

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

CONTRIBUCIÓN DE LAS PORINAS DE *Salmonella enterica* serovar Typhi  
EN LA DIVERSIFICACIÓN DE ANTICUERPOS A TRAVÉS DE LOS  
RECEPTORES TIPO TOLL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**NOEMÍ ALEJANDRA SAAVEDRA ÁVILA**



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 Lilia Vierna García

Vocal Biserka Sveshtarova Pekarkova

Secretario Constantino III Roberto López Macías

1er. Suplente Saturnino de León Chapa

2º. Suplente Norma Angélica Castellanos Chávez

El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro social

Dr. Constantino III Roberto López Macías  
ASESOR

M. en C. Maricela Ramírez Saldaña  
SUPERVISOR TÉCNICO

Noemí Alejandra Saavedra Ávila  
SUSTENTANTE

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Noemí y Víctor que siempre están conmigo.

A Erik y Ajax mis compañeros inseparables.

A mi abuelita Dominga, a Margarita y a mi madre postiza Lulú que me han ayudado y apoyado cada una como si fueran mis madres.

Al Dr. Constantino López porque además de ser mi jefe es un gran apoyo y un amigo.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

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

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

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

A mis compañeros del laboratorio de Inmunoquímica en especial a M. Maricela Ramírez y QFB. Rebeca Pérez que fueron mis asesoras y un gran apoyo académico.

A mis compañeros del laboratorio por la ayuda que me brindaron durante este proyecto, en especial a Alejandra Tenorio, Mario A. Moreno, Christian Pérez y Rossana.

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

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, por permitirme utilizar las

instalaciones del bioterio y por su colaboración sin la cual este trabajo no hubiera sido posible.

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.

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Proyecto 45261-M y por el Fondo para el Fomento a la Investigación Médica (FOFOI) proyectos: FP 2003/020 y FP 2006/1A)/I/022

## **INDICE**

Introducción.....	11
<b>I. ANTECEDENTES.....</b>	<b>14</b>
1. Inmunidad Innata.....	14
2. Inmunidad Adaptativa .....	17
3. Linfocito B.....	20
3.1 Generación de Linfocitos B maduros.....	21
3.2 Activación de los Linfocitos B mediante interacción con su antígeno.....	23
4. Anticuerpos.....	25
5. Generación del repertorio de anticuerpos.....	27
5.1 Rearreglo V(D)J.....	27
5.2 Edición del receptor.....	28
6. Diversificación del repertorio de anticuerpos.....	31
6.1 Cambio de Isotipo.....	31
6.2 Hipermutación Somática .....	33
7. Expresión de Receptores Tipo Toll en Linfocitos B.....	34
8. Porinas.....	38
9. Ovoalbúmina.....	40
10. Ratón MD4.....	41
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>42</b>
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>43</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
1. Titulación de anticuerpos por el método de ELISA.....	45

2. Conteo de células.....	47
3. Tipificación de ratones MD4.....	47
4. Marcaje de Lisozi0ma con isotiocianato de Guanidina.....	49
5. Separación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B mediante citometría de flujo.....	50
6. Extracción de RNA por el método de Trizol.....	51
7. Cuantificación, verificación de integridad y pureza del RNA extraído.....	52
8. Transcripción inversa del RNA mensajero.....	53
9. Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR punto final) .....	54
10. Reacción en Cadena de la Polimerasa Tiempo Real (PCR tiempo real)...	56
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>1. Las porinas de S. typhi diversifican el repertorio de anticuerpos.....</b>	<b>57</b>
<b>2. La coinmunización de ovoalbúmina (OVA) con porinas de S. typhi induce la diversificación del repertorio de anticuerpos específicos a OVA.....</b>	<b>59</b>
<b>3. La OVA no es capaz de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos en los ratones MD4.....</b>	<b>60</b>
<b>4. La coinmunización de OVA con ligandos de TLR induce la diversificación del repertorio de anticuerpo en ratones MD4.....</b>	<b>61</b>
<b>5. Los linfocitos B de ratón MD4 expresan los TLRs que fungen como ligandos de moléculas que fueron coadministradas con los antígenos.....</b>	<b>63</b>
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>65</b>
<b>VIII. CONCLUSIOONES.....</b>	<b>6</b>

<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>70</b>
------------------------------	-----------

## ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ABS	Albúmina sérica bovina
AID	Desaminasa inducida por activación
APC	Células presentadoras de antígeno
BCR	Receptor de linfocitos B
BZM	Linfocitos B de zona marginal
CD	Marcador de diferenciación
CLP	Progenitor de linfocitos común
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
FcR	Receptor Fc
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HEL	Lisozima de huevo de gallina
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferón
LAM	Lipoarabinomannano
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácidos lipoteicoicos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad

MALT	Tejidos linfoides asociados a mucosa
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NF	Factor nuclear
NK	Células asesinas naturales
OPD	Orto-fenilendiamina
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Peptidoglicana
Poly I:C	Copolímero del ácido poliinosínico y policitidílico
PRR	Receptores de reconocimiento patrón
RAG	Gen activador de la recombinación
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSI	Solución salina isotónica
SSR	Secuencias de señal de recombinación
TBE	Regulador de tris-boratos-EDTA
TD	Timo dependiente
TdT	Transferasa terminal desoxinucleotidilo
TI	Timo independiente
TIR	Receptor Toll/IL-1
TIRAP	Proteína adaptadora que contiene un dominio TIR
TLR	Receptor tipo toll
TRAM	Molécula adaptadora relacionada con Trif
Trif	Adaptador que induce IFN $\beta$ que contiene un dominio TIR

TNF      Factor de necrosis tumoral

## INTRODUCCIÓN

El sistema Inmune para su estudio se divide en sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato es considerado como la primera línea de defensa contra patógenos y es capaz de reconocer estructuras de microorganismos a través de un limitado número de receptores codificados en línea germinal denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)<sup>1</sup>. Al conjunto de moléculas que son reconocida por los PRRS se les denomina patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Dentro de los PRRs hay un grupo de receptores muy estudiado que son los receptores tipo toll (TLRs) que fungen como receptores de moléculas de diferente naturaleza química<sup>2,3</sup>.

En el sistema inmune adaptativo, el reconocimiento molecular de los antígenos está mediado por el receptor del linfocito B (BCR) y por el receptor de linfocito T (TCR) a través de la presentación de estos en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que se encuentran en células presentadoras de antígeno de la respuesta inmune innata, entre otras<sup>4-6</sup>. La estimulación de los linfocitos B precede la producción de anticuerpos y la de los linfocitos T genera la producción de citocinas y la actividad citotóxica de éstos. Los linfocitos B son las únicas células descritas capaces de sintetizar anticuerpos que son fundamentales en el reconocimiento, neutralización y eliminación de un gran número de antígenos y de moléculas de microorganismos<sup>7</sup>. Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas que tienen una estructura en común de cuatro cadenas polipeptídicas: Dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H)<sup>8</sup>. La capacidad del organismo para generar anticuerpos específicos contra un

gran número de moléculas es fundamental para generar inmunidad (protección) contra la infección y almacenar esta información para enfrentar una reinfección (memoria inmunológica). Estos procesos constituyen el principio de las vacunas<sup>9</sup>.

Los genes de las inmunoglobulinas son ensamblados durante la ontogenia de los Linfocitos B mediante un proceso de recombinación de genes llamada rearreglo V(D)J<sup>7,10-12</sup>, después de este rearreglo los Linfocitos B se pueden activar con su antígeno; en ocasiones, hay linfocitos que reconocen como antígenos a moléculas propias, estos linfocitos autorreactivos mueren por apoptosis o sufren una edición en el receptor que es un proceso mediante el cual hay un segundo rearreglo de éste provocando que los linfocitos dejen de ser autorreactivos<sup>13</sup>. Los linfocitos B que reconocen su antígeno se dirigen a centros germinales en donde pueden llevar a cabo diferentes procesos de diversificación de los genes de Inmunoglobulinas como son el cambio de isotipo e hipermutación somática<sup>11,14</sup>.

El cambio de isotipo altera la región constante de las cadenas pesadas de Ig. En contraste la hipermutación somática induce generalmente mutaciones puntuales en la región variable, lo que provoca que los anticuerpos tengan una mayor capacidad de reconocimiento de los antígenos. Queda mucho por estudiar acerca de cómo se llevan a cabo estos procesos de diversificación del repertorio a nivel molecular en particular se conoce muy poco sobre la contribución de la respuesta inmune innata en la generación de la diversidad del repertorio de anticuerpos<sup>11,14</sup>.

En estudios previos hemos mostrado que las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) inducen altos títulos vitalicios de anticuerpos bactericidas de diferentes subclases, mostrando así que son eficientes inductores de los mecanismos de diversificación del repertorio<sup>15</sup>. Sin embargo, no se conocen los

mecanismos moleculares involucrados en este proceso. Las porinas son también un PAMP de *S. typhi*, capaces de activar de manera eficiente la respuesta inmune innata, así estas proteínas son reconocidas por el sistema inmune como PAMP (Innato)<sup>16</sup> y antígeno (adaptativo)<sup>15</sup>. Esta dualidad PAMP-antígeno (Pamtigen) podría estar involucrada en los procesos de diversificación del repertorio de anticuerpos y en la generación de la memoria de anticuerpos generada por las porinas. Con el fin de estudiar si las características de las porinas como pamptigen se encuentran involucradas en el proceso de diversificación del repertorio de anticuerpos empleamos un modelo experimental constituido por un ratón transgénico cuyo repertorio está limitado al reconocimiento de Lisozima de huevo de Gallina (ratones MD4)<sup>17,18</sup>, a los cuales se les inmuniza con porinas y se mide la producción de anticuerpos específicos contra estas proteínas. El conocer la especificidad original del anticuerpo nos permite evaluar la diversificación del repertorio a través de la identificación de nuevas especificidades. Este trabajo aporta información relevante sobre la influencia de respuesta inmune innata sobre la respuesta inmune humoral.

## I. ANTECEDENTES

### 1. Inmunidad innata

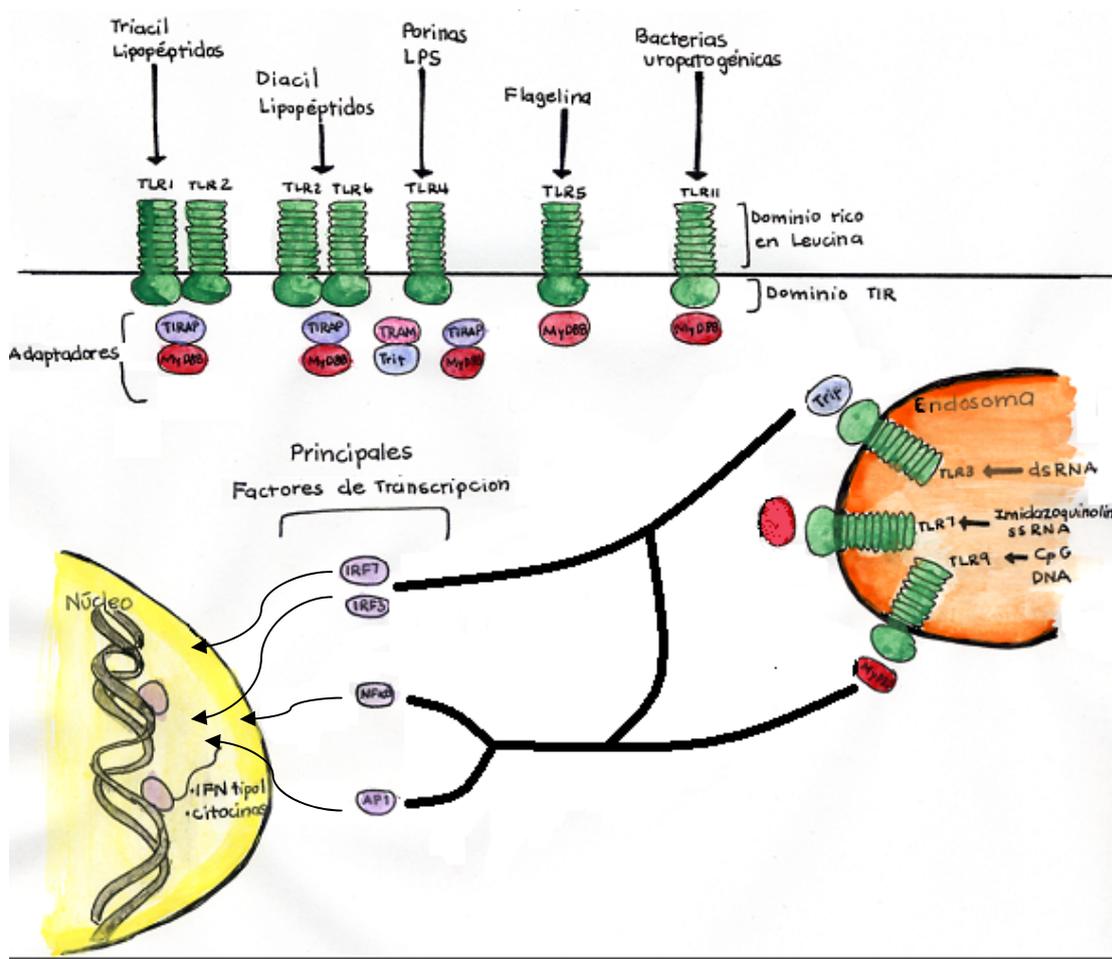
El sistema inmune de mamíferos para su estudio se divide en sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra patógenos y es capaz de reconocer microorganismos a través de un limitado número de receptores codificados en línea germinal denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)<sup>1</sup>. Los PRRs se encuentran tanto en forma soluble como anclados a la membrana externa de las células o en compartimientos intracelulares<sup>2,19</sup>.

