidos) se consigue cuando se inmunizan los CpGs unidos covalentemente al antígeno⁶⁰. Los CpGs son candidatos prometedores a ser aplicados en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas debido a sus múltiples efectos inmunológicos y bajos efectos secundarios⁶¹.

b) Moléculas Pequeñas Potenciadoras de la Respuesta Inmune (SMIPs)

Aquí se comprende un nuevo grupo de moléculas sintéticas con capacidad de modificar la respuesta inmune, el núcleo de estas moléculas son las imidazoquinolinas de bajo peso molecular, por ejemplo el imiquimod y resiquimod, las cuales son análogos del nucleósido de guanina^{8, 62}.

Estas moléculas ejercen su efecto adyuvante a través del TLR7, induciendo la producción de citocinas y la sobre expresión de las moléculas coestimuladoras y las moléculas del MHC de clase I y II en DCs. El resiquimod también es reconocido por el TLR8.

Aparentemente, la activación de las células del sistema inmune por medio del TLR7 requiere de maduración endosomal mientras que la activación vía TLR8 no.

Las imidazoquinolinas estimulan a las DCs para la producción de IL-12 e IFN- α en mayor cantidad, ambas citocinas tienen un alto poder anti-viral y anti-tumoral, así mismo se producen otras citocinas proinflamatorias típicas de las respuestas Th1.

Se ha demostrado, con ratones deficientes en MyD88 y TLR7, que estos compuestos sintéticos activan a las células del sistema inmune por medio de una cascada de señalización dependiente en TLR7 y MyD88.

Resiquimod también es capaz de activar a las células B de una manera similar a la señal dada por el ligando de CD40, induciendo así la producción de TNF- α e IL-6, ambas citocinas contribuyen a estimular la respuesta inmune de anticuerpos.

c) Partículas similares a virus.

Las VLPs consisten de proteínas recombinantes de la cápside de los virus, las cuales gracias a su capacidad de autoensamblaje pueden formar estructuras muy parecidas a las del virus silvestre¹.

Las proteínas que constituyen las VLPs pueden ser modificadas genéticamente y conseguir que se expresen péptidos heterógenos sobre la estructura de las proteínas de la cápside (Cp) sin alterar la capacidad de autoensamblaje de estas. A estas partículas se les llama quimeras de partículas similares a virus (CVP).

Se ha demostrado que algunas VLP's tienen alta capacidad de estimular de manera timo independiente (TI) a los linfocitos B, macrófagos y células dendríticas⁶³⁻⁶⁵.

También se ha visto que las VLPs (por ejemplo la VLP-HBsAg) son endocitadas por una gran cantidad de células por medio de un mecanismo resistente a la citocalasina-B (inhibidor de la polimerización de actina), lo cual sugiere que la internalización de las VLPs se lleva a cabo por medio de endocitosis no mediada por clatrina o por macropinocitosis⁶⁶.

En cuanto a la activación de linfocitos T, se ha visto que las VLPs no alcanzan el citosol de las APCs y que son procesadas en endosomas (TAP independientes).

Además se ha reportado que hay un aumento en el número de moléculas del MHC de clase I vacías que son transportadas en endosomas lo que indica que posiblemente los péptidos antigénicos se unen a las moléculas del MHC de clase I en compartimientos endosomales^{67, 68}.

Sin embargo, el mecanismo de acción de las diferentes VLPs varía según el tipo de Cp utilizado para su formación, un ejemplo claro es la diferencia en el procesamiento de los antígenos expresados en las VLPs HBcAg y HBsAg. La primera es parcialmente TAP dependiente mientras que la segunda es totalmente TAP independiente^{69, 70}.

Utilizando CLPs del virus del parvovirus porcino (PPV) expresando epitopos del Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) se indujo protección contra dosis letales del LCMV tanto en ratones maduros como en neonatos.

3. Influencia de la organización antigénica en la respuesta de los linfocitos B.

La mayoría de los patógenos expresan en su superficie estructuras antigénicas repetitivas que son fuertes inmunógenos para los linfocitos B. Por ejemplo el virus de la influenza está recubierto con moléculas de HA y neuroamidasa, ambas moléculas son objetivos primordiales de la respuesta inmune humoral.

Se ha demostrado que los antígenos que presentan una estructura rígida y paracristalina, que son repetitivos (entre 20 y 30 antígenos) y altamente organizados (separados por una distancia entre 5 y 10nm) activan eficientemente a los linfocitos B a través del BCR^{16, 71} produciendo respuestas de tipo TI-1, esta respuesta se caracteriza por que los linfocitos Th no participan en la activación de los linfocitos B y por lo tanto los anticuerpos producidos serán de clase IgM.

Así mismo se han detectado que se presentan tanto respuestas TI-1 policlonales (prototipo de LPS) como TI-1 antígeno específicas (Virus de la estomatitis vesicular (VSV) o el poliovirus)⁷¹.

Los linfocitos B actúan como efectores inmunes, principalmente por medio de la expansión clonal antígeno específica y la diferenciación a células plasmáticas. Las células B B1 (CD5+) y las células B de la zona marginal (MZ) están especializadas en responder ante antígenos de tipo timo-independiente, de manera tal que sugiere la existencia de memoria natural e innata por parte de los linfocitos B⁷²

4. Búsqueda de nuevos adyuvantes

Recientemente los virus han sido considerados como sistemas atractivos para la expresión y liberación de antígenos extraños como inmunógenos, y por lo tanto ser utilizados para el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación^{73, 74}

Al final de la década de los 80's, las plantas se convirtieron en parte del proceso de desarrollo de vacunas, destacando por su producción segura y de bajo costo. Una gran cantidad de antígenos de gran relevancia se han expresado en plantas transgénicas, entre ellos encontramos al HbAgS⁷⁵, la LT de *E. coli*⁷⁶, la glicoproteína del virus de la rabia⁷⁷ y la proteína de la cápside del Norwalk virus⁷⁸.

El empleo de plantas para la producción de proteínas con fines terapéuticos, ofrece grandes ventajas como la ausencia de patógenos de mamíferos, modificación de las proteínas por una célula eucariote, una buena relación costo-efectividad, producción a gran escala, y relativa facilidad para la expresión y purificación de las proteínas⁷⁹

Con los avances en el conocimiento de la biología molecular de los virus vegetales ha surgido la posibilidad de utilizarlos como sistemas de expresión de antígenos^{80, 81}. Al contrario de las vacunas recombinantes convencionales, que en gran parte provienen de patógenos vivos atenuados, vivos recombinantes o inactivados, los virus de plantas no son patogénicos en humanos ni en otros animales^{82, 83}

El virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus del mosaico del ejote (CPMV), el virus del mosaico de la alfalfa (AIMV) y el virus del arbusto de tomate (TBSV) han sido usados como sistemas de expresión de determinantes antigénicas de varios patógenos animales.

Particularmente, las proteínas de la cápside pueden ser manipuladas genéticamente para que al ser expresadas en plantas, se añadan secuencias exógenas. Cuando estas Cps se ensamblan dan origen a quimeras de partículas similares a virus que expresan la secuencia exógena en su superficie.

Las VLPs como adyuvantes presentan la gran ventaja de que pueden comportarse como sistemas de liberación y como moléculas estimuladoras de la respuesta inmune al mismo tiempo.

La expresión organizada y repetitiva de antígenos en la superficie de las VLPs permite la activación TI de los linfocitos B y facilita la endocitosis de las APCs. Además, las VLPs pueden contener antígenos y/o adyuvantes como las secuencias de DNA ricas en motivos no metilados de CG (CpGs)²⁸ que serán liberados dentro de las APCs aumentando así el efecto inmunopotenciador.

