

194



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DEL PATRON DE CONECTIVIDAD IDIOTIPICA DE LAS INMUNOGLOBULINAS SERICAS DE PACIENTES VACUNADOS CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS A

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSE IGNACIO SALDAÑA FABREGAT

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. FELIPE ALONSO MASSO ROJAS



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
2002
FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
"Análisis del Patrón de Conectividad Idiotípica de las  
Inmunoglobulinas Séricas de Pacientes Vacunados contra  
el Virus de la Hepatitis A"

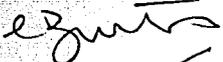
realizado por José Ignacio Saldaña Fabregat  
con número de cuenta 9550401-8, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología  
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	M en C. Felipe Alonso Massó Rojas
Propietario	Dr. Luis Felipe Montaña Estrada
Propietario	Dr. Edgar Zenteno Galindo
Suplente	Dr. Francisco Javier Sánchez García
Suplente	M en I.B.B. Saúl Cano Colin

Consejo Departamental de Biología

  
Dra. Patricia Ramos Morales

  
  
  
  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
U.N.A.M.



**DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA**

A Juan e Isabel, a toda mi familia,  
a mis amigos y a la UNAM.

## RESUMEN

Existe evidencia para considerar la expresión de anticuerpos autorreactivos como componentes normales del suero de un individuo sano y ejemplo de esto son; los anticuerpos anti-idiotipo. Considerando estas observaciones, se ha propuesto que el sistema inmune podría organizarse como una red de interacciones humorales y celulares a través de la cual, el sistema determina su propia identidad (la red idiotípica). Una de las principales propiedades de esta red, es la conectividad entre sus elementos, en particular entre los anticuerpos anti-idiotipo.

La conectividad idiotípica puede analizarse a través de la medición de la reactividad de un suero contra un grupo de fracciones de fragmentos  $F(ab')_2$  separados por isoelectroenfoque. De esta forma, la reactividad contra cada una de las fracciones de dichos fragmentos de inmunoglobulina, define un patrón de conectividad característico. En este trabajo se pretendió evaluar si existen cambios significativos en los patrones de conectividad idiotípica de 36 individuos sanos que mostraron diferencias en la producción de anticuerpos específicos contra el virus de la hepatitis A, durante una inmunización contra dicho patógeno. A través del análisis arriba mencionado, encontramos diferencias significativas en los patrones de conectividad idiotípica de los individuos estudiados, al menos 30 días después de la aplicación de la primera dosis de vacuna. Esta situación nos da indicios para considerar que los cambios en la concentración de anticuerpos, a causa de una inmunización, generan modificaciones en la configuración de las interacciones idiotipo-anti-idiotipo presentes en el suero, situación que podría explicar las frecuentes variaciones en la respuesta inmune humoral durante la vacunación.

## Lista de abreviaturas.

Ac. Anticuerpo.

ANOVA: Análisis de varianza.

APC: Célula presentadora de antígenos (por sus siglas en inglés).

CDR: Determinante de complementariedad (por sus siglas en inglés).

ELISA: Inmunoensayo enzimático (por sus siglas en inglés).

HAV: Virus de la Hepatitis A (por sus siglas en inglés).

HBsAg: Antígeno de superficie del HAV (por sus siglas en inglés).

IEF: Isoelectroenfoque.

IgA: Inmunoglobulina con cadenas pesadas tipo  $\alpha$ .

IgG: Inmunoglobulina con cadenas pesadas tipo  $\gamma$ .

IgM: Inmunoglobulina con cadenas pesadas tipo  $\mu$ .

IL12: Interleucina 12 (por sus siglas en inglés).

IL4: Interleucina 4 (por sus siglas en inglés).

IL6: Interleucina 6 (por sus siglas en inglés).

MANOVA: Análisis de varianza multivariado.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (por sus siglas en inglés).

OPD: orto-fenilén-diamina (por sus siglas en inglés).