Al conjunto de moléculas que son reconocidas por los PRRs se les denomina patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)<sup>20,21</sup>. Se han identificado diferentes PAMPs, algunos ejemplos son el lipopolisacárido (LPS), los ácidos Lipoteicoicos (LT), la peptidoglicana (PG) de bacterias Gram-positivas, las porinas de bacterias Gram negativas<sup>22</sup> la lipoarabinomanana (LAM) de *Mycobacterium*, la flagelina, las CpGs no metiladas, y el RNA de doble cadena<sup>20,23</sup>.

Los PAMPs al ser reconocidos por los PRRs inducen mecanismos de activación en el interior de la célula y esta activación tiene como consecuencia el inicio de la respuesta inmune contra el patógeno<sup>20,24</sup>. Dentro de los PRRs hay un grupo de receptores muy estudiado que son los TLRs, los cuales se encuentran expresados en la superficie de las células (TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 11) o en membranas de endosomas (TLR 3, 7 y 8)<sup>25</sup>.

Los TLRs son una familia de proteínas transmembranales de los que se conocen actualmente 11 miembros en humanos y 13 en ratones Figura 1. Los TLRs del 1 al

9 son conservados entre humanos y ratones. Sin embargo, TLR10 es funcional en humanos pero no en ratones, mientras que TLR11 es funcional en ratón pero no en humano. La porción citoplásmica de los TLR muestran alta similitud a la de la familia del receptor de IL-1 y es llamado dominio de Toll/receptor de IL-1. Las estructuras extracelulares son no relacionadas<sup>26</sup>.



**Figura 1.** Representación de los TLR y sus ligandos. TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 11 son receptores de membrana y TLR 3, 7 y 9 intracelulares. Los TLRs funcionan como receptores de moléculas de diferente naturaleza química, tienen diferentes adaptadores los cuales mediante una cascada de señalización activan factores de transcripción que se translocan en el núcleo induciendo la expresión de IFN (alfa y beta) y citocinas proinflamatorias<sup>27-30</sup>.

Los TLRs son capaces de unir a un gran número de PAMPs (Tabla 1). Esta unión inicia una rápida transducción de señales para la activación de factores nucleares como NF- $\kappa$ B para la producción de citocinas proinflamatorias o IRF para la producción de interferones<sup>26,28,31,32</sup>. Los productos derivados de la señalización alertan al sistema inmune de la presencia de infección y también ayudan a iniciar la respuesta inmune adaptativa a través de la activación y maduración de células dendríticas<sup>33</sup>.

Microorganismos	Receptor	Molécula asociada
Mycobacterium tuberculosis	TLR2	Lipoarabinomanana
	TLR4	Manósidos de fosfatidil inositol
	TLR9	DNA
Neisseria meningitidis	TLR2	Porina
	TLR4	Lipopolisacárido
	TLR9	DNA
Haemophilus influenzae	TLR2	Lipoproteína
	TLR4	Lipopolisacárido
Candida albicans	TLR2	Fosfolipomanana
	TLR4	Manana
	TLR9	DNA
Virus de Herpes simple	TLR2	Proteína viral
	TLR3	RNA de doble cadena
	TLR9	DNA
Virus de la influenza	TLR7, TLR8	RNA de cadena sencilla

	TLR3	RNA de doble cadena
Toxoplasma gondii	TLR2 TLR11	Cadena de glicofosfatidil inositol Profilina

**Tabla 1.** Principales moléculas que sirven como ligandos de TLRs y algunos patógenos que las expresan.<sup>34</sup>

## 2. Inmunidad adaptativa

En la inmunidad adaptativa el reconocimiento molecular está mediado por los linfocitos B y T a través de sus receptores. Los linfocitos B cuentan con la inmunoglobulina de superficie (Igs) como receptor para el reconocimiento del antígeno, conocido también como BCR o mlg, mientras que los linfocitos T cuentan con el receptor de linfocito T (TCR). El repertorio de estos receptores es muy amplio, de esta manera el sistema inmune adaptativo puede reconocer a un gran número de antígenos.

La estimulación de los linfocitos B genera la producción de anticuerpos y la de los linfocitos T genera la producción de citocinas y activación de linfocitos T citotóxicos, de esta manera el sistema inmune adaptativo es capaz de reconocer a los microorganismos patógenos y actuar en contra de éstos y sus productos<sup>5,7,35,36</sup>.

En la tabla 2 se comparan las características principales del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo.

	<b>Sistema Inmune Innato</b>	<b>Sistema Inmune adaptativo</b>
<b>Características</b>		
Especificidad	Reconoce patrones moleculares de microorganismos. Una misma célula es capaz de reconocer diferentes moléculas	<b>Reconoce antígenos propios y no propios. Una célula tiene una sola especificidad.</b>
Diversidad	Limitada a los receptores codificados en línea germinal	<b>Muy amplia; los receptores son producidos por la recombinación de segmentos génicos.</b>
Distribución de receptores	No clonal	<b>Clonal</b>
Memoria	No	<b>Si</b>
<b>Componentes</b>		
Solubles	Complemento, lectina de unión a manosa, pentraxina (proteína C reactiva), factores de la coagulación, citocinas entre otros.	<b>Anticuerpos producidos por Linfocitos B; granzima, perforinas y citocinas producidas por Linfocitos T</b>
Celulares	Neutrófilos, los fagocitos mononucleares, células dendríticas y los linfocitos NK ( <i>natural killer</i> , citolíticos naturales) y NKT	<b>Linfocitos T y linfocitos B</b>
Receptores de superficie	<u>TLRs</u> , Dectin-1, CD14, receptor de manosa, receptores NOD1, NOD2 entre otros	<b>BCR, TCR, <u>TLRs</u></b>

**Tabla 2.** Principales características y componentes del sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. <sup>1,2,9,37</sup>

Los componentes celulares del sistema inmune adaptativo son los Linfocitos T y Linfocitos B mientras que los humorales son citocinas y anticuerpos (Tabla 2). Durante la fase temprana de diferenciación de Linfocitos T inmaduros expresan tanto CD4 como CD8 (que se les denomina dobles positivas). En la siguiente fase los Linfocitos T CD4 (cooperadores) son seleccionados a través de la interacción con moléculas del MHC de clase II, mientras que los linfocitos T CD8 (citotóxicos) son seleccionados mediante su interacción con moléculas de MHC de clase I, de esta manera los linfocitos T CD4+ y CD8+ permanecen restringidos al reconocimiento de antígeno en el contexto de moléculas de MHC<sup>38</sup>.

Los linfocitos B son las únicas células descritas capaces de sintetizar anticuerpos; estos anticuerpos reconocen a los antígenos y pueden neutralizar la capacidad infecciosa de los microorganismos y eliminarlos al activar diversos mecanismos efectores.<sup>9,37</sup>

### 3. Linfocitos B

En la médula ósea las células hematopoyéticas pluripotenciales se diferencian en Progenitores Linfoides Comunes (CLP), las cuales dan a lugar a precursores linfoides y posteriormente a células pro-B, pre-B y linfocitos B inmaduros<sup>39-41</sup>.

El proceso de desarrollo que tiene como resultado la producción de células B plasmáticas y de memoria puede dividirse en tres amplias etapas: a) generación de células B maduras, b) activación de células B maduras cuando interactúan con el antígeno y c) diferenciación de células B activadas en células plasmáticas y de memoria<sup>5,7,42</sup>.

Una célula B madura sale de la médula ósea y expresa Inmunoglobulina unida a membrana con especificidad antigénica única. Estas células B que aun no reconocen antígeno circulan en la sangre y en la linfa y migran a los órganos linfoides secundarios, en especial al bazo y los ganglios linfáticos. Cuando el antígeno es reconocido a través del BCR activa al linfocito B, éste prolifera y algunas de las células que proliferaron se diferencian en células plasmáticas que secretan anticuerpos y después en células B de memoria. Dos tipos de cambios genéticos ocurren durante la diferenciación. Primero se llevan a cabo mutaciones que cambian las propiedades de unión por lo que los linfocitos B llevan a cabo un proceso de maduración de la afinidad y posteriormente se llevan a cabo mutaciones en la fracción constante que dan lugar al cambio de isotipo.<sup>43,44</sup>

### 3.1 Generación de linfocitos B maduros

La maduración consta de una serie de estadios secuenciales: a) maduración temprana, b) expresión de los genes de los receptores antigénicos y c) selección del repertorio maduro.<sup>44</sup>

En la maduración temprana hay una fuerte actividad mitótica estimulada por IL-7 que es producida por células estromales lo que provoca un incremento en el número de células<sup>43,44</sup>. En este estadio los linfocitos son llamados células pro-B<sup>43,44</sup>. Al terminar este proceso se lleva a cabo la expresión de los receptores antigénicos, esta etapa es muy importante ya que es necesaria para la generación de un repertorio diversificado y selectivo de los linfocitos B<sup>7</sup>. Los genes de los receptores de antígeno funcionales se generan en los linfocitos B inmaduros, también denominados Linfocitos pro B, mediante el ensamblaje de varias regiones: variable (V), de diversidad (D) y de unión (J) que codifican un exón mediante un proceso denominado recombinación V(D)J<sup>11</sup>. Los receptores generados que usualmente se denominan receptores sustitutos transmiten señales a los linfocitos que son necesarias para su supervivencia y proliferación, y de esta manera completar su maduración. En esta fase intermedia de maduración, los linfocitos B son conocidos como linfocitos pre-B, los cuales poseen cadenas de receptores antigénicos maduros unidos a una proteína invariante adicional, no se sabe si estos receptores cuentan con ligandos pero si sabe que son capaces de transmitir señales que ayudan al desarrollo y diferenciación del Linfocito B<sup>12</sup>.

Para ser un linfocito B inmaduro la célula pre-B pasa por un proceso llamado selección negativa en donde se seleccionan células B autorreactivas en la médula

ósea y subsecuentemente hay eliminación clonal de células B inmaduras que expresan autoanticuerpos<sup>7</sup>. La selección negativa de células B inmaduras no siempre tiene como resultado su eliminación inmediata, cuando algunas células inmaduras se unen a un autoantígeno se detiene la maduración y se aumentan la expresión de moléculas como RAG-1 y RAG-2 comenzando con un rearreglo adicional de su DNA de cadena ligera endógeno<sup>7,41,45-48</sup>. Algunas de estas células tienen éxito al reemplazar la cadena ligera kappa del anticuerpo reactivo a un autoantígeno con una cadena lambda codificada por segmentos génicos endógenos de ésta cadena. Como resultado de este proceso, denominado edición del receptor, estas células empiezan a expresar una IgM editada, con una cadena ligera diferente y una especificidad que no es autoreactiva. Estas células escapan de la selección negativa y salen de la médula ósea<sup>12,44</sup>.

### 3.2 Activación de Linfocitos B mediante interacción con su antígeno

Una vez que las células B abandonan la médula ósea migran por vía sanguínea y linfática trasladándose a los órganos linfoides secundarios, en especial al bazo y los ganglios linfáticos. Dependiendo de la naturaleza del antígeno, la activación de la célula B puede seguir una de dos vías diferentes, una dependiente de Linfocitos T cooperadores ( $T_H$ ) y la otra no. La respuesta de la célula B a antígenos dependientes del timo exige contacto con los linfocitos  $T_H$  y no solo de las citocinas derivadas de éstos, por el contrario los antígenos que pueden activar los linfocitos B sin este tipo de participación directa de linfocitos  $T_H$  se conocen como antígenos independientes de timo<sup>5,49-51</sup>.

Los antígenos timo independientes se dividen en tipo 1 (TI-1) y tipo 2 (TI-2), éstos activan células B por diferentes mecanismos. Generalmente los antígenos TI-1 activan a la célula policlonalmente (mitógenos), es decir que son capaces de activar linfocito B sin importar su especificidad antigénica, ni tampoco si las células son maduras o inmaduras, se ha observado que algunos de estos antígenos estimulan la proliferación y secreción de anticuerpos; mientras que cuando se someten a bajas concentraciones de éstos solo se activan las células B específicas para epitopos de estos antígenos. El antígeno TI-1 más estudiado es el LPS un componente de la pared de células Gram negativas. Los antígenos TI-2 entrecruzan de forma extensa el BCR activando a los linfocitos B maduros e inactivando linfocitos B inmaduros, adicionalmente este tipo de antígenos necesitan adicionalmente citocinas derivadas de  $T_H$  para la proliferación de los linfocitos B y cambio de isotipo. Las respuesta a antígenos TI casi siempre es más débil, no se forman células de memoria y el anticuerpo que predominantemente

se secreta es IgM, lo que señala un valor bajo de cambio de isotipo por lo cual se ve que para la generación de linfocitos B de memoria, la maduración de la afinidad y el cambio de isotipo es muy importante la acción de los linfocitos  $T_H$ <sup>5,49-51</sup>.