5. Virus de mosaico de la papaya (PapMV).

El PapMV es un virus filamentoso no envuelto de ssRNA(+) cuya cápside está constituida por 1,200 monómeros de una única proteína (CP), los monómeros están separados por una distancia de 5.5nm y dispuestos de manera repetitiva y altamente organizada formando un arreglo paracristalino. En estudios previos hemos observado que la inmunización de ratones con una sola dosis de 50µg de este virus induce una respuesta de anticuerpos elevada y de larga duración.

El PapMV ofrece la ventaja de que es un virus que se puede modificar genéticamente para expresar péptidos heterólogos, además, el proceso de obtención del virus es sencillo, se obtienen altos rendimientos de producción y es estable a temperatura ambiente. Por lo tanto, este virus es un excelente candidato para ser utilizado como acarreador de péptidos heterólogos, de tal forma que estos puedan expresarse en la cápside viral de forma repetitiva y altamente organizada, y así inducir la activación del sistema inmune adaptativo, especialmente de los linfocitos B.

El desarrollo de una CVP del PapMV presenta grandes ventajas, destacando el gran potencial de producción a gran escala ya que se puede obtener un gramo de CVP por kilogramo de hojas; una hectárea de papaya producirá alrededor de un kilogramo de CVP, lo cual es suficiente para la producción de siete millones de dosis individuales (150µg de CVP).

V. Planteamiento del problema

En la actualidad el diseño de vacunas para humanos que sean eficientes se ha visto limitado debido a la falta de adyuvantes que, además de no producir efectos secundario y ser de bajo costo de producción, puedan estimular la respuesta inmune adecuada para conferir protección de larga duración.

En la actualidad el único adyuvante que puede ser utilizado en humanos tiene la desventaja de que el incremento que produce en la respuesta inmune no es suficiente para conferir protección de larga duración.

Entonces, el presente trabajo busca contribuir al establecimiento de las bases experimentales que permitan proponer al PapMV como fuerte candidato a ser utilizado como adyuvante en humanos.

VI. Hipótesis

El virus de Mosaico de la Papaya (PapMV) será un buen adyuvante en la respuesta inmune humoral contra antígenos protéicos.

VII. Objetivos

Objetivo general.

Estudiar en ratones BALB/c, el efecto adyuvante del PapMV en la generación de inmunidad mediada por anticuerpos inducida por la OVA, OmpCr.

Objetivos particulares.

- a) Determinar el efecto adyuvante del PapMV en la respuesta inmune humoral contra OVA.
- b) Determinar el efecto adyuvante del PapMV en la respuesta inmune humoral contra OmpCr.

VIII. Materiales y métodos

1. Modelo experimental

a) Ovoalbúmina (OVA).

Ovoalbúmina es una glicoproteína obtenida de huevo de pollo con un peso molecular de 45 kDa por cadena, cada macromolécula consta de cuatro cadenas idénticas. OVA es usada como un antígeno habitual en muchos estudios. La comparación de los niveles de anticuerpos anti-OVA inducidos y las subclases de IgG se usan como un indicador del tipo de respuesta Th1 o Th2⁸⁴.

Previamente se ha reportado que ratones BALB/c sensibilizados con OVA inducen una respuesta Th2 en los pulmones, pese a la considerable producción de la IL-4 e IL5 en esplenocitos de BALB/c. Sin embargo, los esplenocitos de ratones BALB/c siempre producen respuesta tipo Th2 sin tomar en cuenta la dosis usada para la sensibilización⁸⁵.

b) OmpCr

Las porinas son una serie de proteínas presentes en la mayoría de las bacterias Gram negativas, estas proteínas cumplen con la función de ser reguladores del transporte pasivo de moléculas hidrofílicas pequeñas⁸⁶⁻⁸⁸. Es

por esto que las porinas son proteínas importantes en la supervivencia de las bacterias.

Principalmente, las Omps de *S. typhi* son las porinas Omp C, Omp F y la proteína modificable por calor Omp A. Estudios realizados con sueros de pacientes con fiebre tifoidea en fase convaleciente demuestran que la mayor parte de las IgGs reconocen a las porinas Omp C y Omp F de *S. typhi*.

La OmpCr es producida en *E. coli* UH302 transformada con el plásmido pST13⁸⁹, al ser purificada la OmpCr eluye en la misma fracción que la OmpC nativa lo que indica que esta también forma trímeros⁸⁶.

En los ensayos de protección la OmpCr confiere menor protección que la OmpC nativa, cuando los ratones fueron retados con 22 LD50 la OmpC nativa protege 70% mientras que la OmpCr protege 20%, cuando los ratones fueron retados con 120 LD50 la OmpC nativa protege 30% mientras que la OmpCr protege 20%⁹⁰.

El modelo experimental de OmpCr, debido a su relación con la supervivencia de *S. typhi*, nos permite evaluar el efecto adyuvante de PapMV sobre la respuesta contra un antígeno de relevancia biológica.

2. Evaluación del efecto adyuvante del PapMV.

a) Esquema de inmunización para OVA

Grupos de 5 ratones BALB/c hembra de entre 8 y 10 semanas de edad fueron inmunizados vía i.p. La composición de los antígenos administrados se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Grupos de ratones para la evaluación del efecto adyuvante del PapMV sobre la respuesta inmune contra OVA*.

Grupo	Antígeno	Adyuvante
1	OVA (2mg)	---
2	OVA (2mg)	10µg de LPS de <i>E. coli</i> .
3	OVA (2mg)	250µL de IFA
4	OVA (2mg)	250µL de CFA
5	OVA (2mg)	30µg de PapMV
6	SSI (500µL)	---
7	---	PapMV (30µg)

* El volumen final de los antígenos administrados se ajustó a 500µL con SSI.

El refuerzo fue administrado al día 15 y consistió en 2mg de OVA por vía i.p. para todos los grupos que previamente habían sido inmunizados con esta molécula. El grupo control de SSI y el de PapMV se inocularon con 500µL de SSI.

Las muestras de sangre se obtuvieron por sangría retroorbital en los días señalados en las figuras 4 y 5.

b) Esquema de inmunización para OmpCr.

Grupos de 5 ratones hembra BALB/c de 8 a 10 semanas de edad fueron inmunizados por vía i.p. La composición de los antígenos administrados se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Grupos de ratones para la evaluación del efecto adyuvante del PapMV sobre la respuesta inmune contra OmpCr*.

Grupo	Antígeno	Adyuvante
1	OmpCr (10µg)	---
2	OmpCr (10µg)	250µL de IFA
3	OmpCr (10µg)	250µL de CFA
4	OmpCr (10µg)	30µg de PapMV
5	SSI (500µL)	---
6	---	PapMV (30µg)

* El volumen final de los antígenos administrados se ajustó a 500µL con SSI.

La toma de muestras se realizó por sangría retroorbital en los días señalados en las figuras 6 a 8.

3. Determinación del título de anticuerpos anti-OVA y anti-OmpCr.

Las placas para ELISA de 96 pozos se fijaron adicionando 100µL de solución de unión por pozo (15µg de OVA/100µL y 1µg de OmpCr/100µL). Las placas fueron incubadas 1 hora a 37°C y durante toda la noche a 4°C. Después se lavaron cuatro veces con solución de lavado. Posteriormente se bloquearon las placas adicionando a cada pozo 100µL de solución de bloqueo. Se incubaron una hora a 37°C y posteriormente se lavaron cuatro veces con solución de lavado.