PBST: Solución salina amortiguada con fosfatos con Tween 20

PSB: Solución salina amortiguada con fosfatos (por sus siglas en inglés).

Th1: Linfocito cooperador tipo 1.

Th2: Linfocito cooperador tipo 2.

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana.

$V_L$ ,  $V_H$ ,  $D_H$ ,  $J_L$ ,  $J_H$ : Segmentos; variable, de diversidad y de unión del gen de la región variable de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas.

# ÍNDICE

Aprobación  
Resumen  
Lista de abreviaturas  
Epígrafe

## I. INTRODUCCIÓN

i. ¿Qué precede a la Selección Clonal?, o el origen de la Red Idiotípica.

<b>1.1</b>	<b><i>El nacimiento de la Teoría de la Selección Clonal.....</i></b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Jerne y el seleccionismo.....</i></b>	<b>4</b>
<b>1.3</b>	<b><i>1957-1988. Las evidencias.....</i></b>	<b>5</b>
<b>1.4</b>	<b><i>La Red Idiotípica y la Selección Clonal: dos teorías con un origen concomitante.....</i></b>	<b>6</b>

ii. La Red Idiotípica del Sistema Inmune.

<b>1.5</b>	<b><i>Algunas definiciones.....</i></b>	<b>10</b>
<b>1.6</b>	<b><i>El concepto de la Red Idiotípica.....</i></b>	<b>11</b>

iii. La existencia de la red idiotípica.

<b>1.7</b>	<b><i>Idiotipos y red.....</i></b>	<b>13</b>
<b>1.8</b>	<b><i>La naturaleza de los idiotipos.....</i></b>	<b>18</b>
<b>1.9</b>	<b><i>La Red idiotípica como mecanismo de regulación de la respuesta inmune.....</i></b>	<b>22</b>
<b>1.10</b>	<b><i>Conectividad idiotípica.....</i></b>	<b>25</b>
<b>1.11</b>	<b><i>Respuesta inmune durante la vacunación antiviral.....</i></b>	<b>27</b>
<b>1.12</b>	<b><i>Características generales de la Hepatitis A.....</i></b>	<b>29</b>
<b>1.13</b>	<b><i>La red idiotípica y las infecciones virales.....</i></b>	<b>31</b>

## II. ANTECEDENTES DEL TRABAJO EXPERIMENTAL..... 32

## III HIPÓTESIS.....35

## IV. OBJETIVOS.....36

<b>4.1</b>	<b><i>Objetivo General.....</i></b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b><i>Objetivos particulares.....</i></b>	<b>36</b>

<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<i>5.1 Individuos y muestras serológicas.....</i>	<i>37</i>
<i>5.2 Determinación de las concentraciones de anticuerpos IgG específicos contra el virus de la Hepatitis A.....</i>	<i>37</i>
<i>5.3 Criterios de inclusión y determinación de los grupos experimentales.....</i>	<i>38</i>
<i>5.4 Cuantificación de IgG total.....</i>	<i>39</i>
<i>5.5 Obtención de una fracción de IgG enriquecida con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y libre de la porción Fc.....</i>	<i>40</i>
<i>5.6 Isoelectroenfoque.....</i>	<i>41</i>
<i>5.7 ELISA.....</i>	<i>42</i>
<i>5.8 Análisis Estadístico.....</i>	<i>43</i>
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<i>6.1 Características de los grupos experimentales.....</i>	<i>44</i>
<i>6.2 Electroforesis y análisis por Western Blot de la fracción enriquecida con fragmentos F(ab')<sub>2</sub>.....</i>	<i>46</i>
<i>6.3 Análisis de la reactividad contra la fracción total de F(ab')<sub>2</sub>.....</i>	<i>47</i>
<i>6.4 Análisis de la concentración total de IgG entre los grupos experimentales.....</i>	<i>48</i>
<i>6.5 Diferencias significativas en los patrones de conectividad idiotípica entre los grupos experimentales.....</i>	<i>49</i>
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>IX REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>X. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>71</b>