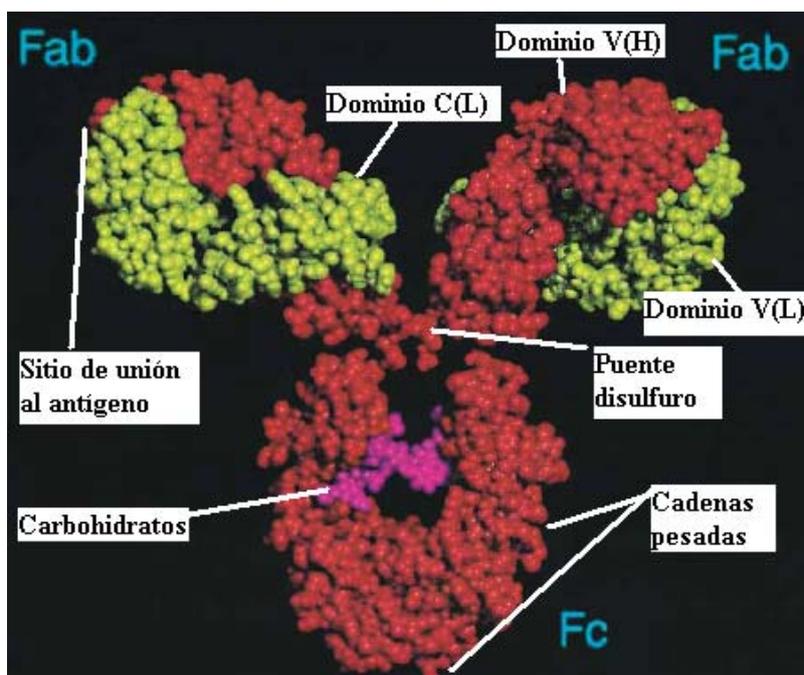
La activación de los linfocitos B por antígenos de naturaleza proteica que se encuentran de manera soluble (antígenos Timo dependientes) requiere la participación de los linfocitos  $T_H$ ; la unión del antígeno al BCR produce endocitosis mediada por receptor y es procesada por la vía endocítica de péptidos, lo que provoca un incremento en la expresión de MHC clase II y CD86 lo que incrementa su capacidad para funcionar como una célula presentadora de antígeno. Una vez que los péptidos fueron procesados son presentados en el contexto de MHC clase II que es reconocido por el Linfocito  $T_H$  el cual se activa e incrementa la expresión de CD40L el cual tiene interacción con CD40 en el Linfocito B e inmediatamente después CD28 del Linfocito T con CD86 del Linfocito B. El Linfocito B entonces expresa receptores para diversas citocinas que son liberadas por linfocitos  $T_H$  (IL-2, IL-4 e IL-5 entre otras) lo cual favorece la proliferación y diferenciación de Linfocitos B en células plasmáticas y células de memoria<sup>5,49-51</sup>.

Las interacciones con múltiples citocinas como son  $IFN_\gamma$ ,  $TGF\beta$ , IL-2, IL-4 e IL-5 emiten señales necesarias para la proliferación y cambio de isotipo durante la diferenciación de las células plasmáticas. Las células que sobreviven a la selección de la zona clara de los centros germinales también se diferencian en células de memoria las cuales expresan isotipos adicionales de anticuerpos como IgG, IgA e IgE, cuya vida puede ser prolongada, expresa en mayor cantidad

moléculas de adherencia a células estromales y tiene una afinidad promedio más alta que los Linfocitos B inmaduros<sup>5,7,11,44,52</sup>.

#### 4. Anticuerpos

Los anticuerpos son glicoproteínas de peso molecular aproximado de 150 kDa, pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas (Ig). Estas moléculas tienen una estructura en común de cuatro cadenas polipeptídicas, esta estructura se integra de dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H). Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro y por interacciones no covalentes para formar un heterodímero H-L y dos de ellos están unidos entre sí para formar una estructura tetramérica. La variación máxima en contenido de aminoácidos se encontró en las regiones V(H) y V(L) a las cuales se denominaron inicialmente regiones hipervariables las cuales forman el sitio de unión al antígeno, debido a que el sitio de unión al antígeno es complementario a la estructura del epítopo estas áreas se denominan en la actualidad regiones determinantes de la complementariedad (CDR)<sup>8</sup>.



**Figura 2.** Estructura cristalográfica de un anticuerpo y sus componentes. Modificado<sup>53</sup>.

Con el fin de ser eficaces ante una respuesta en contra de una molécula no propia. Los anticuerpos no solo reconocen al antígeno, sino también activan respuestas que tienen como resultado la eliminación del antígeno e indirectamente la muerte del patógeno. Las regiones variables del anticuerpo son los únicos agentes de unión a antígenos, la región constante de la cadena pesada (CH) tiene a su cargo una diversidad de interacciones cooperadoras con otras proteínas, células y tejidos cuyos resultados son las funciones efectoras de la respuesta humoral<sup>8</sup>.

## 5. Generación del repertorio de anticuerpos.

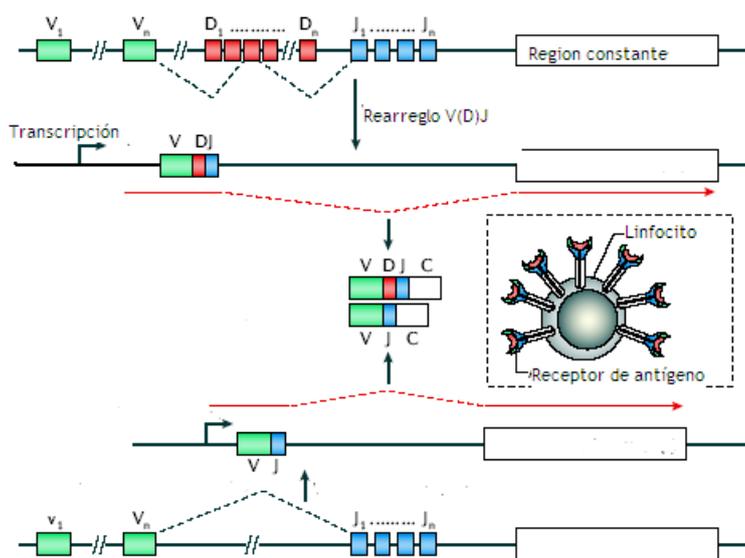
### 5.1 Rearreglo V(D)J

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

En términos generales el rearreglo es iniciado por la recombinasa V(D)J compuesta por las proteínas del gen activador de la recombinación 1 y 2 (RAG-1 y RAG-2). Juntas RAG-1 Y RAG-2 se unen a SSR que sitian a cada segmento génico e introducen un corte de doble cadena entre SSR y la secuencia de DNA que lo rodea. Los fragmentos de DNA terminales generados por el rompimiento son asimétricos, con la codificación terminal covalentemente sellada en forma de una horquilla y la señal terminal presente como un fragmento terminal como 5' fosforilado. La primer etapa del rearreglo V(D)J es el punto en el cual se impone la mayor parte, si no es que toda, la regulación de la reacción de recombinación<sup>7,14,47,54,55</sup>.

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

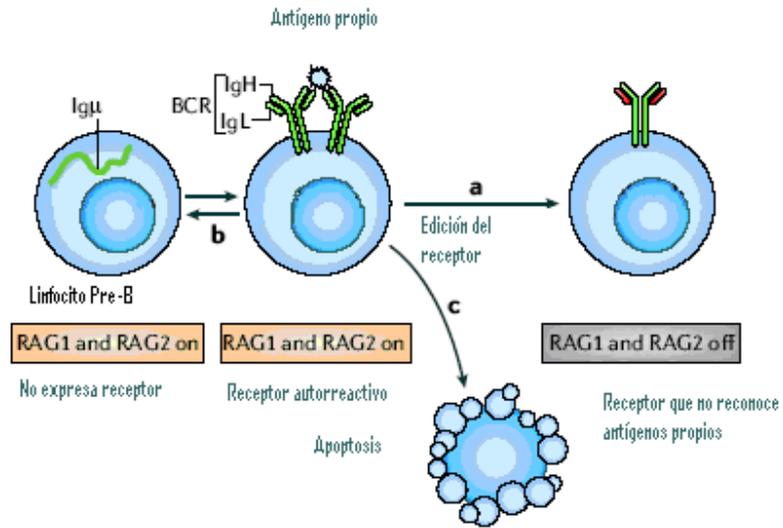
pueden ser generados mediante la unión de segmentos terminales con codificación terminal. La regeneración de la unión de una señal con su marca de codificación original da lugar a una unión abierta y cerrada, mientras que la unión de una señal con la marca de codificación de su compañero de reacción genera una unión híbrida, produciendo diversos cambios en la secuencia final y de esta forma en las proteínas a las que dan lugar dando lugar a un repertorio diversificado al azar que tiende por ello a ser más selectivo. Finalmente el complejo RAG-1 y RAG-2 unido a las señales terminales catalizan el ataque que provoca el cambio de sitio de las señales terminales sobre un DNA blanco no relacionado<sup>7,11,14,47,55</sup>. Este proceso promueve la diversidad de las especificidades que tienen las Inmunoglobulinas en el reconocimiento de epitopos ya que en línea germinal se encuentran codificadas regiones con múltiples exones que son unidos al azar por medio de diferentes procesos de recombinación provocando la generación de anticuerpos con una mayor afinidad al antígeno pero también anticuerpos con una afinidad menor<sup>11,47</sup>.



**Figura 3.** Esquema general de los rearrreglos V(D)J para el ensamblaje de los genes de receptor de antígeno<sup>7</sup>.

## 5.2 Edición del receptor

La edición del receptor es probablemente una adaptación que es necesaria debido a la alta probabilidad de autorreactividad del receptor. En los Linfocitos B, los genes que codifican para las dos cadenas del receptor de antígeno parece que son especialistas en promover la generación de diversas especificidades y la regulación de esas especificidades a través de una edición eficiente. Probablemente el ejemplo más claro de cómo la regulación de los rearrreglos está relacionada con la señalización antígeno receptor implica tolerancia de linfocitos B, esta tolerancia puede ocurrir por pérdida clonal, inactivación celular (anergia) o edición de receptor. La edición del receptor es un proceso que altera los receptores del antígeno permitiendo que se lleven a cabo rearrreglos de los elementos del gen que codifican el receptor. Este proceso es el mecanismo de tolerancia dominante para desarrollar linfocitos B y ocurre en la etapa de maduración de Linfocitos B en médula ósea. Cuando estos Linfocitos B encuentran un antígeno propio que induce la señalización mediante el BCR su proceso de desarrollo es bloqueado y el rearrreglo V(D)J continúa. Si su desarrollo continúa y con la recombinación en el loci que codifica para la cadena IgL y posiblemente el loci IgH entonces se llevan a cabo modificaciones en los genes de la Ig y por lo tanto en la especificidad del BCR lo cual provoca que las células no sean más autoreactivas. Una sorprendente proporción de nuevos Linfocitos B son autorreactivos y se vuelven tolerantes mediante este mecanismo<sup>13</sup>.



**Figura 4.** En la edición del receptor un linfocito B que encuentra un antígeno propio detiene su crecimiento y puede morir por apoptosis o continuar con su arreglo V(D)J en el cual pueda variar su región variable y de esta manera que deje de ser autorreactiva. Modificado<sup>13</sup>

## 6. Diversificación del repertorio de anticuerpos

Los linfocitos B que reconocen su antígeno se dirigen a los centros germinales en donde pueden llevar a cabo diferentes procesos de diversificación de los genes de las Inmunoglobulinas como son el cambio de isotipo e hipermutación somática. El cambio de isotipo altera la región C de las cadenas pesadas de Ig, la parte que lleva a cabo la parte efectora. En contraste la Hipermutación somática induce generalmente mutaciones puntuales en la región V de los genes de la cadena pesada y ligera de la Ig<sup>14</sup>.

### Cambio de Isotipo

Este proceso está limitado a Linfocitos B activados y se inicia debido a la unión al antígeno específico de estas células. Este proceso permite la expresión de cadenas pesadas las cuales desencadenan nuevas funciones efectoras. El cambio de isotipo también ocurre en cierto grado durante la respuesta antígeno T independiente que tiene lugar en la zona marginal del bazo fuera de los centros germinales; sin embargo, ocurre mucho más frecuentemente en los linfocitos que reciben el estímulo de un antígeno T dependientes. El cambio de isotipo ocurre en las áreas de proliferación de células B especializadas de los tejidos linfoides secundarios que se encuentra en la zona oscura de los centros germinales. El cambio de isotipo aparentemente es regulado por la naturaleza de los ligandos al BCR, el tipo de ayuda del Linfocito T y del entorno de citocinas<sup>7,11,14,56</sup>.

La transcripción en línea germinal es detectable cuatro días después de la primera exposición al antígeno T dependiente y se incrementa en paralelo con la formación de centros germinales. Horas después de la segunda exposición al antígeno la

transcripción en línea germinal es detectable en células B localizadas en la zona de células T de tejidos linfoides secundarios y podría preceder la primera división celular y la entrada de células B en los centros germinales o en los dominios extrafolliculares <sup>7,11,14,56</sup>.

El proceso inicia cuando la enzima deaminasa inducida por activación (AID) provoca una lesión en dos regiones del gen de la Ig (Figura 5). El rompimiento de estas regiones es mediado por las vías de uracil DNA glicosilasa (UNG) y Reparación de los errores (MMR), después son ligadas por los componentes de la ruta de reparación de unión final de DNA no homólogo (NHEJs). Finalmente el resultado es que la región constante  $\mu$ , que es proximal a la región V funcional, es reemplazada conservando intacta la región V <sup>7,11,14,56</sup>.