Los sueros a ser analizados se diluyeron 1:20 en solución de bloqueo con un volumen final de 100µL. Se adicionaron 100µL de los sueros diluidos a los primeros pozos de las placas de diluciones, se hicieron diluciones seriadas 1:2 con solución de bloqueo. Los sueros se transfirieron cuantitativamente y en el orden correspondiente a la placa de ELISA previamente sensibilizada. Se incubaron 1 hora a 37°C y al término de ese tiempo se lavaron cuatro veces con solución de lavado.

Posteriormente se agregaron 100µL del anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón correspondiente marcado con peroxidasa de rábano diluido 1:1000 en solución de bloqueo. La incubación de las placas se realizó a 37°C durante 1 hora, posteriormente se lavaron cuatro veces con solución de lavado.

El revelado de las placas se realizó adicionando 100 μ L de solución de revelado a cada pozo. Se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente 15 minutos y la reacción se detuvo con 10 μ L de H₂SO₄ 2.5N por pozo.

La densidad óptica fue determinada a una longitud de onda de 490nm en un lector de ELISA (Lector para placas de ELISA Dynex Technologies Modelo MRXII). Los resultados se graficaron como título de anticuerpos (-log₂ x 40) vs tiempo. La preparación de las soluciones empleadas se detalla en los anexos I a IV.

4. Producción y caracterización de antígenos.

La OVA grado VI se obtuvo de SIGMA (# cat. A-2512 lote: 91K7057). La OmpCr se obtuvo por el método estandarizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica⁹⁰

La OmpCr se cuantificó mediante el método de Lowry, para evaluar su pureza e integridad se realizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras, por último la determinación de LPS se realizó por el método modificado de Karkhanis. Las metodologías detalladas de los métodos antes mencionados se describen a continuación.

a) Cuantificación de proteínas por el método de Lowry ⁹¹

La cantidad de proteína obtenida de la producción de OmpCr se cuantificó por el método de Lowry para ello se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (ABS) 0.05 – 0.60 mg/mL. Se tomó 0.1mL de la solución de proteína respectivamente y se precipitaron con 20µL de ácido tricloroacético al 72%, se centrifugaron a 12 000 rpm por 30 minutos y después, con mucho cuidado, se decantó el sobrenadante.

Se adicionaron 200µL de NaOH 0.5N y se hirvieron por 10 minutos. Se adicionó 1mL de una solución de Na₂CO₃ al 2%, CuSO₄ al 0.01% y tartato de sodio al 0.01%, y 100µL de reactivo de Follin-Cicalteau 1N, se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. La lectura de la densidad óptica se realizó a 750nm. El cálculo de la concentración de proteínas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{mg / mL de proteína} = 1.751 Z (100 - \%H) (\%N_2) / (0.2802 V R)$$

donde:

Z = cantidad de µg de ABS de la interpolación de la DO de cada una de las muestras con la curva patrón.

%H = porcentaje de humedad de la ABS.

%N₂ = porcentaje de nitrógeno de la ABS.

V = Volumen de la muestra problema en µL.

R = JK

J = factor de corrección del porcentaje de humedad.

K = factor de corrección del porcentaje de nitrógeno.

b) Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

La SDS-PAGE de proteínas se efectuó de acuerdo al método de Laemmli en una unidad electroforética para geles verticales en placa (Biorad) y sistemas de amortiguadores discontinuos. El gel separador contenía 11.2% de acrilamida, 0.32% de bis-acrilamida, 0.10% de SDS en amortiguador de tris-HCl 0.35 M pH 8.8. El gel introductor contenía 4.2% de acrilamida, 0.12% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 m pH 6.8 que contenía SDS al 2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. Las muestras se analizaron en condiciones reductoras y no reductoras. Para las condiciones reductoras el amortiguador de muestra contenía además (β -mercaptoetanol al 5%. El corrimiento electroforético se llevó a cabo con 10mA en el gel introductor y 15mA en el separador.

c) Determinación de lipopolisacárido por el método de Karkhanis ⁹²

La cantidad de lipopolisacárido (LPS) contaminante de los antígenos producidos a partir de bacterias se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de 2-ceto-3-deoxioctonato (KDO) de acuerdo al método de Karkhanis. Empleando una curva patrón de KDO (Sigma Co.) de 1-20 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Se tomó la cantidad correspondiente de la solución y se llevó

a 500mL con H_2SO_4 0.2N, se hirvió por 30 minutos. Se agregaron 0.25mL de NaAsO_2 2.6N, cuando el color café desapareció se agregó 0.5mL de ácido tiobarbitúrico 0.6% y se hirvió por 15 minutos. Se agregó 1mL de dimetilsulfóxido y se leyó la absorbancia a 548nm. La cantidad de KDO se calculó interpolando la absorbancia de la muestra en la curva patrón.

IX. Resultados

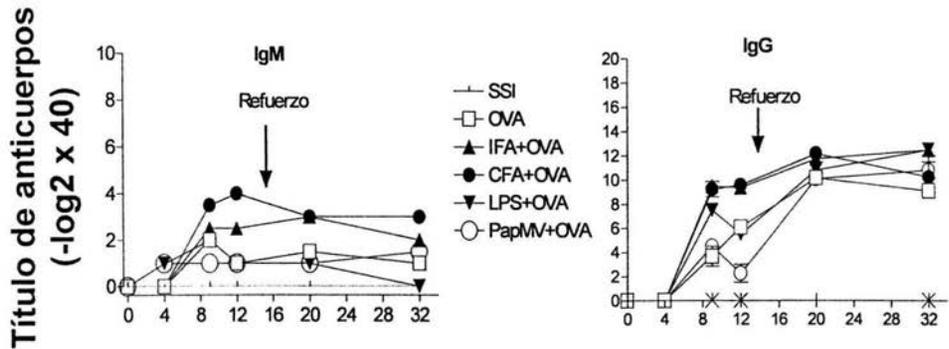
1. El Virus de Mosaico de la Papaya no tiene efecto adyuvante sobre la respuesta inmune de anticuerpos de las clases IgM e IgG total contra OVA pero si en los isotipos.

Estos experimentos se realizaron para determinar si el PapMV puede incrementar la producción de anticuerpos antigénica específica, en este caso se utilizó un antígeno poco inmunogénico y ampliamente caracterizado en el laboratorio.

El perfil de anticuerpos obtenido por la administración de OVA sola es el característico para este antígeno ya que se produjeron anticuerpos de clase IgG principalmente.

Al coadministrar OVA con los adyuvantes CFA, IFA y LPS de E. coli se observa un incremento en la producción tanto de IgM como de IgG totales. Las respuestas obtenidas con CFA y IFA son similares y las más elevadas, mientras que la respuesta obtenida con LPS es menor en comparación con los otros adyuvantes (Figura 4).

En la coadministración de OVA con PapMV no se observa efecto adyuvante ya que los niveles de anticuerpos producidos son similares a lo observado con OVA sola (Figura 4).



Días después de la inmunización

Figura 4. Evaluación del efecto adyuvante del PapMV en la respuesta inmune de anticuerpos de clase IgM e IgG contra OVA por el método de ELISA.

Al evaluar la producción de los isotipos de IgG inducidos por la coimmunización con PapMV y de comparar con los inducidos con CFA, IFA y LPS se determinaron los títulos de los diferentes isotipos de IgG presentes en el suero de los ratones del experimento anterior utilizando el método de ELISA.

La coadministración de OVA con CFA, IFA y LPS indujo la producción de los cuatro isotipos mayoritariamente IgG1, de nuevo las respuestas obtenidas con CFA y IFA fueron las más elevadas y la obtenida con LPS es menor (Figuras 5a y 5b).