*"El hombre es una especie de no-ser;  
un gusano que roe el corazón de la  
realidad, pues sin ella no podría existir"*

*Jean Paul Sartre*

*"It is clear that a  
science that advances as rapidly as  
immunology requires a continuous  
revision of its theoretical foundations as  
well as a continuous expansion of the  
theoretical framework in order to  
encompass phenomena that older  
theories did not have to deal with".*

*Niels. K. Jerne*

# I. INTRODUCCION

i. ¿Qué precede a la Selección Clonal?, o el origen de la Red Idiotípica.

## **1.1 El nacimiento de la Teoría de la Selección Clonal.**

La teoría de la selección clonal es, sin duda, uno de los preceptos centrales de la inmunología del siglo XX, esta teoría establece los fundamentos de la respuesta inmune adaptativa y su origen puede rastrearse hasta principios del siglo XIX, inmune.

Se sabe que durante las primeras décadas del siglo XIX, el estudio del sistema inmune estaba enfocado en conocer los mecanismos de síntesis de anticuerpos, la fisicoquímica de las interacciones antígeno-anticuerpo y su especificidad (Silverstain, 1999). En esta época se conocía muy poco sobre la estructura general de una proteína y menos aún sobre sus mecanismos de expresión.

Entre 1900 y 1906 Paul Ehrlich, postuló la Teoría de la cadena lateral para explicar la presencia de anticuerpos en el suero sanguíneo, fenómeno previamente descrito por E.V Behring y S. Kitasato. Para Ehrlich la presencia de anticuerpos o *cuerpos inmunes*, se debía al resultado de un mecanismo de reparación del daño que ocasionan los antígenos en los tejidos. En su concepción, este daño estaba determinado por la asociación, específica e irreversible, entre el antígeno en cuestión y un conjunto de patrones estructurales (cadenas laterales como él los llamó) presentes en moléculas de la superficie celular (Mazumdar, 1989). De esta manera, los anticuerpos presentes en el suero de individuos infectados, surgirían de la secreción exagerada de las cadenas laterales necesarias durante el proceso de reparación.

Las características claves de este postulado, desde entonces ya seleccionista, son: el planteamiento de la existencia de un repertorio de receptores con diferentes especificidades antigénicas; la consideración de los anticuerpos como moléculas de estructura particular y con funciones relacionadas con la defensa del organismo y finalmente, el reconocimiento de los mismos como posibles moléculas capaces de interactuar entre sí o con el repertorio de receptores (Forsdyke., et al 1989).

Junto a ésto, los trabajos de Karl Landsteiner relacionados con la especificidad y complementariedad que caracterizan la relación estereoquímica de un complejo antígeno-anticuerpo, favorecieron el interés por el estudio de la estructura y síntesis de los anticuerpos, lo que llevo a la pérdida significativa del enfoque funcional del sistema inmune. (Silverstain, 1999).

Dentro de este contexto de ideas, en 1930 Felix Hauowitz y, posteriormente, Linus Pauling plantearon la teoría del antígeno como molde para explicar la síntesis de anticuerpos. Esta teoría plantea que el sistema inmune debe tener la capacidad para obtener información sobre la estructura del antígeno, con el objeto de modificar la conformación estructural de un anticuerpo después de su síntesis. Es decir, los anticuerpos solo podrían ser sintetizados en presencia de un determinante antigénico.

El énfasis otorgado, por parte de la comunidad científica dedicada a la inmunología, a los aspectos bioquímicos del sistema inmune, estableció un paradigma con relación al estudio de los mecanismos que subyacen a la respuesta inmune; en ese entonces, parecería complicado rebatir las posturas establecidas por una firme escuela estructural. Sin embargo, para Macfarlane Burnet y Frank Fenner, las evidencias presentadas eran insuficientes para explicar la presencia, en el suero de cualquier individuo, de lo que hasta ese entonces se podía considerar como proteínas con funciones de defensa. En particular para ellos, la teoría del antígeno como molde parecía inevitablemente imposibilitada para explicar una serie de evidencias importantes, entre las cuales destacaba; la capacidad del sistema para mantener la síntesis de anticuerpos aún sin la presencia del antígeno.