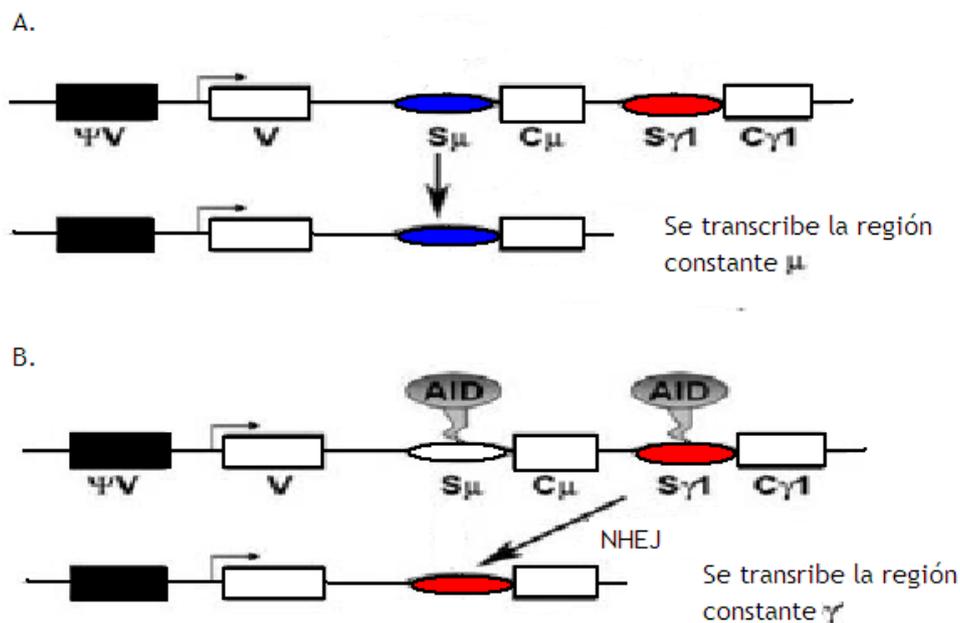


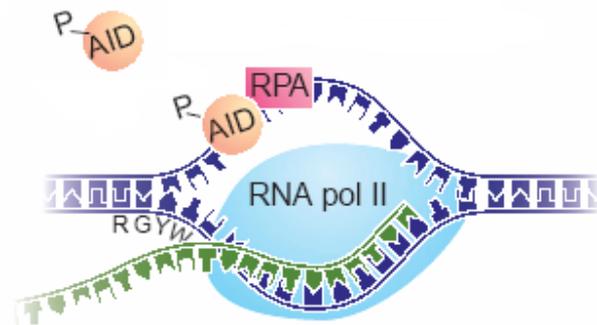
Figura 5 Mecanismo del cambio de isotipo. A) AID no induce lesiones en las dos regiones para que se lleve a cabo el cambio de isotipo. B) Participación de AID en el cambio de isotipo. Modificado<sup>11</sup>.

## Hipermutación Somática

No se ha podido describir detalladamente como es que molecularmente se lleva a cabo el mecanismo de hipermutación somática, sin embargo existe una idea de cómo los linfocitos B utilizan factores específicos de tipo celular para iniciar un ataque en el locus variable de Ig por lo que emplean rutas de reparación y recombinación comunes para modificar la secuencia del DNA. La hipermutación se lleva a cabo en las regiones variables de los genes de las Ig en los linfocitos que han tenido contacto primario con su antígeno, los Linfocitos se dirigen a las zonas oscuras de los centros germinales en donde se lleva a cabo este proceso. Inicialmente se propuso que la función de AID es editando el RNA<sup>56</sup> cambiando la cascada de señalización original de generación de proteínas del DNA original. Sin embargo, actualmente hay evidencia de que actúa directamente desaminando el DNA<sup>14,57</sup>.

Las mutaciones inducidas por AID en la hipermutación somática (SHM) son predominantemente puntuales pero ocasionalmente se han observado inserciones y deleciones. Las mutaciones transicionales ocurren aproximadamente 2 veces mas que las de transversión y una alta proporción de las mutaciones se da en el sitio DGYW (donde D denota adenosina; G guanosina o variar por timidina T; Y denota citidina o T, y W denota A o T) o su complemento en reversa WRCH ( donde R denota A o G, y H denota T, C o A), que como se había mencionado se encuentran en la región variable mostrando que la SHM es influenciada por la secuencia primaria del DNA. Las mutaciones están confinadas a una región de 1-2 kb en genes de la Ig. La frecuencia de mutaciones no es constante a lo largo de la región mutada y disminuye exponencialmente con una distancia creciente desde el

lugar de inicio de la transcripción. El proceso inicia cuando AID que predominantemente se encuentra en el citoplasma entra al núcleo por una señal de localización, es fosforilada por la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) y posteriormente ya fosforilada entra en contacto con la proteína de replicación A (RPA) la cual se ha relacionado que dirige a AID hacia la región variable (Figura 6). AID inicia la desaminación de nucleótidos de citosina dando lugar a uracilos y la DNA polimerasa incluirá un nucleótido de Adenina creando la mutación<sup>11,13,14,57,58</sup>.



**Figura 6.** Complejo formado por AID y RPA durante la transcripción. Modificado<sup>59</sup>

#### 4. Expresión de receptores tipo toll en Linfocitos B

Desde su descripción se consideró que los TLRs eran receptores que se expresaban únicamente en células del Sistema Inmune Innato, pero recientemente se ha observado que se encuentran tanto en éstas como en células del sistema inmune adaptativo. En linfocitos B y T humanos se han reportado que expresan TLR 1-6 8 y 9 (LT) y 1-2, 4,6,8-10 (LB) <sup>60</sup>

Se ha observado que éstos receptores tienen funciones en las células del Sistema Inmune Innato y recientemente se ha estudiado cual es la función que éstas pueden tener en células como linfocitos B y T <sup>29,30,60-62</sup>.

Se ha observado que en linfocitos T TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9 actúan como receptores coestimuladores para ayudar a la proliferación o producción de citocinas de los linfocitos T estimulados por el TCR, adicionalmente se ha observado que TLR2, TLR5 y TLR8 modulan la actividad de supresión que ocurre entre CD25+CD4+ y células T reguladoras<sup>62</sup>.

En cuanto a los linfocitos B, se han realizado estudios en los cuales se ha observado que los TLRs funcionan como adyuvantes en la generación de anticuerpos aunque estos conceptos se encuentran en debate actualmente, hay otros estudios en donde se observa que contribuyen en el cambio de isotipo <sup>63-65</sup> e incluso algunos mencionan que fungen como tercera señal además del antígeno y las señales de los Linfocitos T CD4 en los linfocitos B para generar anticuerpos<sup>66</sup> a continuación se describirán con orden cronológico brevemente estos estudios con el fin de describir el papel que actualmente se cree que tienen los TLR en los Linfocitos B.

Desde el 2003 se ha descrito que mediante el estímulo de TLR9 puede haber un cambio de isotipo, en este estudio se habla acerca de que la unión de CpGs a TLR9 en linfocitos B activa la síntesis de T-bet que es un factor de transcripción en linfocitos T y en este estudio se observa que induce el cambio de isotipo hacia IgG2a y probablemente inhibe la producción de IgG1 e IgE <sup>65</sup> el mecanismo no está bien descrito, pero se observa que mediante este ligando de TLR9 se genera este cambio de isotipo. Además linfocitos B de memoria proliferan mediante la unión de CpG a TLR9 sin el estímulo antigénico<sup>63</sup>.

Adicionalmente a la cooperación de T, la generación de anticuerpos T-dependientes requiere de la activación de TLRs en células B<sup>67</sup>.

En 2006 se hicieron estudios donde se afirma que el estímulo de los Receptores Tipo Toll es necesario como una tercera señal para la activación de Linfocitos B humanos<sup>66</sup>. En este estudio se observó que la estimulación del BCR inicialmente ayuda a que se lleve a cabo la división celular pero no es suficiente para promover la supervivencia y diferenciación de éstos lo que conduce a que deje de llevarse a cabo la proliferación de linfocitos B, se requiere además de la cooperación de linfocitos T<sub>H</sub> y de la señal a través de TLR.

En otro estudio se observó que ratones deficientes en MyD88 y Trif, que son componentes esenciales en la vía de señalización por TLR, la respuesta de anticuerpos no se ve afectada con el uso de adyuvantes como el adyuvante completo e incompleto de Freund (Science. Nemazee 2006). Estos hallazgos contradicen lo anteriormente publicado por el grupo de trabajo de Metzhitov Yale, USA y actualmente existe la discusión acerca de las propiedades adyuvantes de los TLR<sup>68</sup>.

En un trabajo muy reciente se observa señalización a través de TLR9 es determinante para que se lleve a cabo un cambio de isotipo a IgG2a, observación que ya se había tenido desde el 2003.<sup>63-65</sup>

Sin embargo en estos estudios no se ha buscado si es que los TLRs contribuyen en la diversificación del repertorio de anticuerpos

## 8. Porinas

Las Porinas son poros o canales proteicos no específicos<sup>69</sup> que forman parte de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Estas proteínas pueden ser atravesadas por pequeñas moléculas hidrofílicas con límite de exclusión de 600Da.

Las Porinas se ensamblan como trímeros de subunidades idénticas de forma cilíndrica semejante a un barril, cada subunidad consiste de 16 hojas  $\beta$  plegadas antiparalelas unidas por asas con algunas  $\alpha$  hélices intercaladas. Cada monómero expone 8 asas cortas hacia el espacio periplásmico y ocho asas largas situadas hacia el exterior de la membrana externa. La forma cilíndrica que caracteriza a las Porinas se forma al cerrarse las estructuras  $\beta$  plegadas de forma pseudocilíndrica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja  $\beta$ -16 y el extremo amino de la hoja  $\beta$ -1. Estas moléculas son de gran hidrofobicidad por ello no se dispone actualmente de información cristalográfica.

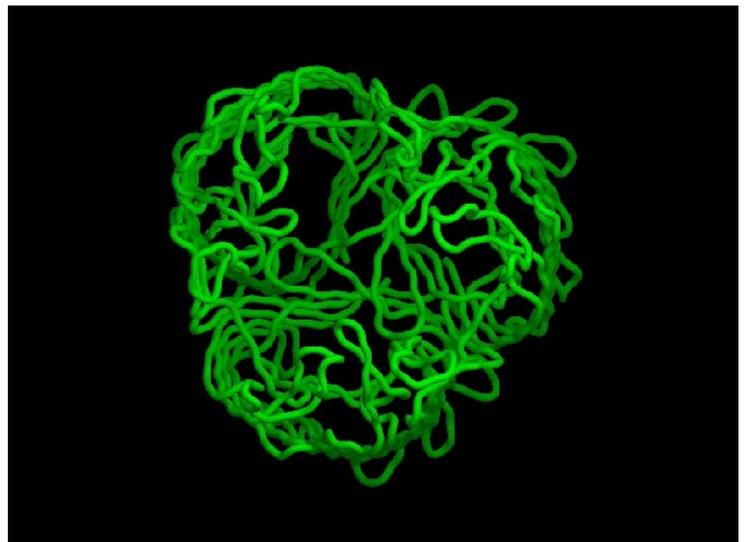
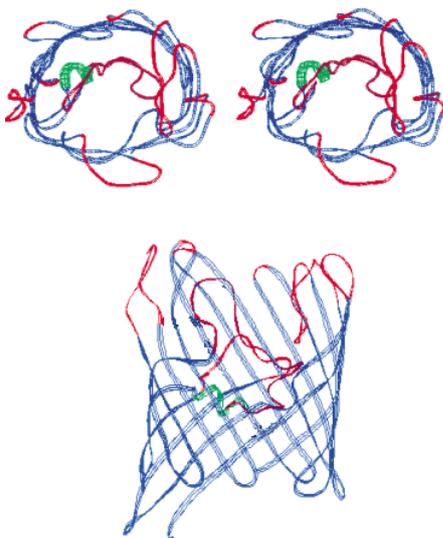


Figura 7. Estructura teórica de las Porinas<sup>70</sup>.  
(<http://www.ebqm.jussieu.fr/~debrevn/DOWN/PORINES/index.html>)

- Las Porinas de *S.typhi* son antígenos

Se ha observado que la inmunización de ratones con las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi, induce la respuesta de anticuerpos con capacidad bactericida y de larga duración<sup>15</sup>.

- Las Porinas de *S.typhi* son patrones Moleculares asociados a patógenos (PAMPs)

Mediante un ensayo en el cual se midió la unión de porinas a diferentes TLRs se ha observado que las porinas son capaces de señalar por dos TLRs diferentes, TLR2 y TLR4. Además se ha observado que las porinas son capaces de activar a células de la respuesta inmune innata (como macrófagos y células dendríticas)<sup>71</sup>.

- Las Porinas de *S. typhi* diversifican el repertorio de anticuerpos

Se han hecho hallazgos experimentales en donde se observa como es que se lleva a cabo la diversificación del repertorio de anticuerpos. En los ratones T11  $\mu$ MT<sup>55</sup> los cuales tienen limitado su repertorio al reconocimiento de VSV-IND la inmunización con porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi inducen la ampliación del repertorio de anticuerpos<sup>55</sup>. Sin embargo, en ese estudio no se demostró si la diversificación del repertorio es debido a las propiedades antígeno-PAMP de las porinas<sup>55</sup>.

## 9. Ovoalbúmina

Es una glicoproteína obtenida de huevo de pollo con un peso molecular de 45 kDa por cadena, cada macromolécula consta de cuatro cadenas idénticas OVA es usada como un antígeno habitual en muchos estudios a pesar de ser pobremente inmunogénica. La comparación de los niveles de anticuerpos anti-OVA incluidos y las subclases de IgG se usan como un indicador del tipo de respuesta Th1 o Th2<sup>72</sup>. Previamente se ha reportado que ratones BALB/c sensibilizados con OVA inducen una respuesta Th1 en los pulmones, pese a la considerable producción de IL-4 e IL5 en esplenocitos de BALB/c. Sin embargo, los esplenocitos de ratones BALB/c siempre producen respuesta tipo Th2 sin tomar en cuenta la dosis usada para la sensibilización<sup>73</sup>. No se ha reportado que la OVA sea reconocida como PAMP por el sistema inmune.