Al administrar OVA sola se observa que induce únicamente la producción de anticuerpos del isotipo IgG1. Para la respuesta inducida por OVA coadministrada con PapMV se esperaba un resultado similar ya que en la detección de anticuerpos anti-IgG total no observamos efecto adyuvante, sorprendentemente al detectar los isotipos de IgG observamos que hubo un incremento en la producción de anticuerpos del isotipo IgG2a e IgG2b, siendo mayor en el efecto en el caso de IgG2a pero no en los isotipos IgG1 e IgG3 lo cual es indicativo de una respuesta mediada por INF- γ (Figuras 5a y 5b).

También se observa que los niveles de anticuerpos producidos al coadministrar OVA con PapMV son similares a los producidos por la coadministración con LPS.

Sin embargo el efecto adyuvante no alcanzó los niveles observados con CFA E IFA. Es importante señalar que el efecto adyuvante del PapMV se observa en la fase tardía (después del refuerzo) de la producción de anticuerpos (Figura 5b), esto nos indica que en la primera etapa del esquema de inmunización (días 0 a 15), la inmunización de OVA con PapMV produjo un mayor número de células capaces de producir anticuerpos que al administrar OVA sola, una vez que se recibió el refuerzo el incremento en el título de anticuerpos se hizo evidente.

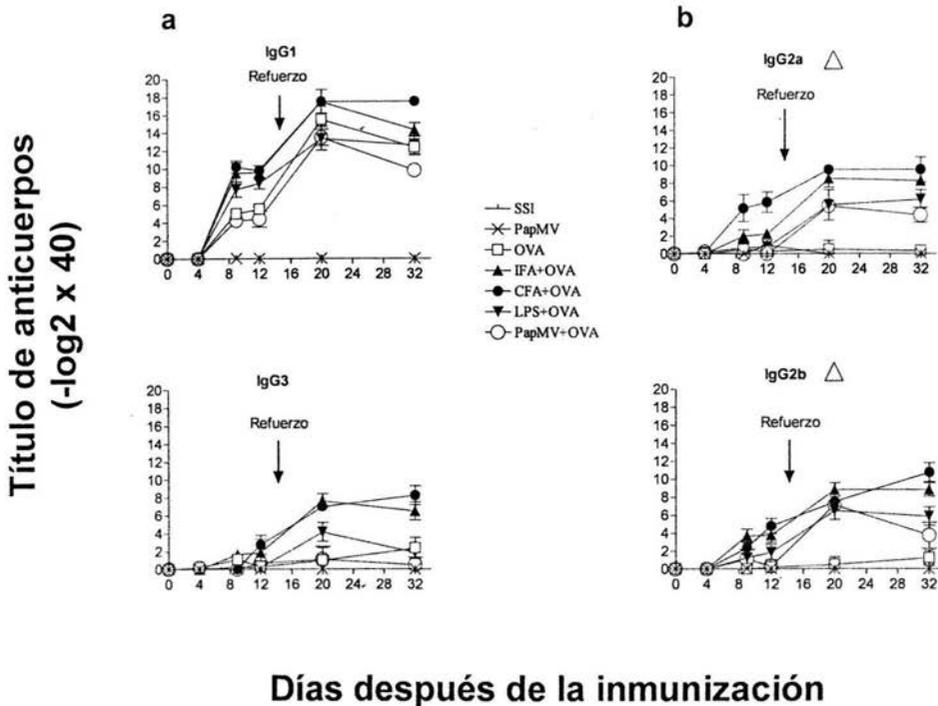


Figura 5. Evaluación del efecto de los adyuvantes CFA, IFA y LPS, y del PapMV sobre los isotipos de IgG durante la respuesta humoral anti-OVA.

3. El Virus de Mosaico de la Papaya tiene efecto adyuvante sobre la respuesta inmune de anticuerpos de clase IgM contra OmpCr.

Este experimento se realizó para evaluar el efecto adyuvante del PapMV sobre un antígeno muy inmunogénico derivado de un patógeno y por lo tanto con relevancia biológica para el hospedero.

Al administrar OmpCr sola se observa una producción rápida y elevada de anticuerpos en el día 4, esta disminuye rápidamente durante los días 8 a 12, a pesar de ello se pudieron detectar niveles bajos de anticuerpos hasta 120 días (Figura 6).

Cuando se coadministró OmpCr con CFA, IFA también se observó una producción rápida de anticuerpos al día 4, sin embargo esta no fue lo suficientemente elevada para observar un efecto adyuvante (Figura 6). Estos niveles de anticuerpos desaparecen rápidamente (día 30), esto puede significar se están estimulando los linfocitos T CD4+ los cuales, al secretar citocinas, promueven el cambio isotipo y por lo tanto la producción de anticuerpos de clase IgG y no IgM.

Para la coadministración de OmpCr con PapMV se observan títulos elevados de anticuerpos y se observa un ligero efecto adyuvante hasta el día 30, en los días siguientes (60 - 120) el título de anticuerpos disminuye hasta que ya no se detectan (Figura 6), es posible que la presencia del PapMV promueva el cambio de isotipo y la cantidad de células productoras de IgM disminuya rápidamente.

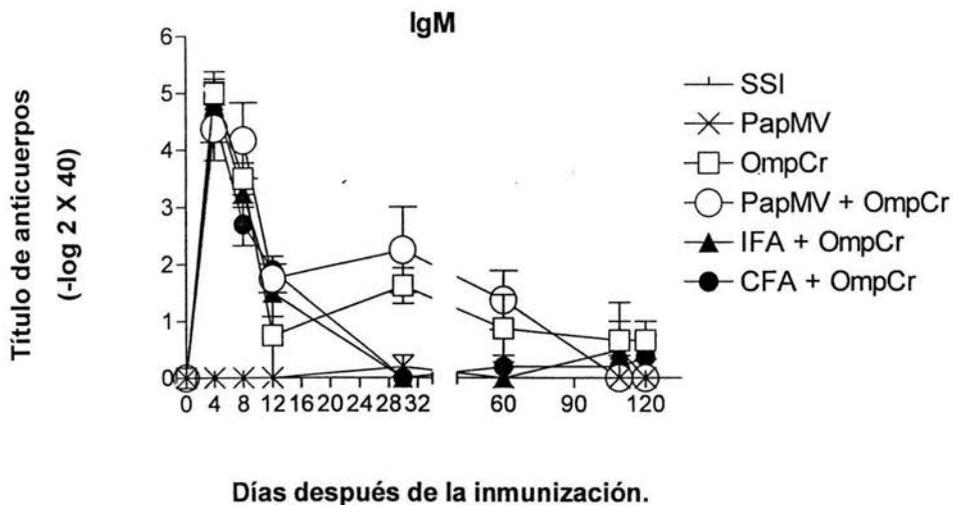


Figura 6. Efecto adyuvante del PapMV en la respuesta inmune de anticuerpos del tipo IgM contra OmpCr.

4. El Virus de Mosaico de la Papaya tiene efecto adyuvante sobre la respuesta inmune de anticuerpos de clase IgG contra OmpCr.

A los sueros de los ratones utilizados en el experimento anterior se les determinó el título de anticuerpos de clase IgG. Los niveles de anticuerpos obtenidos por la administración de OmpCr son detectables a partir del día 12 y alcanzan su nivel máximo (título de 6.5) hasta el día 30, estos niveles se mantienen hasta el día 109 y comienzan a disminuir en el día 120 (Figura 7).