Por otro lado, la teoría del antígeno como molde mostraba ser incompatible con las características de la respuesta secundaria (la producción de una mayor cantidad de anticuerpos en un tiempo corto) y, finalmente, uno de los principales argumentos en contra fue, la incapacidad de la misma para incluir los fenómenos de tolerancia inmunológica a lo propio. Este último fenómeno se evidencio desde 1939, a partir de los experimentos que Burnet llevó a cabo, demostrando que durante el desarrollo embrionario tardío de las aves, en cierto tiempo es posible inducir un estado de tolerancia inmunológica (Mazumdar, 1989).

El avance y fortalecimiento de las evidencias mencionadas generó un cambio importante en el pensamiento inmunológico. Para entonces, la vieja escuela estructural había adquirido mucha importancia y, de hecho, se había constituido como

paradigma central en la inmunología; sin embargo, los trabajos de Burnet establecieron un nuevo enfoque basado en el estudio de la fisiología inmunitaria y en la incorporación formal de la selección darwinista como axioma central en el fenómeno de síntesis de anticuerpos.

Esto último es, en mi opinión, un concepto más bien heredado de los trabajos de Ehrlich y no necesariamente novedoso.

### **1.2 Jerne y el seleccionismo.**

La consolidación de la teoría de la selección clonal es precedida por un primer postulado seleccionista planteado por Niels K. Jerne. En 1955 Jerne postula la Teoría de la Selección Natural para la Formación de Anticuerpos, basada en un amplio conjunto de evidencias, entre las cuales destacan las siguientes: las características de la respuesta inmune secundaria; los cambios en la "calidad" de los anticuerpos formados tras repetidas inmunizaciones con un antígeno; el aumento exponencial en la concentración de anticuerpos en la sangre, durante la respuesta inmune; la memoria inmunológica; junto con las observaciones sobre la capacidad que parecía tener la estructura de superficie de algunos antígenos, para actuar como determinantes dominantes de la especificidad de anticuerpos.

El principal aporte de la teoría consistió en formular un marco conceptual que permitiera interpretar las principales características de la respuesta humoral, fuera de cualquier consideración cercana a las teorías del antígeno como molde (Jerne, 1955) y en concreto, esta hipótesis postuló una síntesis continua de anticuerpos con gran variedad de especificidades de manera que cualquier antígeno contra el cual el organismo pudiera montar una respuesta, se podría unir a una fracción significativa de anticuerpos. De esta manera, los complejos antígeno-anticuerpo serían fagocitados por los macrófagos y otras células de competentes, aportando la información necesaria para la síntesis de más anticuerpos específicos para dicho antígeno. Si bien la teoría es, como lo considera Jerne, una primera interpretación meramente especulativa, su principal aporte fue el de retomar la existencia de un repertorio preexistente de patrones de reconocimiento en los anticuerpos, y fundamentar el concepto seleccionista.

### **1.3 1957-1988. Las evidencias.**

La Teoría de la Selección Clonal nace 1957, a partir de dos importantes preceptos; la Teoría de la selección natural para la síntesis de anticuerpos (Jerne, 1955) y las aportaciones de David Talmage para considerar a las células productoras de anticuerpos más que a los mismos, como los sujetos de selección (Talmage, 1957).

En particular, la teoría de la selección clonal establece que en cada individuo existen poblaciones celulares (linfocitos), que poseen sitios de reconocimiento en moléculas de su membrana, correspondientes complementariamente a cada uno de los determinantes antigénicos para los cuales les sea posible responder. Este sitio de reconocimiento sería entonces equivalente en especificidad, a la globulina que dicha célula pueda secretar. De esta forma, la interacción entre el antígeno y la célula seleccionada, permitiría su proliferación y aumentaría también, las oportunidades para generar mutaciones en dicho producto de secreción.