#### 10. Modelo experimental MD4

El ratón MD4 fue creado por Christopher C. Goodnow en el año de 1988<sup>17,18</sup>. Es un ratón que tiene un repertorio de anticuerpos limitado al reconocimiento de lisozima de huevo de gallina (HEL) y producción de anticuerpos contra ésta del tipo IgM, la cual fue escogida como epítopo porque su estructura química está bien definida, porque es fácil de obtener con gran pureza, porque no es tóxica *in vivo* y está exenta de efectos colaterales en el ratón.<sup>18</sup> Un fragmento que contiene los exones del gen de lisozima de huevo de gallina es unido al promotor de metalotioneína I ya que este promotor, es transcripcionalmente activo durante la fase embrionaria, fetal y adulta y puede inducir altos niveles de transcripción en presencia de metales pesados como el zinc en cualquiera de sus estados. El gen híbrido fue microinyectado en óvulos fertilizados de ratón C57BL/6 y se obtuvo el ratón MD4<sup>17,18</sup>. Para obtener ratones MD4 en haplotipo k los ratones fueron cruzados con ratones B10.Br durante las generaciones necesarias.



## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las porinas de *S. typhi* inducen una respuesta inmune humoral vitalicia en los ratones, esta respuesta se caracteriza por la presencia de altos títulos de anticuerpos bactericidas. Además las porinas son PAMPs capaces de activar de manera eficiente la respuesta inmune innata. Sin embargo, no se conoce si el reconocimiento de las porinas como antígenos y PAMPs por el sistema inmune contribuye a la diversificación del repertorio de anticuerpos.

## **II. HIPÓTESIS**

El reconocimiento de las porinas de *S. typhi* como PAMPs y antígenos por el sistema inmune inducirán la diversificación del repertorio de anticuerpos en ratones transgénicos que expresan un repertorio oligoclonal donde la mayoría de los anticuerpos son anti-lisozima y la coinmunización de las porinas con antígenos modelo favorecerán la respuesta inmune humoral contra el antígeno inmunizado y la diversificación del repertorio en ratones singénicos.



## II. OBJETIVOS

### General

Determinar si las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi como moléculas PAMP-antígeno son capaces de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos.

### Particulares

- Determinar si las porinas de *S. typhi* son capaces de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos en ratones transgénicos que expresan un repertorio oligoclonal donde la mayoría de los anticuerpos son anti-lisozima (MD4)
- Determinar si la coinmunización de porinas de *S. typhi* con OVA es capaz de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos anti-OVA en ratones singénicos
- Determinar si la OVA es capaz de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos en ratones MD4
- Determinar si la coinmunización de OVA con ligandos de TLRs es capaz de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos en ratones MD4
- Identificar los TLRs que se expresan en linfocitos B de ratones MD4.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Antígenos**

Porinas purificadas por el método de Nikaido a partir de *S. typhi* ATCC 9993<sup>74</sup>

OVA grado VI se obtuvo de SIGMA (# cat. A-2512 lote: 91K7057).

### **Animales de Laboratorio**

Se utilizaron ratones MD4 (todos los anticuerpos provienen del transgen y más del 90% de sus linfocitos B presentan especificidad anti-lisozima de huevo de gallina), también se usaron ratones B10.Br que son ratones de tipo silvestre que cuentan con el mismo fondo genético de los ratones MD4, y ratones BALB/c. Los ratones fueron reproducidos y mantenidos en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

#### **1. Titulación de anticuerpos por el método de ELISA.**

Las placas para ELISA de 96 pozos se fijaron adicionando 5µg de lisozima o 1µg de porinas o 15µg de OVA por pozo en un volumen de 100µL de buffer de carbonatos, se incubaron 1 hora a 37° C, después, se incubaron toda la noche a 4 °C. Después del tiempo de incubación se lavaron 2 veces con 300µL de solución de lavado.

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

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

Después de la incubación las placas se lavaron 6 veces con 300 $\mu$ L de solución de lavado y posteriormente se agregaron a cada pozo 100 $\mu$ L de solución de bloqueo con segundo anticuerpo se incubó durante 1 hora a 37° C .

Al finalizar el tiempo de incubación las placas se lavaron 8 veces con 300 $\mu$ L de solución de lavado, se adicionaron 100 $\mu$ L de solución de revelado y se incubó durante 10 min. en oscuridad. Para detener la reacción se agregó a cada pozo 10 $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y posteriormente se determinó la densidad óptica en el lector de ELISA (Lector para placas de ELISA Dynex Technologies Modelo MRXII) a una longitud de onda de 490nm.

## **2. Conteo de células**

Para el conteo de células se utilizó una cámara de Neubauer o hematocitómetro mediante un conteo microscópico por campos, contándose como viables a las células que refringen cuando se exponen a azul de tripano. Se hace una relación entre el volumen y concentración que se coloca al microscopio con el volumen y concentración de la mezcla homogénea de células inicial.

## **3. Tipificación de los ratones MD4**

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

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

Tipificación de ratones MD4 por el método citométrico

Sangrar al animal y obtener 200 $\mu$ L de sangre en 1mL de buffer de citratos, centrifugar a 3000g durante 5 min. Resuspender el botón. Lavar 2 veces con PBS. Resuspender. Colocar 1mL de buffer de lisis a cada vial y mezclar por inversión, incubar por 3 minutos. Centrifugar a 3000g. Se desecha el sobrenadante. Se resuspende y lava 2 veces con PBS y se hace dilución de lisozima marcada con FITC tal que la concentración final será de 10 $\mu$ g/mL y una dilución 1:300 de anticuerpo anti-B220-PerCP . A cada tubo eppendorff después de retirar el sobrenadante se le adicionan 350 $\mu$ L de PBS. Se toman 100 $\mu$ L de cada uno de los tubos eppendorff y se colocan en los tubos especiales para citómetro por

duplicado. Para observar la autofluorescencia, se le colocarán 100  $\mu$ L de PBS, uno con lisozima-FITC y otro con B220-PerCP con las células de uno de los ratones. Se incuba 15min en la oscuridad a 4°C .

Se resuspende y se hacen tres lavados con PBS. De esta manera están listas para leerse. Se selecciona el área de los linfocitos en la región correspondiente a los linfocitos de tamaño contra granularidad, después a las células B220 positivas y finalmente hay células son lisozima-FITC positivas, tenemos probablemente un ratón MD4

#### Tipificación por ELISA

Se determina el título de anticuerpos por ELISA como ya es detallado en la metodología y si éste es mayor a 7 se ha estandarizado que esos son probables ratones MD4.

Se toman como ratones MD4 los ratones que resulten como probables en las dos pruebas y como B10.Br los ratones que resulten negativos para las dos pruebas.

#### **4. Marcaje de Lisozima con isotiocianato de fluoresceína**

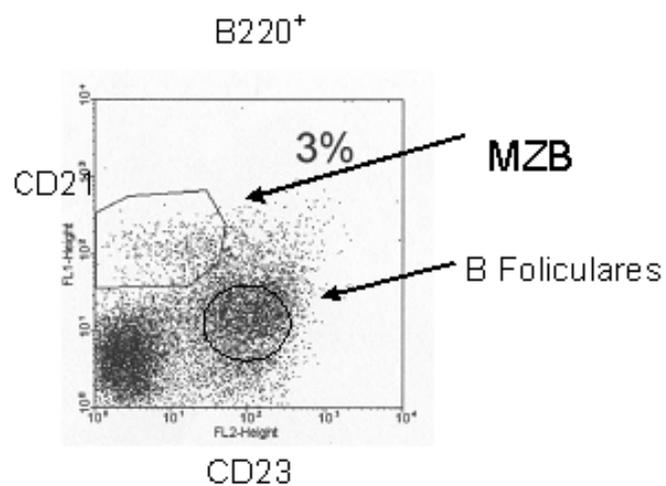
Se disuelven 3mg de lisozima para que quede a una concentración de 1mg/mL en FITC labeling Buffer en un tubo eppendorff protegido de la luz. En un tubo eppendorff se hace una solución FITC/DMSO y se colocan 60µL por cada mg de lisozima que se quiera marcar. Se deja reposar 2h a temperatura ambiente en agitación y protegido de la luz . Se dializa a 4°C en agitación y se cambia mínimo 4 veces el buffer de diálisis en un lapso de 48 horas. Se observa cual es la concentración de la lisozima mediante la absorbancia a 280 y 492nm con la cual se puede calcular la concentración con la siguiente fórmula.

$$\text{Proteína (mg/mL)} = [A_{280} - (A_{492} * 0.35) ] / 1.4$$

Se ajusta a la concentración a la que se quiera dejar para su posterior uso, la concentración final del marcado en el tubo de muestra es de 10µg/mL

## 5. Separación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B mediante un sorting en citómetro de flujo.

Se sacrificaron ratones de 6 a 8 semanas por dislocación cervical a partir de los cuales se extrajeron bazo. Cada bazo fue disgregado, las células que se obtuvieron fueron lisadas con 2 mL buffer de lisis durante 4 min., se centrifugaron y lavaron con PBS; las células que se obtuvieron fueron teñidas tomando como parámetro la expresión diferencial de CD21, CD23 en las células B220 positivas del bazo de acuerdo al siguiente esquema.



## **6. Extracción de RNA por el método de trizol**

Se agrega a 700 000 células preferentemente resuspendidas (en un botón de no más de 200  $\mu$ L) un mL de Trizol (Invitrogen) y se homogeniza suavemente.

Se agregan 300 $\mu$ L de cloroformo calidad HPLC y se homogeniza durante 2 min. en vortex a baja velocidad. Transcurrido el tiempo de homogenización de la muestra se centrifuga a 8000xg durante 15 min. Al terminar la centrifugación se separa la fase acuosa que es donde se encuentra el RNA y se encuentra en la fase superior en otro tubo y se le adicionan 500 $\mu$ L de isopropanol calidad HPLC, se incuba 20min a 4°C o para mejorar rendimiento toda la noche.

Después de la incubación se centrifuga a 8000 xg durante 10 min. a 4 C se decanta el sobrenadante y se le adiciona 1mL de Etanol al 80% en agua DEPC, se centrifuga nuevamente 10min 4° C a 8000 xg, se decanta. Nuevamente se agrega Trizol y se homogeniza suavemente. Se agregan 300 $\mu$ L de cloroformo y se homogeniza durante 2 min. en vortex a baja velocidad. Transcurrido el tiempo de homogenización de la muestra se centrifuga a 8000xg durante 15 min. Al terminar la centrifugación se separa la fase acuosa que es donde se encuentra el RNA y se encuentra en la fase superior en otro tubo y se le adicionan 500 $\mu$ L de isopropanol calidad HPLC, se incuba 20min a 4°C o para mejorar rendimiento toda la noche.

Después de la incubación se centrifuga a 8000 xg durante 10 min. a 4° C se decanta el sobrenadante y se le adiciona 1mL de Etanol al 80% en agua DEPC, se centrifuga nuevamente 10min 4° C a 8000 xg con micropipeta se elimina la mayor cantidad de etanol posible sin tocar la pastilla, se deja la pastilla destapada.

Pasados los 5 min. se agregan 12  $\mu\text{L}$  de agua DEPC y se disuelve colocando los tubos a 45° C durante 5 min.

### **7. Cuantificación, verificación de pureza e integridad del RNA total**

Se hace una dilución 1:100 de la muestra que se obtiene de la extracción de RNA total disolviendo en agua nanopura o en agua DEPC y se lee en una celda de cuarzo de 200 $\mu\text{L}$  la absorbancia de éste a 260 y 280nm colocando como blanco el agua nanopura o DEPC. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de RNA total presente en la muestra, la relación A260/A280 debe ser entre 1.7-2.0 para que el RNA total que se obtuvo sea de alta pureza.

Para verificar la integridad del RNA y que la muestra no contenga DNA genómico se hace un gel de agarosa al 1% en regulador de tris-boratos-EDTA (TBE) al que se le agrega Bromuro de etidio en una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  al cual se coloca en un caja para electroforesis y se de deja polimerizar al menos una hora a temperatura ambiente. Cuando haya transcurrido este tiempo se llena la cámara con regulador TBE. Finalmente se toma para cada muestra 1 $\mu\text{L}$  de regulador para la muestra con el volumen proporcional de la muestra tal que sean 3 $\mu\text{g}$  de RNA con la finalidad de que sea visible el RNA en el gel.

Las muestras se corren a un voltaje constante de 60V (si el gel es pequeño) y 90V si el gel es grande incluyendo un carril con marcadores de tamaño molecular.

## 8. Transcripción inversa del ácido ribonucleico mensajero (RNAm)

Se toma el volumen proporcional a 3  $\mu\text{g}$  de RNA total al cual se le añade 2  $\mu\text{L}$  de la solución concentrada 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de oligo dT<sub>12-18</sub> en un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, ésta mezcla se deja incubar a 65° C durante 10 min. Después se deja incubar la reacción en hielo durante 5 min. y se agregan 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción que consta de:

Mezcla de reacción para la transcripción inversa		
Reactivos	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final de la reacción
Agua DEPC	2.4	
5x regulador para la primera cadena	4.0	1X
200U/ $\mu\text{L}$ M-MLVRT	0.8	160U/ reacción
10mM dNTPs	0.8	400 $\mu\text{M}$
100mM DTT	2.0	10 $\mu\text{M}$

El volumen final de la reacción es de 20  $\mu\text{L}$ .

Continuar la reacción en un termociclador o en un baño incubando a 37 °C durante una hora y 95° C durante 5 min.