En la producción de anticuerpos inducidos por la coadministración de OmpCr con CFA y IFA se alcanzan los niveles máximos hasta el día 60 estos se mantienen hasta el día 120 donde se observa un ligero decremento (Figura 7).

Para la coadministración de OmpCr con PapMV se observa una rápida y elevada producción de anticuerpos en la fase temprana de la respuesta inmune de anticuerpos. Sorprendentemente la cantidad de anticuerpos producidos en los primeros días (12 a 30) es mayor a la producida por los adyuvantes CFA y IFA. Los niveles de anticuerpos disminuyen gradualmente del día 60 al 120 (Figura 7).

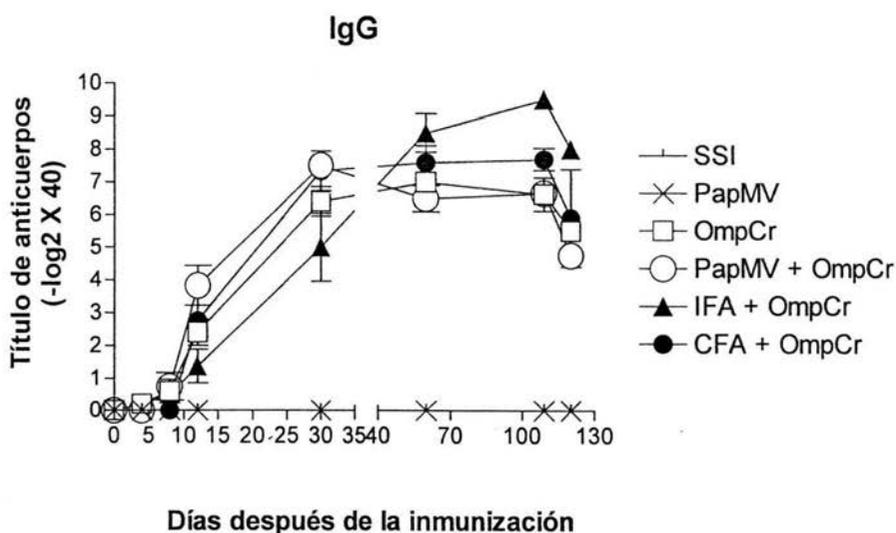


Figura 7. Efecto adyuvante del PapMV en la respuesta inmune de anticuerpos del tipo IgG contra OmpCr.

5. El Virus de Mosaico de la Papaya tiene efecto adyuvante sobre la respuesta inmune de anticuerpos de isotipo IgG1, IgG2a e IgG2b contra OmpCr.

Con el fin de caracterizar el tipo de respuesta obtenida por el efecto adyuvante del PapMV se determinó a las mezclas de los sueros del experimento anterior el título de los diferentes isotipos de IgG.

Al coadministrar OmpCr con CFA o IFA se indujo la producción de los cuatro isotipos principalmente IgG1 seguido por los isotipos IgG2a e IgG2b. Estos niveles de anticuerpos alcanzan sus niveles máximos en la fase tardía (días 60 – 120) exceptuando a los anticuerpos de isotipo IgG3 en los cuales los niveles máximos se alcanzaron en el día 30. En los días subsecuentes se observa una ligera disminución en los niveles de anticuerpos menos para el isotipo IgG2a (Figura 8).

Cuando se administró OmpCr sola se observó una mayor producción de anticuerpos de los isotipos IgG1 e IgG3 (Figura 8a). Para todos los isotipos se observó una disminución en el título de anticuerpos después de llegar al nivel máximo, para los isotipos IgG2a e IgG3 los niveles se mantienen constantes a partir del día 60 (Figura 8b).

La respuesta de anticuerpos obtenida por la coadministración de PapMV con OmpCr produjo niveles de anticuerpos de los isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b, mayores a los obtenidos de la administración de OmpCr sola (Figura 8). Para

estos isotipos, el título de anticuerpos disminuye después de llegar al punto máximo.

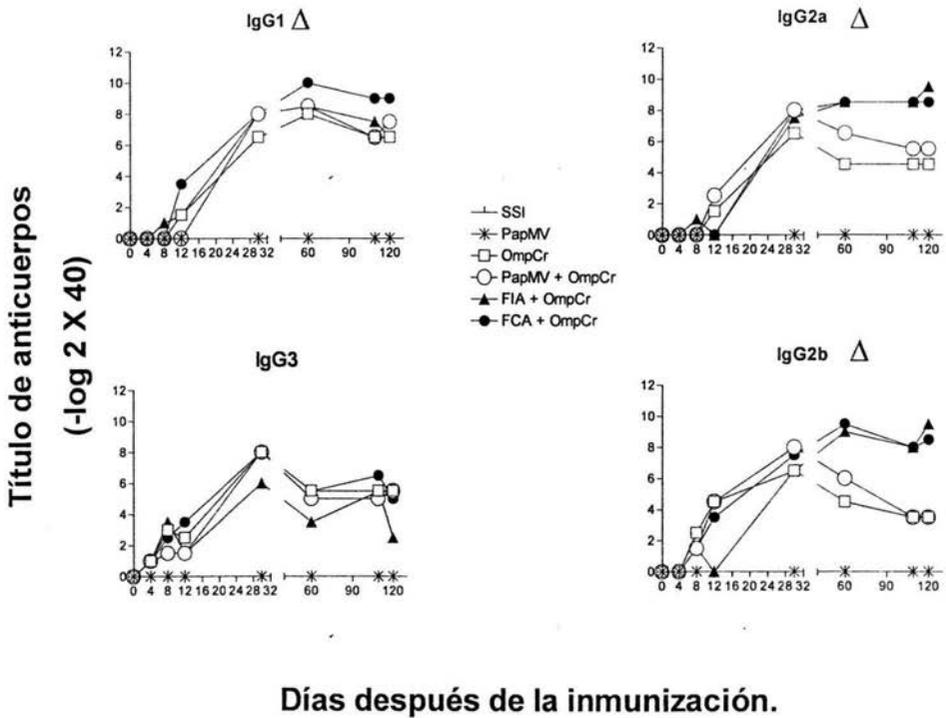


Figura 8. Evaluación del efecto de los adyuvantes CFA, IFA y del PapMV en la producción de isotipos de IgG.

X. Discusión de resultados.

A pesar de los avances tecnológicos y en el conocimiento de los mecanismos implicados en la generación de una respuesta inmune, el desarrollo de vacunas con capacidad de conferir protección de larga duración no ha sido el esperado. Parte del problema reside en la falta de adyuvantes que puedan ser utilizados en humanos, es por eso que el presente trabajo evalúa al PapMV como posible candidato a adyuvante con probable aplicación en humanos.

Al evaluar si el PapMV producía un efecto adyuvante sobre la respuesta inmune humoral contra la OVA, se realizó la determinación de anticuerpos de clase IgM e IgG totales donde no se observó algún efecto adyuvante provocado por el PapMV (Figura 1). El efecto adyuvante no pudo ser detectado en la determinación de anticuerpos de clase IgG debido a que el anticuerpo anti-IgG de ratón consta de una mezcla de anticuerpos cuya composición isotipo específica es desconocida. En comparación con los adyuvantes IFA, CFA y LPS, el PapMV tiene un efecto menor sobre la producción de anticuerpos.

Sin embargo cuando se realiza la determinación del título de anticuerpos para los isotipos de IgG, el efecto adyuvante se hace evidente en los isotipos IgG2a e IgG2b ya que la producción de anticuerpos por los ratones inmunizados con la mezcla PapMV+OVA es 32 veces mayor para IgG2a y 64 veces mayor para IgG2b con respecto a los ratones inmunizados con OVA.