La teoría de la selección clonal adoptó y formalizó los preceptos establecidos por Jerne en relación a la selección de "anticuerpos naturales", o aquellos con afinidad hacia los antígenos para los cuales el organismo pueda responder (Jerne, 1955); estableció que la tolerancia inmunológica podría explicarse gracias a un proceso de selección y eliminación, desde el desarrollo embrionario, de células portadoras de receptores con especificidad para antígenos propios y concibió la propiedad de cada antígeno para seleccionar a las células con receptores complementarios con el mismo. Junto a esto y como precepto central, explicó la capacidad de cada linfocito para producir receptores e inmunoglobulinas monoespecíficos.

Este axioma es, hasta el momento, uno de los conceptos centrales de la inmunología y su establecimiento representa la culminación de un amplísimo proceso de cambio conceptual en el estudio del sistema. Sin embargo, su actual robustez no proviene de su postulación como tal y, de hecho, en los años subsecuentes el concepto enfrentó importante oposición (Mazumdar, 1989). No obstante, tiempo después, la selección clonal encontró fundamento gracias a los experimentos de caracterización de la especificidad de poblaciones de linfocitos estimuladas con distintas cepas bacterianas (Lederberg, 1958), a la caracterización, por marcaje fluorescente, de las regiones variables de los anticuerpos de membrana de los linfocitos B; el fenómeno de exclusión alélica, y, más sólidamente, gracias a los aportes de César Milstein (Milstein

et al., 1975) para la síntesis *in vitro* de anticuerpos monoclonales junto con los trabajos de Susumo Tonegawa (Tonegawa et al., 1983) sobre los mecanismos de rearreglo y a la recombinación somática de los genes de las inmunoglobulinas.

#### **1.4 La Red Idiotípica y la Selección Clonal: dos teorías con un origen concomitante.**

En el marco del concepto seleccionista para la formación de anticuerpos y considerando que el repertorio de linfocitos capaces de sintetizar anticuerpos se habría producido en su totalidad y estaría presente en el suero de un individuo previamente a cualquier inmunización, (Burnet, 1949) la cuestión que dirigió la atención de Jerne fue simplemente: ¿qué precede a dicho fenómeno?, es decir ¿qué precede a la selección clonal?, en sus propias palabras, "*en algún lugar, al principio, tenemos que postular la producción espontánea de globulinas con gran variedad de especificidades al azar, para iniciar el proceso selectivo*" (Jerne, 1955).

En ese momento aún no se conocían por completo los mecanismos que determinan el desarrollo de los linfocitos B, ni aquellos que determinan genéticamente la estructura de los anticuerpos.

La modificación que Burnet realizó a la teoría de la selección natural de Jerne, no requiere de la producción espontánea de inmunoglobulinas ya que él postula que todas las poblaciones de linfocitos se producen en el embrión, mecanismo necesario para establecer el fenómeno de tolerancia a lo propio. Por lo tanto el problema se reducía, para él, a postular un mecanismo de modificación azarosa de las regiones variables de las inmunoglobulinas (Burnet, 1957). Por otra parte, para Jerne la situación continuaba careciendo de mecanismos sólidos que explicaran la formación de especificidades al azar y la selección de un repertorio abierto y compatible con el individuo. Aunado a lo anterior, Jerne creía fervientemente en la mutación somática como fenómeno rector de la diversidad de las regiones variables de los anticuerpos, por lo tanto, la idea establecida por la teoría de la selección clonal, sobre la existencia de un fenómeno de expansión de linfocitos mutantes, junto con un mecanismo de selección de mutantes útiles, fortaleció su hipótesis (Coutinho, 1995). El problema en ese momento era encontrar un mecanismo de generación de reconocimiento