Terminada la reacción centrifugar 5 seg. y agregar 80  $\mu\text{L}$  de agua DEPC para obtener un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ , de este cDNA se tomaran 5  $\mu\text{L}$  para hacer la PCR punto final de un gen constitutivo.

### 9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final

Para cada reacción de PCR se usan 5 $\mu$ L de cDNA diluido retrotranscrito del paso anterior y se adicionan 45 $\mu$ L de la mezcla de reacción para PCR obteniendo un volumen final de 50 $\mu$ L

Mezcla de reacción para la PCR			
Reactivos	Volumen ( $\mu$ L)	Concentración final en la reacción	Concentración en la que la reacción en funcional
Agua DEPC	35.3		
Regulador 10x PCR	5.0	1x	1x
MgCl <sub>2</sub> 50mM	2.5	0.5 mM	0.5-4mM
dNTPs 10mM	1.0	200 $\mu$ M	200 $\mu$ M
Primer 5' 20mM	0.5	0.2 $\mu$ M	0.2-1 $\mu$ M
Primer 3' 20mM	0.5	0.2 $\mu$ M	0.2-1 $\mu$ M
Taq polimerasa 5U/ $\mu$ L	0.2	1U/reacción	1-2.5 U/reacción
cDNA	5.0		

Se incuba la reacción en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

Disociación	94°C/ 45 seg.	30 ciclos
Asociación	60°C/ 45 seg.	
Extensión	72°C/ 90seg	
Extensión final	72°C/ 7 min.	1 ciclo

Para visualizar los productos de PCR se uso un gel neutro de agarosa al 2% con bromuro de etidio (EtBr). Se fundió agarosa en regulador de tris-boratos-EDTA (TBE) y cuando enfríe se agregan 5 µL de bromuro de etidio (1mg/mL) por cada 100mL de agarosa (la concentración final de EtBr es de 0.5µg/mL). Se coloca en la cámara de electroforesis y se deja polimerizar 1 hora a temperatura ambiente. Se llena la cámara con buffer TBE 1x. Se mezclan 1 µL de regulador de corrimiento para la muestra con 5 µL de producto de PCR y se coloca en su pozo correspondiente junto con sus controles positivos y negativos de PCR. De lado derecho se coloca 1 µL de marcador de pesos moleculares y 5 µL de buffer de corrimiento. Se corren las muestras a una diferencia de potencial constante de 70V durante una hora. Se observa y toma una foto en el transiluminador.

## 10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real

Se utilizan los oligonucleótidos diseñados para TLR1-TLR9 y  $\beta$ -actina respectivamente y el kit LightCycler FastStart DNA SYBR Green I (ROCHE). Para calcular la eficiencia de la reacción se realiza una curva estándar con diluciones, se obtiene la pendiente y se utiliza la fórmula  $E = 10^{-1/m}$ . Se realizan las reacciones de PCR con las muestras, utilizando las condiciones estandarizadas para cada reacción. La cantidad de copias en cada muestra se calcula normalizando la expresión de cada gen con el gen endógeno utilizando el método  $\Delta\Delta CT$ . Donde al número de ciclo donde aparece el amplificado en la región logarítmica de la reacción para cada TLR y el gen constitutivo, se resta el número de ciclo donde aparece el amplificado en la región logarítmica de la reacción de GAPDH, a este se le resta el  $\Delta CT$  del parámetro que se utiliza como basal y se aplica la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para obtener la cantidad relativa del amplificado.

## VI. RESULTADOS

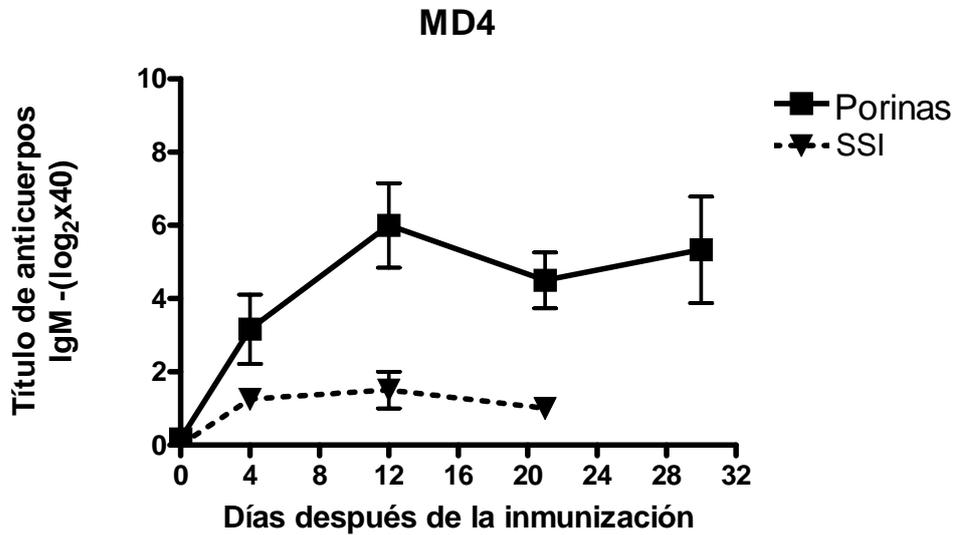
### 1. Las Porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi diversifican el repertorio de anticuerpos.

El repertorio de anticuerpos en los ratones MD4 es oligoclonal la mayoría de los anticuerpos son específicos a HEL debido al transgen<sup>17,18</sup>, los anticuerpos no específicos contra HEL también provienen del mismo transgen por lo que se conoce el origen del repertorio esto nos permite la evaluación de la diversificación del repertorio ante el reto antigénico.

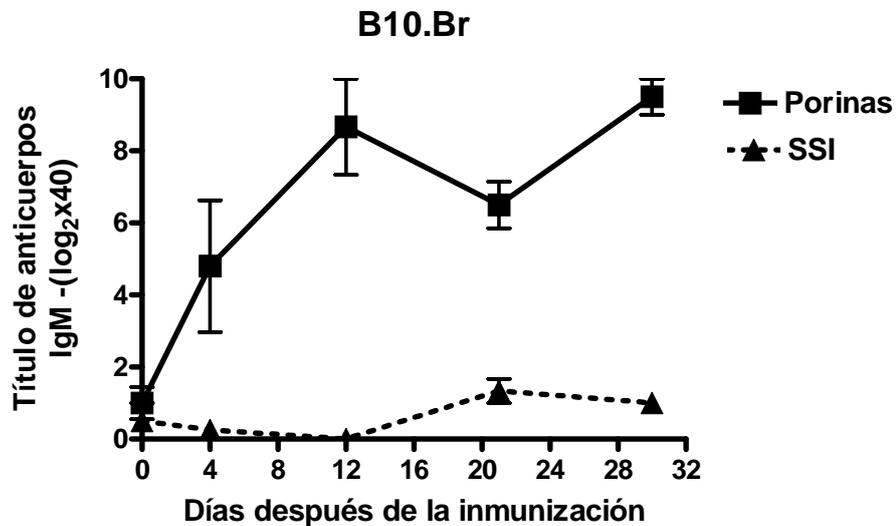
La inmunización con las Porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi indujo la producción de anticuerpos IgM anti-porinas en los ratones MD4 (Figura 8A). Los ratones singénicos de la cepa B10.Br son del mismo fondo genético que los ratones MD4 y sirvieron de control para estudiar la respuesta de anticuerpos inducidos por las porinas en un fondo no transgénico. Los ratones B10.Br inmunizados con porinas produjeron anticuerpos específicos cuyos títulos fueron más altos que los inducidos en los ratones MD4, sin embargo, la cinética de producción de los anticuerpos mostró un patrón similar (Figura 8A y 8B)

Tanto en ratones MD4 como en los B10.Br se observan títulos d anticuerpos IgM a partir del día 4 postinmunización, la respuesta se incrementa mostrando un pico en el día 12 que se conservó hasta el último día de observación (día 30)

A)



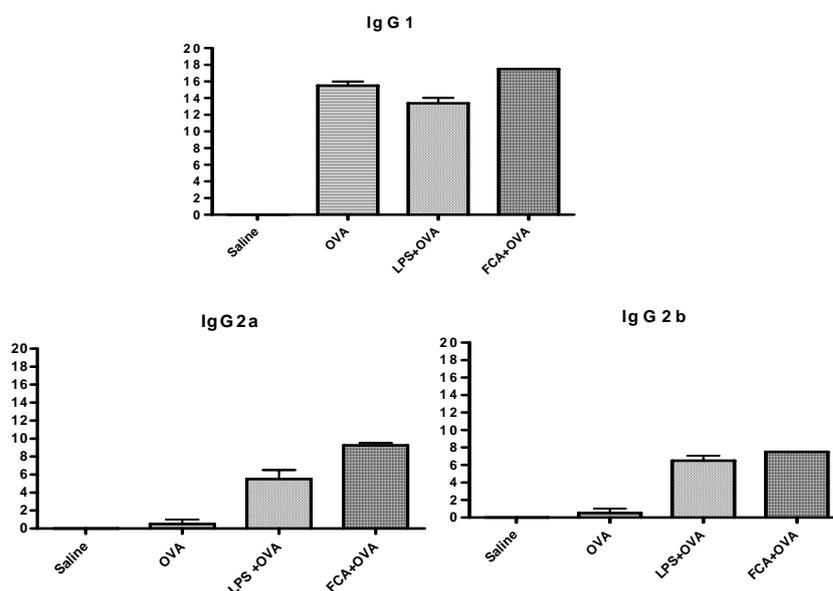
B)



**Figura 8.** Las porinas de *S. typhi* inducen la diversificación del repertorio de anticuerpos específicos en ratones MD4. Grupos de 5 ratones MD4 o B10.Br fueron inmunizados con porinas o con SSI como control al día 0. Se tomaron muestras de sangre en los ratones los días indicados en la gráfica y los títulos de anticuerpos fueron determinados por medio de ELISA en los sueros. A) Títulos de anticuerpos IgM anti-porinas en ratones MD4 son estadísticamente diferentes que los del control negativo inmunizados con SSI. B) Títulos de anticuerpos anti-porinas en ratones B10.Br, éstos tienen el mismo fondo genético que los ratones MD4 pero su repertorio no está limitado.

## 2. La coinmunización de OVA con porinas de *S. typhi* induce la diversificación del repertorio de anticuerpos específicos a OVA.

Las porinas son PAMPs de *S. typhi* capaces de inducir señales a través de TLR 2 y TLR 4<sup>16</sup>. Una característica importante de muchos PAMPs es que al coinmunizarlos con un antígeno inducen un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos contra el antígeno<sup>2,9,76</sup>. Con el fin de comprobar que las porinas pueden inducir la diversificación del repertorio debido a sus propiedades como PAMP, coinmunizamos porinas con el antígeno OVA ya que este antígeno no se le ha encontrado características de PAMP. La OVA induce en los ratones BALB/c únicamente anticuerpos de clase IgG1 (Figura 9). La coinmunización de OVA con porinas o con los adyuvantes LPS y completo de Freund (FCA) indujo la producción de anticuerpos de clase IgG1, IgG2a e IgG2b (Figura 9)



**Figura 9. La coinmunización de porinas de *S. typhi* con OVA favorece la diversificación del repertorio de anticuerpos anti-OVA.** Grupos de 3 ratones BALB/c fueron inmunizados con OVA o con OVA+Porinas, OVA+LPS, OVA+FCA. Al día 30 postinmunización se tomaron muestras de sangre de los ratones y en el suero de estas se determinaron los títulos de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b por medio de ELISA. La gráfica muestra 1 experimento representativo de 3 con resultados similares.

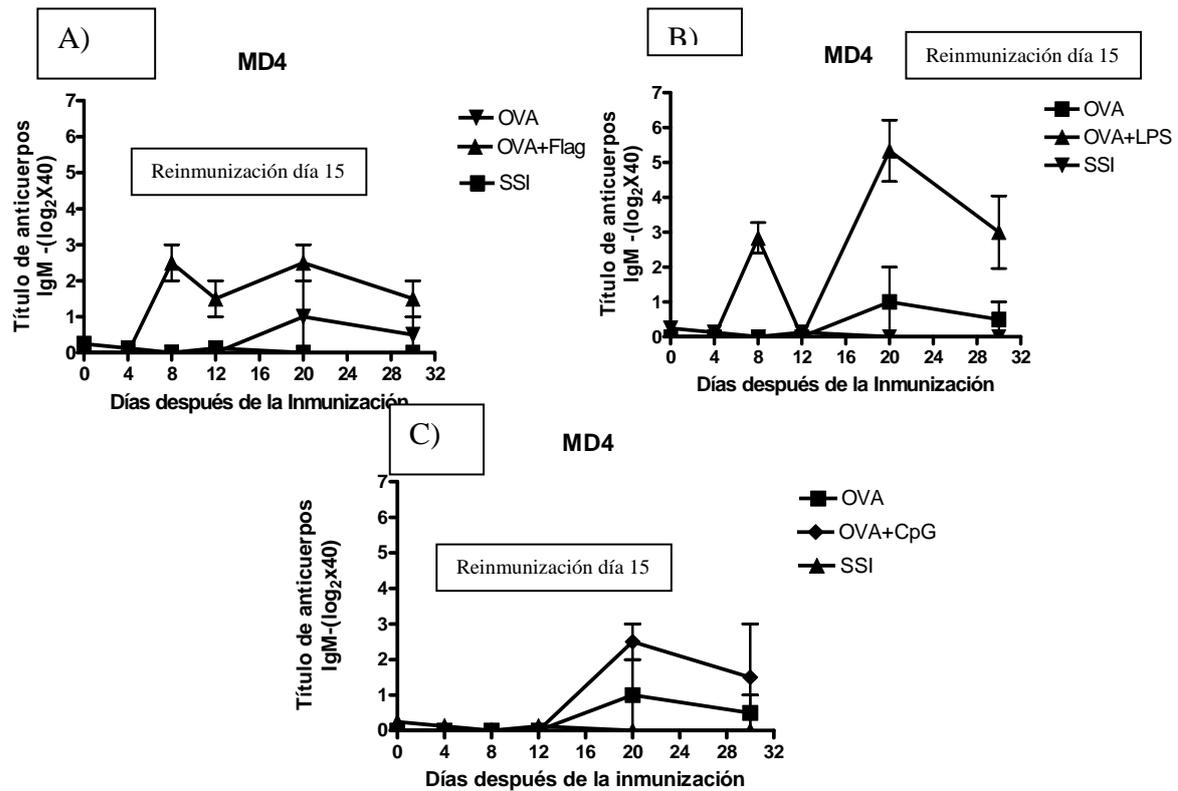
### **3. La Ovoalbúmina (OVA) no es capaz de inducir la diversificación del repertorio de anticuerpos en los ratones MD4.**

La diversificación del repertorio inducido por las porinas en los ratones MD4 y en los ratones BALB/c coinmunizados con porinas+OVA sugiere que la propiedad de las porinas de ser reconocidas como PAMPs es la responsable de este fenómeno. Con el fin de establecer si un antígeno que no sea reconocido como PAMP es capaz de inducir la diversificación del repertorio en los ratones MD4, estos ratones fueron inmunizados con OVA y la inducción de anticuerpos específicos se midió en los sueros de los ratones (Figura 10). La OVA no induce títulos de anticuerpos específicos en los ratones MD4 durante la respuesta primaria (Figura 10). Después de la reinmunización al día 15 se observa la presencia de títulos basales de anticuerpos anti-OVA en los ratones MD4 (Figura 10).