Es importante resaltar que el efecto adyuvante se observa después de aplicar el refuerzo, esto puede indicar que debido a que la OVA es un antígeno poco relevante la respuesta inmune en la fase temprana (días 0 a 15) es principalmente contra el PapMV. Después del refuerzo, el aumento de la concentración de OVA con la preactivación de las células de la respuesta inmune innata provoca el efecto adyuvante y cambio de isotipo sobre la respuesta inmune de anticuerpos contra OVA.

El perfil de anticuerpos obtenidos por los ratones inmunizados con OVA es coherente con los obtenidos en estudios anteriores⁹³ realizados en la Unidad. Es bien sabido que el perfil de anticuerpos provocado por OVA en ratones BALB/c es el característico de una respuesta inmune de tipo Th₂, cuyo isotipo predominante es IgG1, sin embargo, el incremento de los anticuerpos IgG2a (característico de una respuesta de tipo Th₁) no sugiere que el PapMV promueve el cambio de isotipo en los linfocitos B (Figura 5) mediado por una respuesta de tipo Th₁. El efecto adyuvante visto en el isotipo IgG2b (con capacidad de fijar complemento) sugiere que el PapMV puede ser utilizado como adyuvante en contra de patógenos que requieran de la participación del complemento para su eliminación.

Con base en los resultados obtenidos para la OVA se decidió probar si el PapMV tendría efecto adyuvante sobre la OmpCr ya que esta proteína es muy inmunogénica y nos permite evaluar al PapMV sobre un antígeno de relevancia biológica.

En estos experimentos el efecto adyuvante, tanto para anticuerpos de clase IgM e IgG, se observa principalmente en los primeros días después de la inmunización (0-32). En ambos casos, anticuerpos de clase IgM e IgG, la producción de anticuerpos fue duplicada. Es importante destacar que el PapMV conserva el efecto adyuvante cuando es inoculado con un antígeno poco inmunogénico (OVA) como cuando es inoculado con un antígeno inmunogénico (OmpCr).

Comparando el efecto del CFA sobre la producción de anticuerpos de clase IgG con el efecto del PapMV, observamos que estos son similares durante los primeros treinta días después de la inmunización, sin embargo el CFA consigue mantener el título de anticuerpos elevado durante un mayor tiempo.

Es posible que el efecto adyuvante del PapMV sobre la respuesta inmune de anticuerpos contra OmpCr sea ocasionado por dos mecanismos, primero la retención del antígeno en el sitio de administración y segundo la estimulación de PRRs diferentes a los estimulados por la OmpCr sola, esto se observa (Figuras 6 y 7) en que la producción temprana de anticuerpos inducida por la coadministración de OmpCr con PapMV es mayor que la producción inducida por los adyuvantes CFA y IFA.

Cuando se caracterizó el efecto del PapMV sobre la respuesta inmune humoral contra OmpCr se observó que a diferencia de lo obtenido con la determinación de anticuerpos IgG totales, el efecto adyuvante del PapMV se observa principalmente en los días 30 y 60. El detectar un efecto adyuvante en la producción de

anticuerpos de los isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b inducido por la coadministración de PapMV con OmpCr es un indicador de que se indujo la producción de las citocinas IL-4, INF- γ , y TGF- β respectivamente.

Al comparar los resultados de este experimento con los de la administración de OVA y PapMV (Figuras 5 y 8) destaca que el efecto adyuvante principal se produce en los isotipos IgG2a e IgG2b, esto sugiere que el PapMV puede ser utilizado como un adyuvante que promueva la producción de anticuerpos con capacidad de fijar complemento.

A pesar de que el efecto adyuvante del PapMV es menor que el de CFA Y IFA, el PapMV presenta las ventajas de no ser tóxico, es de fácil manejo y aplicación. Además en el aspecto biotecnológico el PapMV tiene la gran ventaja que su producción es de bajo costo ya que una hectárea de papaya puede producir hasta un kilogramo de virus.

XI. Conclusiones

El virus del mosaico de la papaya tiene efecto adyuvante sobre la respuesta inmune de anticuerpos.

El efecto adyuvante se observa principalmente para los isotipo IgG2a, IgG2b e IgG1.

El incremento en la producción de anticuerpos provocada por el PapMV es considerablemente buena ya que es similar al alcanzado por el LPS de *E. coli* y en ocasiones superior al CFA y IFA.

XII. Anexos

1. Anexo I

Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7.4.

Pesar exactamente:

Cloruro de sodio 8.7g

Fosfato monobásico de sodio 0.7g

Fosfato dibásico de sodio 2.7g

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

2. Anexo II

Solución reguladora de carbonatos (SAC) pH 9.5.

Pesar exactamente:

Bicarbonato de sodio 7.0g

Carbonato de sodio 2.8g

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

3. Anexo III

Solución reguladora de citratos (SBC) pH 5.6.

Pesar exactamente:

Ácido cítrico 4.1g

Citrato de sodio 29.0g

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

4. Anexo IV

Solución de bloqueo (PBS + leche 5%).

Pesar 5g de leche descremada, agregar PBS suficiente para hacer un volumen de 100mL. Esta solución debe ser utilizada el mismo día en que es preparada.

XIII. Bibliografia

1. Noad, R. and Roy, P. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11(9), 438-444. 2003.
2. Latham, T. and Galarza, J. M. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J.Virol.* 75(13), 6154-6165. 2001.
3. Gilleland, H. E., Gilleland, L. B., Staczek, J., Harty, R. N., Garcia-Sastre, A., Palese, P., Brennan, F. R., Hamilton, W. D., Bendahmane, M., and Beachy, R. N. Chimeric animal and plant viruses expressing epitopes of outer membrane protein F as a combined vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 27(4), 291-297. 2000.
4. Gilleland, H. E., Jr., Gilleland, L. B., Staczek, J., Harty, R. N., Garcia-Sastre, A., Engelhardt, O. G., and Palese, P. Chimeric influenza viruses incorporating epitopes of outer membrane protein F as a vaccine against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Behring Inst.Mitt.* (98), 291-301. 1997.
5. Jenner, E. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, or cow-pox. *The Harvard Classics* 38(4), 149-231. 1910.
6. Kwak, L. W. and Longo, D. L. Modern vaccine adjuvants. Chabner, B. A. and Long, D. L. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy.* 749-763. 1996. Lippincott-Raven.
7. O'Hagan, D. T. and Valiante, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2(9), 727-735. 2003.
8. Marciani, D. J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov.Today* 8(20), 934-943. 15-10-2003.
9. Dupuis, M., Denis-Mize, K., LaBarbara, A., Peters, W., Charo, I. F., McDonald, D. M., and Ott, G. Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis. *Eur.J.Immunol.* 31(10), 2910-2918. 2001.
10. Ott, G. Vaccine adjuvants: Preparations Methods and Research Protocols. O'Hagan, D. Vaccine adjuvants. 211-228. 2001.
11. Peppoloni, S., Ruggiero, P., Contorni, M., Morandi, M., Pizza, M., Rappuoli, R., Podda, A., and Del Giudice, G. Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines. *Expert.Rev.Vaccines.* 2(2), 285-293. 2003.