inmunológico, siendo Jerne quien propuso una explicación aproximada, tomando en cuenta las siguientes observaciones: la proliferación de linfocitos en los órganos linfáticos primarios es muy intensa; sin embargo la mayoría de estos linfocitos son suprimidos, los genes que codifican anticuerpos en dichos linfocitos pertenecen a uno solo de sus complementos haploides (excusión alélica) y, finalmente, a la variación en las regiones de unión al antígeno, o idiotipos, entre los anticuerpos producidos por diferentes individuos de la misma especie (Jerne, 1974). Esta última evidencia confirmaría la existencia de algún mecanismo aleatorio de generación de variabilidad para los anticuerpos (hasta el momento desconocido).

En ese entonces, para explicar los fenómenos que subyacen a la generación de la diversidad de anticuerpos, previo al contacto con cualquier antígeno y por lo tanto previo a la selección clonal; Jerne considera la existencia en el genoma, de un conjunto de antígenos de histocompatibilidad propios y otros pertenecientes a cada especie, asociados con un grupo de anticuerpos auto reactivos paralelos (Jerne, 1971). Es decir, cada individuo de determinada especie tendrá ciertos antígenos de histocompatibilidad y ciertos auto anticuerpos contra ellos.

De esta manera la selección del repertorio disponible dependerá únicamente, de la proliferación de linfocitos capaces de expresar anticuerpos que presenten mutaciones o recombinación genética, y que desarrollen actividad contra los antígenos de histocompatibilidad que dicho individuo posee (Lederberg et al., 1959; Brener et al., 1966; Burneo., 1966; Whitehouse et al., 1967; Gally et al., 1970). Por otro lado linfocitos que expresan anticuerpos capaces de reconocer antígenos de histocompatibilidad que el individuo no posee pero que pertenecen a la especie, tampoco serían suprimidos, situación que explica el rechazo alogénico (Jerne, 1971).

Es muy importante destacar que con este planteamiento, Jerne formaliza la participación del fenómeno de mutación somática dentro de los procesos de formación del repertorio de anticuerpos. En concreto, Jerne soluciona el dilema de la existencia de dichos fenómenos en ausencia de antígeno, postulando la existencia de "antígenos desde el interior". El problema de producir anticuerpos naturales, o aquellos capaces de reaccionar con una inmensa cantidad de constituyentes celulares o humorales presentes en sueros de individuos normales (Avrameas et al., 1991), parecería estar elegantemente resuelto.

Cabe destacar que las evidencias postuladas hasta antes de los sesenta, sólo permitían conformar un esquema preliminar sobre los procesos que determinan la formación de los anticuerpos. Hasta ese entonces solo se podía inferir la existencia de mecanismos de mutación y recombinación somática, se consideraba al timo como el sitio inductor de mutaciones en los linfocitos B (Jerne, 1955), situación ciertamente equivocada y, de hecho, se sabía también muy poco sobre la función de dichas células. Se ignoraba mucho sobre la estructura primaria de los anticuerpos y mucho más sobre la presencia de idiotipos y alotipos, estructuras que requieren del conocimiento de las propiedades de la estructura tridimensional o nativa de un anticuerpo.

Sin embargo, en los años sesenta y principios de los setenta se demostraron, experimentalmente, un conjunto de observaciones que modificaron el marco teórico de la inmunología de la época y fundamentaron el desarrollo de la teoría de la red idiotípica. Entre estas observaciones destacan:

- A nivel de la estructura de los anticuerpos:

Los análisis de la variabilidad localizada cerca del residuo 107-amino terminal de las cadenas ligeras de los anticuerpos, (Hilschman et al., 1963) y el reconocimiento de la identidad idiotípica y alotípica de los mismos.

- Con relación a la expresión genética de los mismos:

El estudio de los polimorfismos y las diferencias entre los genes que codifican para las regiones variables y constantes de los anticuerpos, prueba que, en este caso, dos genes codifican para una sola proteína y la demostración del ligamiento entre los genes que codifican para cada región de una inmunoglobulina.