#### **4. La coinmunización de OVA con ligandos de TLR induce la diversificación del repertorio de anticuerpos en ratones MD4.**

La diversificación del repertorio inducida por las porinas es atribuida a que estas proteínas son reconocidas como antígeno y como PAMP por el sistema inmune, el hecho de que la OVA sólo sea reconocida como antígeno y no como PAMP y que no sea capaz de diversificar el repertorio de anticuerpos favorece esta hipótesis. Para determinar si la señal mediada por un PAMP puede contribuir en la diversificación del repertorio, OVA fue coinmunizada con los ligandos de TLR4-LPS, TLR5-flagelina y de TLR9-CpG en ratones MD4 (Figura 10).

La coinmunización de OVA con flagelina y con LPS induce títulos de anticuerpos IgM en los ratones MD4 al día 8 postinmunización durante la respuesta primaria, mientras que la OVA sola o OVA+CpG no inducen la presencia de anticuerpos (Figura 10). Los ratones fueron reinmunizados al día 15 y al día 20 se observó la presencia de títulos basales de anticuerpos anti-OVA en los ratones MD4 inmunizados con OVA solamente, mientras que los ratones inmunizados con OVA+ flagelina o LPS o CpG se observa un incremento de los títulos de anticuerpos anti-OVA (Figura 10). Como controles se inmunizaron ratones MD4 con SSI y en éstos no se observó la presencia de anticuerpos anti-OVA.

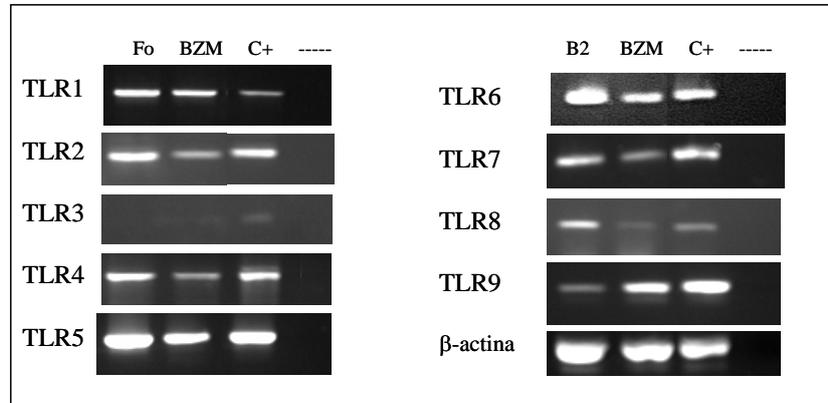


**Figura 10. La coinmunización de OVA con ligandos de TLR pero no la inmunización con OVA únicamente es capaz de inducir la diversificación del repertorio en ratones MD4.** Grupos de 5 ratones MD4 fueron inmunizados con OVA o con OVA+ligandos de TLRs al día 0 y 15 del experimento, se analizaron los títulos de anticuerpos anti-OVA en los sueros de los ratones por medio de ELISA en los tiempos indicados en las gráficas. OVA no induce anticuerpos específicos durante la respuesta primaria, sólo se observan títulos basales durante la respuesta secundaria en los ratones MD4 (A-C). A) La coinmunización con flagelina (ligando de TLR5) induce anticuerpos anti-OVA durante la respuesta primaria y secundaria en los ratones MD4. B) La coinmunización de OVA con LPS (ligando de TLR4) induce respuesta primaria y secundaria de anticuerpos anti-OVA en ratones MD4. C) La coinmunización de OVA con CpG (ligando de TLR9) induce título de anticuerpos anti-OVA únicamente durante la respuesta secundaria en los ratones MD4. Un experimento representativo de 3 con resultados similares se muestra en esta figura.

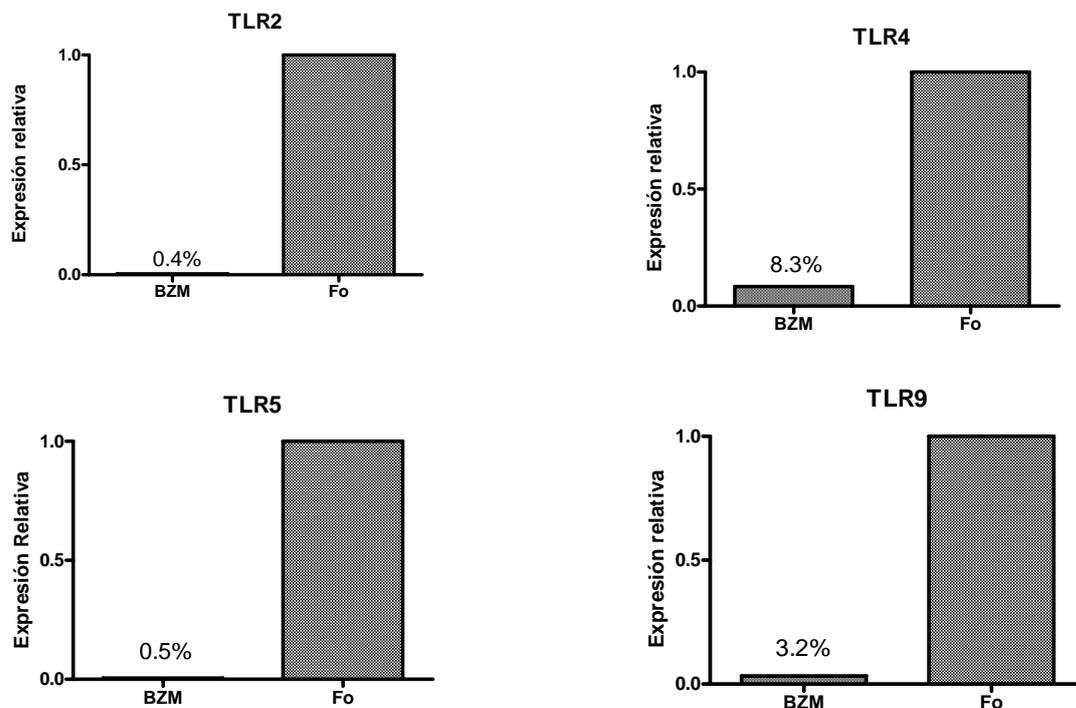
## **5. Los linfocitos B de ratones MD4 expresan los TLRs que funcionan como ligandos de las moléculas que fueron coadministradas con los antígenos**

Actualmente se debate sobre la contribución de los TLRs expresados en los linfocitos B en la respuesta inmune humoral. Trabajos recientes han mostrado que la señal mediada por TLRs en los linfocitos B participa en el cambio de isotipo<sup>64,65</sup>, sin embargo, no se conoce si los linfocitos B de los ratones MD4 expresan TLRs y su contribución en el efecto adyuvante y en la diversificación del repertorio no se ha dilucidado. Con el fin de identificar si los linfocitos B de los ratones MD4 y de los ratones BALB/c utilizados en este estudio expresan TLRs se aislaron linfocitos B foliculares y de zona marginal de bazo de estos ratones y la expresión de TLRs se determinó por medio de PCR punto final y de PCR tiempo real (Figura 11). En los linfocitos B foliculares y de zona marginal de los ratones BALB/c se encontró la expresión de TLR 1,2, 4-9 (Figura 11A), así mismo se encontró el mismo patrón de expresión en los ratones MD4 (datos no mostrados). Después de observar la expresión de los TLR en los linfocitos B de los ratones MD4, se decidió estudiar si los receptores se expresan diferencialmente. El análisis se realizó únicamente en los TLRs que son los receptores de flagelina (TLR5), LPS (TLR4), CpG (TLR9) utilizados en este estudio. Por medio de PCR de tiempo real observamos que los linfocitos B foliculares expresan estos receptores en mayor medida que los linfocitos B de Zona Marginal (Figura 11B).

A)



B)



Figura

**11. Los linfocitos B de ratones MD4 y BALB/c expresan TLRs.** A) Expresión de TLR1-9 (mRNA) en linfocitos B foliculares (Fo), linfocitos B de zona marginal (BZM) por medio de RT-PCR punto final en ratones BALB/c, el mismo patrón de expresión se observó en los linfocitos B de ratones MD4 (datos no mostrados). B) Expresión de TLR1-9 (mRNA) en linfocitos B foliculares (Fo) y linfocitos B de zona marginal (BZM) por medio de RT-PCR tiempo real en ratones MD4. Los linfocitos B de zona marginal y foliculares fueron obtenidos de bazo de los ratones y separados por citometría de flujo tomando como parámetro la expresión diferencial de CD23 y CD21 en las células B220 positivas del bazo. Las células purificadas mostraron una pureza superior al 90%. De las células purificadas se extrajo RNA total y se retrotranscribió selectivamente el RNA mensajero, con el cDNA obtenido se realizaron las PCRs.

## VII. DISCUSIÒN

El universo molecular que nos rodea es reconocido por el sistema inmune a través de 2 grandes sistemas de receptores, los PRRs del sistema inmune innato cuyos ligandos reciben el nombre de PAMPs<sup>77</sup>, por otro lado los receptores del sistema inmune adaptativo son el BCR a cuyos ligandos se les denominan antígenos y finalmente el TCR que reconoce péptidos o algunos carbohidratos presentados en el contexto de las moléculas del MHC<sup>78</sup>. Algunos lípidos son presentados en el contexto de moléculas no clásicas a linfocitos NKT<sup>79</sup>. En su conjunto estos son los sistemas generales de reconocimiento molecular descrito hasta ahora para el sistema inmune, los ligandos de todos estos receptores son principalmente biomoléculas de naturaleza proteínica, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Estos ligandos son reconocidos por uno o varios receptores del sistema inmune permitiendo así la activación celular y el inicio de la respuesta inmunológica. El estudio de la respuesta inmune contra patógenos y el desarrollo de vacunas han permitido identificar muchas de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la activación de la respuesta inmune y la generación de inmunidad (protección) contra la infección, así se han podido definir las características de las moléculas que son responsables de la inducción de una respuesta inmune<sup>9</sup>. La distancia filogenético (exogenicidad), naturaleza química, complejidad molecular, rigidez molecular, organización y repetitividad de la molécula han sido identificados como parámetros importantes de una molécula para la inducción de la respuesta inmune (inmunogenicidad)<sup>80</sup>. Las moléculas que no cuentan con estas características son poco inmunogénicas para que estas moléculas induzcan

una respuesta inmune potente se les han mezclado con moléculas inmunopotenciadoras a las que se les denominó adyuvantes. Los adyuvantes se han usado principalmente para el desarrollo de vacunas y el objetivo ha sido la inducción de una respuesta inmune adaptativa tanto humoral como celular que sea potente y de larga duración, es decir que genere memoria inmunológica <sup>36</sup>. Con el descubrimiento de los TLRs se dilucidaron los varios de los mecanismos moleculares que son el fundamento del efecto adyuvante, poniendo también de manifiesto la compleja e interdependiente relación entre la respuesta inmune innata y la adaptativa<sup>81</sup>. La contribución de los TLRs en la inducción de la respuesta inmune de anticuerpos se ha descrito como un mecanismo indirecto a través de la activación y maduración de células dendríticas favoreciendo la presentación del antígeno y coestimulación al los linfocitos T y por tanto induciendo un ambiente de citocinas propicias para la correcta activación del linfocito B<sup>9</sup>. Sin embargo, el descubrimiento de TLRs en el linfocito B abrió el debate sobre la contribución de estos receptores en la biología de estas células y sobre la participación de 2 importantes sistemas de reconocimiento molecular uno innato y otro adaptativo en una misma célula en la generación de memoria <sup>36,63-65</sup>. Los estudios sobre el reconocimiento molecular mediado por los TLRs han permitido identificar moléculas que son capaces de señalar tanto por estos receptores como a través del BCR, así estas moléculas son reconocidas como PAMPs por el sistema inmune innato y como antígenos por el linfocito B, para estas moléculas proponemos el nombre de "Pamptigens". Los pamptigens son en general moléculas provenientes de microorganismos. Por otro lado, se han podido identificar moléculas que no señalizan a través de TLRs o de otros de los