12. Singh, M. and O'Hagan, D. T. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm.Res.* 19(6), 715-728. 2002.
13. Singh, M. and O'Hagan, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int.J.Parasitol.* 33(5-6), 469-478. 2003.
14. Audibert, F. Adjuvants for vaccines, a quest. *Int.Immunopharmacol.* 3(8), 1187-1193. 2003.
15. Benvenuti, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Grandjean, I., Jancic, C., Hivroz, C., Trautmann, A., Lantz, O., and Amigorena, S. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J.Immunol.* 172(1), 292-301. 1-1-2004.
16. Bachmann, M. F., Rohrer, U. H., Kundig, T. M., Burki, K., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262(5138), 1448-1451. 26-11-1993.
17. Bachmann, M. F., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur.J.Immunol.* 25(12), 3445-3451. 1995.
18. Bachmann, M. F. and Zinkernagel, R. M. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu.Rev.Immunol.* 15, 235-270. 1997.
19. Tangye, S. G., Ferguson, A., Avery, D. T., Ma, C. S., and Hodgkin, P. D. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J.Immunol.* 169(8), 4298-4306. 15-10-2002.
20. William E.Paul. *Fundamental Immunology.* Lippincott Williams & Wilkins. 5th. 2003. Philadelphia.
21. Acosta-Ramírez, E. C. Evaluación de la capacidad inmunogénica del virus del mosaico de la papaya. 14-2-2003.
22. Sasaki, S., Takeshita, F., Xin, K. Q., Ishii, N., and Okuda, K. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods* 31(3), 243-254. 2003.
23. Kersten, G. F. and Crommelin, D. J. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine* 21(9-10), 915-920. 14-2-2003.
24. O'Hagan, D. *Vaccine adjuvants: Preparation methods and reseach protocols.* O'Hagan, D. 2000. Totowa, NJ., Humana Press.

25. Gherardi, R. K., Coquet, M., Cherin, P., Belec, L., Moretto, P., Dreyfus, P. A., Pellissier, J. F., Chariot, P., and Authier, F. J. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain* 124(Pt 9), 1821-1831. 2001.
26. Gherardi, R. K., Coquet, M., Cherin, P., Authier, F. J., Laforet, P., Belec, L., Figarella-Branger, D., Mussini, J. M., Pellissier, J. F., and Fardeau, M. Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. Groupe d'Etudes et Recherche sur les Maladies Musculaires Acquisées et Dysimmunitaires (GERMMAD) de l'Association Française contre les Myopathies (AFM). *Lancet* 352(9125), 347-352. 1-8-1998.
27. Gluck, R. Adjuvant activity of immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIVs). *Vaccine* 17(13-14), 1782-1787. 26-3-1999.
28. Storni, T., Ruedl, C., Schwarz, K., Schwendener, R. A., Renner, W. A., and Bachmann, M. F. Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J.Immunol.* 172(3), 1777-1785. 1-2-2004.
29. Patel, G. B. and Sprott, G. D. Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit Rev.Biotechnol.* 19(4), 317-357. 1999.
30. Sprott, G. D., Patel, G. B., and Krishnan, L. Archaeobacterial ether lipid liposomes as vaccine adjuvants. *Methods Enzymol.* 373, 155-172. 2003.
31. Dalsgaard. A study of the isolation and characterization of the saponin Quil A. Evaluation of its adjuvant activity, with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. *Acta Vet.Scand.Suppl* (69), 7-40. 1978.
32. Higuchi, R, Tokimitsu, Y, and Komori, T. An acylated triterpenoid saponin from *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry* 27, 1165-1168. 1988.
33. van Setten, D. Multiple-stage tandem mass spectrometry implemented in the structure elucidation of Quil A saponins. 1999. University of Utrecht.
34. Kersten, G. F., Spiekstra, A., Beuvery, E. C., and Crommelin, D. J. On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (iscoms). *Biochim.Biophys.Acta* 1062(2), 165-171. 25-2-1991.
35. Marciani, D. J., Press, J. B., Reynolds, R. C., Pathak, A. K., Pathak, V., Gundy, L. E., Farmer, J. T., Koratich, M. S., and May, R. D. Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity. *Vaccine* 18(27), 3141-3151. 15-7-2000.

36. Soltysik, S., Wu, J. Y., Recchia, J., Wheeler, D. A., Newman, M. J., Coughlin, R. T., and Kensil, C. R. Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine* 13(15), 1403-1410. 1995.
37. Chen, H. and Rhodes, J. Schiff base forming drugs: mechanisms of immune potentiation and therapeutic potential. *J.Mol.Med.* 74(9), 497-504. 1996.
38. Rhodes, J., Chen, H., Hall, S. R., Beesley, J. E., Jenkins, D. C., Collins, P., and Zheng, B. Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs. *Nature* 377(6544), 71-75. 7-9-1995.
39. Rhodes, J. Discovery of immunopotentiatory drugs: current and future strategies. *Clin.Exp.Immunol.* 130(3), 363-369. 2002.
40. Marciani, D. J., Pathak, A. K., Reynolds, R. C., Seitz, L., and May, R. D. Altered immunomodulating and toxicological properties of degraded *Quillaja saponaria* Molina saponins. *Int.Immunopharmacol.* 1(4), 813-818. 2001.
41. Wu, J. Y., Gardner, B. H., Kushner, N. N., Pozzi, L. A., Kensil, C. R., Cloutier, P. A., Coughlin, R. T., and Newman, M. J. Accessory cell requirements for saponin adjuvant-induced class I MHC antigen-restricted cytotoxic T-lymphocytes. *Cell Immunol.* 154(1), 393-406. 1-4-1994.
42. Okada, H. and Toguchi, H. Biodegradable microspheres in drug delivery. *Crit Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* 12(1), 1-99. 1995.
43. O'Hagan, D. T., Jeffery, H., and Davis, S. S. Long-term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles. *Vaccine* 11(9), 965-969. 1993.
44. Eldridge, J. H., Staas, J. K., Meulbroek, J. A., Tice, T. R., and Gilley, R. M. Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect.Immun.* 59(9), 2978-2986. 1991.
45. O'Hagan, D. T. and Singh, M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert.Rev.Vaccines.* 2(2), 269-283. 2003.
46. Kreuter, J., Nefzger, M., Liehl, E., Czok, R., and Voges, R. Distribution and elimination of poly(methyl methacrylate) nanoparticles after

- subcutaneous administration to rats. *J.Pharm.Sci.* 72(10), 1146-1149. 1983.
47. Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr.Opin.Immunol.* 9(1), 4-9. 1997.
 48. Medzhitov, R. CpG DNA: security code for host defense. *Nat.Immunol.* 2(1), 15-16. 2001.
 49. Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2(8), 675-680. 2001.
 50. Wagner, H. Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity.* 14(5), 499-502. 2001.
 51. Rappuoli, R., Pizza, M., Douce, G., and Dougan, G. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Immunol.Today* 20(11), 493-500. 1999.
 52. Ulmer, A. J. Lipopolysaccharide: structure, bioactivity, receptors, and signal transduction. *Trends Glycosci.Glycotecnol.* 14, 53-68. 2002.
 53. da Silva Correla, J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. *J.Biol.Chem.* 276, 21129-21135. 2001.
 54. Re, F. and Strominger, J. L. Monomeric recombinant MD-2 binds tll-like receptor 4 tightly and confers lipopolysaccharide responsiveness. *J.Biol.Chem.* 277, 23427-23432. 2002.
 55. Johnson, D. A., Keegan, D. S., Sowell, C. G., Livesay, M. T., Johnson, C. L., Taubner, L. M., Harris, A., Myers, K. R., Thompson, J. D., Gustafson, G. L., Rhodes, M. J., Ulrich, J. T., Ward, J. R., Yorgensen, Y. M., Cantrell, J. L., and Brookshire, V. G. 3-O-Desacyl monophosphoryl lipid A derivatives: synthesis and immunostimulant activities. *J.Med.Chem.* 42(22), 4640-4649. 4-11-1999.
 56. Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S., and Takeshige, K. Activation of macrophages by linear (1right-arrow3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J.Biol.Chem.* 277(39), 36825-36831. 27-9-2002.
 57. Ross, G. D., Vetvicka, V., Yan, J., Xia, Y., and Vetvickova, J. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology* 42(1-3), 61-74. 1999.
 58. Yu, D., Kandimalla, E. R., Cong, Y., Tang, J., Tang, J. Y., Zhao, Q., and Agrawal, S. Design, synthesis, and immunostimulatory properties of

CpG DNAs containing alkyl-linker substitutions: role of nucleosides in the flanking sequences. *J. Med. Chem.* 45(20), 4540-4548. 26-9-2002.

59. Verthelyi, D., Ishii, K. J., Gursel, M., Takeshita, F., and Klinman, D. M. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J. Immunol.* 166(4), 2372-2377. 15-2-2001.
60. Maurer, T., Heit, A., Hochrein, H., Ampenberger, F., O'Keeffe, M., Bauer, S., Lipford, G. B., Vabulas, R. M., and Wagner, H. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32(8), 2356-2364. 2002.
61. Dalpke, A., Zimmermann, S., and Heeg, K. CpG DNA in the prevention and treatment of infections. *BioDrugs.* 16(6), 419-431. 2002.
62. Lee, J., Chuang, T. H., Redecke, V., She, L., Pitha, P. M., Carson, D. A., Raz, E., and Cottam, H. B. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(11), 6646-6651. 27-5-2003.
63. Zhang, L. F., Zhou, J., Chen, S., Cai, L. L., Bao, Q. Y., Zheng, F. Y., Lu, J. Q., Padmanabha, J., Hengst, K., Malcolm, K., and Frazer, I. H. HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. *Vaccine* 18(11-12), 1051-1058. 6-1-2000.
64. Fehr, T., Skrastina, D., Pumpens, P., and Zinkernagel, R. M. T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(16), 9477-9481. 4-8-1998.
65. Fehr, T., Bachmann, M. F., Bucher, E., Kalinke, U., Di Padova, F. E., Lang, A. B., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies. *J. Exp. Med.* 185(10), 1785-1792. 19-5-1997.
66. Boisgerault, F., Moron, G., and Leclerc, C. Virus-like particles: a new family of delivery systems. *Expert. Rev. Vaccines.* 1(1), 101-109. 2002.
67. Schirmbeck, R., Bohm, W., Melber, K., and Reimann, J. Processing of exogenous heat-aggregated (denatured) and particulate (native) hepatitis B surface antigen for class I-restricted epitope presentation. *J. Immunol.* 155(10), 4676-4684. 15-11-1995.
68. Schirmbeck, R., Thoma, S., and Reimann, J. "Empty" Ld molecules capture peptides from endocytosed Hepatitis B surface antigen particles for major histocompatibility complex class-I restricted presentation. *Eur. J. Immunol.* 26(12), 2812-2822. 1996.

69. Storni, T., Lechner, F., Erdmann, I., Bachi, T., Jegerlehner, A., Dumrese, T., Kundig, T. M., Ruedl, C., and Bachmann, M. F. Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles. *J.Immunol.* 168(6), 2880-2886. 15-3-2002.
70. Ruedl, C., Storni, T., Lechner, F., Bachi, T., and Bachmann, M. F. Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur.J.Immunol.* 32(3), 818-825. 2002.
71. Bachmann, M. F. and Zinkernagel, R. M. The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. *Immunol.Today* 17(12), 553-558. 1996.
72. Martin, F. and Kearney, J. F. Marginal-zone B cells. *Nat.Rev.Immunol.* 2(5), 323-335. 2002.
73. Arntzen, C. J. High-tech herbal medicine: plant-based vaccines. *Nat.Biotechnol.* 15(3), 221-222. 1997.
74. Lomonosoff, G. P. and Johnson, J. E. Use of macromolecular assemblies as expression systems for peptides and synthetic vaccines. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 6(2), 176-182. 1996.
75. COURTOIS, G., FLACK, A., JERVIS, G. A., KOPROWSKI, H., and NINANE, G. Preliminary report on mass vaccination of man with live attenuated poliomyelitis virus in the Belgian Congo and Ruanda-Urundi. *Br.Med.J.* 34(5090), 187-190. 26-7-1958.
76. Birch, R. G. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 48, 297-326. 1997.
77. Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den, Elsacker S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A., and Schell, J. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252(5479), 169-170. 8-11-1974.
78. Zaenen, I., Van Larebeke, N., Van Montagu, M., and Schell, J. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J.Mol.Biol.* 86(1), 109-127. 15-6-1974.
79. Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., and Carter, A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat.Biotechnol.* 18(11), 1151-1155. 2000.

80. Porta, C., Spall, V. E., Loveland, J., Johnson, J. E., Barker, P. J., and Lomonossoff, G. P. Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* 202(2), 949-955. 1-8-1994.
81. Usha, R., Rohll, J. B., Spall, V. E., Shanks, M., Maule, A. J., Johnson, J. E., and Lomonossoff, G. P. Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* 197(1), 366-374. 1993.
82. Sabin, A. B. Round table discussion on "Unifying concepts of leukemia and related neoplasms in man and animals leading to eventual control and prevention". Concluding remarks of the chairman. *Bibl.Haematol.* 39, 1239-1250. 1973.
83. Rupprecht, C. E., Wiktor, T. J., Johnston, D. H., Hamir, A. N., Dietzschold, B., Wunner, W. H., Glickman, L. T., and KOPROWSKI, H. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83(20), 7947-7950. 1986.
84. Tomasic, J., Hanzl-Dujmovic, I., Spoljar, B., Vranesic, B., Santak, M., and Jovicic, A. Comparative study of the effects of peptidoglycan monomer and structurally related adamantyltripeptides on humoral immune response to ovalbumin in the mouse. *Vaccine* 18(13), 1236-1243. 18-1-2000.
85. Morokata, T., Ishikawa, J., and Yamada, T. Antigen dose defines T helper 1 and T helper 2 responses in the lungs of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses. *Immunol.Lett.* 72(2), 119-126. 1-5-2000.
86. Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., Gonzalez, C. R., Garcia, J. A., and Kumate, J. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* 10(12), 811-813. 1992.
87. Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M. P., Martin, N., Ramirez, G., Gonzalez, C. R., Lopez-Macias, C., Sanchez, J., Kumate, J., and Ortiz-Navarrete, V. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 730, 350-352. 15-8-1994.
88. Jap, B. K. and Walian, P. J. Structure and functional mechanism of porins. *Physiol Rev.* 76(4), 1073-1088. 1996.
89. Gonzalez, C. R., Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Garcia, J. A., Blanco, F., and Kumate, J. Lymphocytic proliferative response to

outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*.
Microbiol.Immunol. 37(10), 793-799. 1993.

90. Gil-Cruz C. Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de la porina OmpC de *Salmonella enterica* serova Typhi. 2004. Centro Médico Nacional S.XXI, Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.
91. Lowry, O. H., Rosebrough, N. H., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275. 1951.
92. Karkhanis, Y. D., Zeltner, J. Y., Jackson, J. J., and Carlo, D. J. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal.Biochem.* 85(2), 595-601. 1978.
93. Ramírez Saldaña M. Influencia de las modificaciones estructurales del Lípido A del lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* sobre la respuesta de anticuerpos antígeno específica. 2003. Centro Médico Nacional S.XXI, Hospital de especialidades - UIM en Inmunoquímica.