principales receptores de PAMPs, estas moléculas son generalmente derivadas de vertebrados como es el caso de la OVA, de la HEL, de moléculas sintéticas como los haptenos NP y DNP. Los pampogens son en general más inmunogénicos que los (solo) antígenos lo que nos hace suponer que estas moléculas cuentan con propiedades adyuvantes intrínsecas. Las porinas de *S. typhi* son proteínas que se han caracterizado previamente como antígenos y como PAMPs<sup>15,16</sup>, de esta forma constituyen un modelo valioso para estudiar la contribución de las señales de reconocimiento de la respuesta inmune innata en la generación de la diversidad de la respuesta de anticuerpos y en el establecimiento de la memoria inmunológica que va acoplada a este fenómeno a través del almacenamiento del genotipo de estos nuevos anticuerpos antígeno-específico para su posterior utilización en una respuesta inmune. El modelo experimental utilizado fue el ratón transgénico MD4 cuyo transgen codifica para un anticuerpo con especificidad para HEL. Todos los linfocitos B del ratón expresan dicho transgen, así más del 90% de estos presentan el fenotipo específico contra HEL<sup>17,18</sup>. El conocer el receptor original permite evaluar la diversificación del repertorio sólo a través de la identificación por ELISA de anticuerpos con otra especificidad. Los mecanismos de diversificación del repertorio en estos animales no han sido estudiados pero por analogía con lo observado en los ratones T11 y QM<sup>82,83</sup> podemos esperar que la edición de receptor, permutación somática y el uso de cadenas ligeras kappa o lambda sean los mecanismos involucrados. Las porinas indujeron anticuerpos específicos en los ratones MD4 con una cinética similar a la observada en los ratones B10.Br con el mismo fondo genético pero sin el transgen (Figura 8). Por otro lado la utilización de porinas como adyuvante al coinmunizarla con OVA en

ratones singénicos BALB/c indujo la formación de anticuerpos IgG2a e IgG2b que no induce la OVA cuando es inmunizada sin adyuvante. Este efecto fue similar al inmunizar OVA con adyuvantes bien caracterizados como el PAMP LPS y el adyuvante completo de Freund (Figura 9). A su vez, la OVA que es un antígeno sin propiedades como PAMP descritas, no indujo títulos de anticuerpos específicos en los ratones MD4, mientras que al coimmunizar OVA con los PAMPs flagelina, LPS y CpG que son ligandos conocidos de TLR 5, 4 y 9 respectivamente, se observó la presencia de anticuerpos específicos anti-OVA tanto en la respuesta primaria como en la secundaria (Figura 10). Estos datos sugieren que la señal de los TLRs es importante para la diversificación del repertorio de anticuerpos específicos. El mecanismo pudiera ser a través de la generación del efecto adyuvante en las células dendríticas mejorando la presentación del antígeno, la coestimulación y el ambiente de citocinas propicios para la activación de la respuesta inmune adaptativa celular y de anticuerpos. Otra posibilidad pudiera ser a través de la activación directa de los TLRs en los linfocitos B de los ratones inmunizados, por este motivo estudiamos la expresión de TLRs en los linfocitos B foliculares como de zona marginal en los ratones MD4 y BALB/c inmunizados. Estas poblaciones de linfocitos son importantes en el establecimiento de la respuesta inmune primaria y de memoria (REF). El análisis de la expresión de TLRs reveló que ambas poblaciones de linfocitos B de los ratones MD4 y BALB/c expresan TLR1, 2,4-9 (Figura 11A) mientras que los TLR 2, 4,5 y 9 se expresaron más en las células foliculares que en las de zona marginal de los ratones MD4 (Figura 11B). Estos resultados muestran que los linfocitos B de los ratones MD4 expresan TLRs y por tanto es plausible que las porinas y los

PAMPs utilizados contribuyan en la diversificación del repertorio a través de estos receptores expresados en los linfocitos B.

En su conjunto estos resultados muestran que las porinas son pamtigens que contribuyen en la diversificación del repertorio de anticuerpos probablemente a través de la señal mediada por TLRs.

## **VIII. CONCLUSIONES**

Las porinas de *S. typhi* son pamtigens que contribuyen en la diversificación del repertorio de anticuerpos probablemente a través de la señal mediada por TLRs.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
2. Beutler, B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* **40**, 845-859 (2004).
3. Kabelitz, D. & Medzhitov, R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 1-3 (2007).
4. Alam, R. & Gorska, M. 3. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S476-S485 (2003).
5. Clark, E.A. & Ledbetter, J.A. How B and T cells talk to each other. *Nature* **367**, 425-428 (1994).
6. Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C. The discovery of MHC restriction. *Immunol. Today* **18**, 14-17 (1997).
7. Ollila, J. & Vihinen, M. B cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 518-523 (2005).
8. Padlan, E.A. Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* **31**, 169-217 (1994).
9. Pulendran, B. & Ahmed, R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**, 849-863 (2006).
10. Alam, R. & Gorska, M. 3. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S476-S485 (2003).
11. Frieder, D. *et al.* Antibody diversification: mutational mechanisms and oncogenesis. *Immunol. Res.* **35**, 75-88 (2006).
12. Wang, Y.H. *et al.* Differential surrogate light chain expression governs B-cell differentiation. *Blood* **99**, 2459-2467 (2002).

13. Nemazee,D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 728-740 (2006).
14. Odegard,V.H. & Schatz,D.G. Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 573-583 (2006).
15. Secundino,I. *et al.* Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* **117**, 59-70 (2006).
16. Gil-Cruz,C. Evaluación de la respuesta inmune innata inducida por las Porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi. 2006. Instituto Politécnico Nacional.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
17. Adams,E., Basten,A. & Goodnow,C.C. Intrinsic B-cell hyporesponsiveness accounts for self-tolerance in lysozyme/anti-lysozyme double-transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 5687-5691 (1990).
18. Goodnow,C.C. *et al.* Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676-682 (1988).
19. Kabelitz,D. & Medzhitov,R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 1-3 (2007).
20. Janeway,C.A., Jr. & Medzhitov,R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216 (2002).
21. Teixeira,M.M., Almeida,I.C. & Gazzinelli,R.T. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. **4**, 883-886 (2002).
22. Galdiero,M., Pisciotta,M.G., Galdiero,E. & Carratelli,C.R. Porins and lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* regulate the expression of CD80 and CD86 molecules on B cells and macrophages but not CD28 and CD152 on T cells. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**, 1104-1111 (2003).
23. Takeuchi,O. & Akira,S. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. **4**, 887-895 (2002).

24. Teixeira,M.M., Almeida,I.C. & Gazzinelli,R.T. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *4*, 883-886 (2002).
25. Kabelitz,D. & Medzhitov,R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 1-3 (2007).
26. Takeda,K., Kaisho,T. & Akira,S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335-376 (2003).
27. Kang,S.S., Kauls,L.S. & Gaspari,A.A. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* **54**, 951-983 (2006).
28. Kawai,T. & Akira,S. TLR signaling. *Semin. Immunol.* (2007).
29. Takeda,K., Kaisho,T. & Akira,S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335-376 (2003).
30. Takeda,K. & Akira,S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1-14 (2005).
31. Kabelitz,D. & Medzhitov,R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 1-3 (2007).
32. Chan,V.W. *et al.* The molecular mechanism of B cell activation by toll-like receptor protein RP-105. *J. Exp. Med.* **188**, 93-101 (1998).
33. Kabelitz,D. & Medzhitov,R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 1-3 (2007).
34. Trinchieri,G. & Sher,A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 179-190 (2007).
35. Alam,R. & Gorska,M. 3. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S476-S485 (2003).

36. Lanzavecchia, A. *et al.* Understanding and making use of human memory B cells. *Immunol. Rev.* **211**, 303-309 (2006).
37. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *Lancet* **357**, 1777-1789 (2001).
38. Alam, R. & Gorska, M. 3. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S476-S485 (2003).
39. Alam, R. & Gorska, M. 3. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S476-S485 (2003).
40. Potocnik, A.J., Nielsen, P.J. & Eichmann, K. In vitro generation of lymphoid precursors from embryonic stem cells. *EMBO J.* **13**, 5274-5283 (1994).
41. Reth, M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 97-121 (1992).
42. Alam, R. & Gorska, M. 3. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S476-S485 (2003).
43. Bertrand, F.E., Vogtenhuber, C., Shah, N. & LeBien, T.W. Pro-B-cell to pre-B-cell development in B-lineage acute lymphoblastic leukemia expressing the MLL/AF4 fusion protein. *Blood* **98**, 3398-3405 (2001).
44. Ghia, P., ten Boekel, E., Rolink, A.G. & Melchers, F. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol. Today* **19**, 480-485 (1998).
45. Reth, M. & Wienands, J. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 453-479 (1997).
46. DeFranco, A.L. The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 296-308 (1997).
47. Reth, M., Gehrman, P., Petrac, E. & Wiese, P. A novel VH to VHDJH joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature* **322**, 840-842 (1986).

48. McCormack,W.T. *et al.* Chicken IgL gene rearrangement involves deletion of a circular episome and addition of single nonrandom nucleotides to both coding segments. *Cell* **56**, 785-791 (1989).
49. Fagarasan,S. & Honjo,T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* **290**, 89-92 (2000).
50. Martin,F., Oliver,A.M. & Kearney,J.F. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*. **14**, 617-629 (2001).
51. Fearon,D.T. & Locksley,R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50-53 (1996).
52. Alam,R. & Gorska,M. 3. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S476-S485 (2003).
53. Alam,R. & Gorska,M. 3. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S476-S485 (2003).
54. Mombaerts,P. *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-877 (1992).
55. Senn,B.M. *et al.* Combinatorial immunoglobulin light chain variability creates sufficient B cell diversity to mount protective antibody responses against pathogen infections. *Eur. J. Immunol.* **33**, 950-961 (2003).
56. Muramatsu,M. *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-563 (2000).
57. Martin,A. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature* **415**, 802-806 (2002).
58. Durandy,A., Peron,S., Taubenheim,N. & Fischer,A. Activation-induced cytidine deaminase: structure-function relationship as based on the study of mutants. *Hum. Mutat.* **27**, 1185-1191 (2006).

59. Wu,X. *et al.* Immunoglobulin somatic hypermutation: double-strand DNA breaks, AID and error-prone DNA repair. *J. Clin. Immunol.* **23**, 235-246 (2003).
60. Dasari,P., Nicholson,I.C., Hodge,G., Dandie,G.W. & Zola,H. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol.* **236**, 140-145 (2005).
61. Fillatreau,S. & Manz,R.A. Tolls for B cells. *Eur. J. Immunol.* **36**, 798-801 (2006).
62. Kabelitz,D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 39-45 (2007).
63. Bernasconi,N.L., Onai,N. & Lanzavecchia,A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* **101**, 4500-4504 (2003).
64. Jegerlehner,A. *et al.* TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *J. Immunol.* **178**, 2415-2420 (2007).
65. Liu,N., Ohnishi,N., Ni,L., Akira,S. & Bacon,K.B. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nat. Immunol.* **4**, 687-693 (2003).
66. Ruprecht,C.R. & Lanzavecchia,A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* **36**, 810-816 (2006).
67. Pasare,C. & Medzhitov,R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* **438**, 364-368 (2005).
68. Pasare,C. & Medzhitov,R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* **438**, 364-368 (2005).
69. Jap,B.K. & Walian,P.J. Structure and functional mechanism of porins. *Physiol Rev.* **76**, 1073-1088 (1996).

70. Siritapetawee, J., Prinz, H., Samosornsuk, W., Ashley, R.H. & Suginta, W. Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Biochem. J.* **377**, 579-587 (2004).
71. Gil-Cruz, C. Evaluación de la respuesta inmune innata inducida por las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi. 2006. Instituto Politécnico Nacional.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
72. Tomasic, J. *et al.* Comparative study of the effects of peptidoglycan monomer and structurally related adamantyltripeptides on humoral immune response to ovalbumin in the mouse. *Vaccine* **18**, 1236-1243 (2000).
73. Morokata, T., Ishikawa, J. & 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**, 119-126 (2000).
74. Nikaido, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3905-3908 (1994).
75. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
76. Gavin, A.L. *et al.* Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* **314**, 1936-1938 (2006).
77. Janeway, C.A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216 (2002).
78. Rajewsky, K. Immunology. The power of clonal selection. *Nature* **363**, 208 (1993).
79. Zhang, C., Zhang, J. & Tian, Z. The regulatory effect of natural killer cells: do "NK-reg cells" exist? *Cell Mol. Immunol.* **3**, 241-254 (2006).

80. Zinkernagel,R.M. What is missing in immunology to understand immunity? *Nat. Immunol.* **1**, 181-185 (2000).
81. Medzhitov,R. & Janeway,C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298 (1997).
82. Senn,B.M. *et al.* Combinatorial immunoglobulin light chain variability creates sufficient B cell diversity to mount protective antibody responses against pathogen infections. *Eur. J. Immunol.* **33**, 950-961 (2003).
83. Lopez-Macias,C. *et al.* Secondary rearrangements and hypermutation generate sufficient B cell diversity to mount protective antiviral immunoglobulin responses. *J. Exp. Med.* **189**, 1791-1798 (1999).