- Con relación a la respuesta inmune humoral:

Las observaciones reportadas por Oudin (Oudin et al., 1971; Jerne, 1974; Cazenave et al., 1973) sobre la capacidad del sistema inmune para sintetizar anticuerpos específicos e inespecíficos, simultáneamente, contra diferentes epítopes de un mismo antígeno,

la determinación de las concentraciones necesarias para inducir una respuesta y la demostración de la capacidad de un animal para producir anticuerpos contra los idiotipos y alotipos de cualquier otro anticuerpo (Iverson et al., 1970; Mage et al., 1973).

- Finalmente, en términos de la respuesta celular:

Los trabajos que establecieron la independencia funcional y la capacidad cooperativa entre los linfocitos T y B (Jerne, 1974); la posibilidad de un anticuerpo para reconocer y ser reconocido (Iverson et al., 1970); la capacidad de ciertos anticuerpos anti-alótipo para suprimir una respuesta (Mage et al., 1974) y la habilidad de un linfocito para responder o mantener una respuesta ya sea, positiva (activación) o negativa (supresión) si reconoce algún epítotope o si sus receptores son reconocidos.

Considerando el conjunto de evidencias arriba mencionadas, en 1974 Niels Jerne postulo la teoría de la red idiotípica. Para Jerne el objetivo inicial de la teoría fue proponer un mecanismo que permitiera explicar el origen del repertorio de anticuerpos, a través de la existencia de la representación "propia" o interna de todos los posibles antígenos a los que ese individuo se podría enfrentar, considerando al sistema inmune como una inmensa red de componentes que, en condiciones normales, adoptara un estado de equilibrio dinámico.

## ii. La Red Idiotípica del Sistema Inmune.

### **1.5 Algunas definiciones.**

Las interacciones antígeno-anticuerpo y anticuerpo-anticuerpo dependen, a nivel de la estructura tridimensional de cada molécula, de la presencia de determinantes antigénicos o epítopes. Un epítope es un fragmento de la estructura de una molécula que presenta una conformación capaz de ser reconocida, con diferentes grados de precisión, por otra conformación complementaria.

Considerando la estructura de un anticuerpo el fenómeno de reconocimiento se lleva a cabo en un sitio particular, conocido como región hipervariable o parátope. Por lo tanto, epítopes y parátopes son dos componentes esenciales del sistema inmune, permitiendo cumplir con una de las principales tareas del mismo: el reconocimiento de patrones estructurales (Jerne, 1974).

Los anticuerpos reconocen al antígeno gracias a sus parátopes y son a la vez reconocidos gracias a los epítopes que despliegan en la región hipervariable. Para evitar confusión, a estos epítopes se les denomina idiótopos y en grupos, estos mismos forman el idiotipo de cada inmunoglobulina. En concreto, para poder explicar más fácilmente este dualismo estructural (la habilidad de un anticuerpo para reconocer y ser reconocido), se ha denominado parátope al sitio que reconoce e idiotipo al que es reconocido (Jerne, 1974).

Para precisar formalmente el concepto de idiotipo, me parece conveniente adoptar la definición de su descubridor; para J. Oudin un idiotipo está compuesto por un conjunto de especificidades antigénicas presentes en los anticuerpos producidos por un individuo o un grupo de ellos en respuesta a cierto antígeno (Oudin et al 1971). Si consideramos que existe el potencial para sintetizar anticuerpos contra prácticamente cualquier antígeno, cada organismo tiene el potencial para producir un número muy grande de diferentes sitios de unión, ya sean parátopes o idiotipos. El número total de dichos parátopes o idiótopos corresponde al repertorio que un organismo puede expresar. Finalmente, cabe considerar que dicho repertorio, es, presumiblemente, mayor al repertorio de idiotipos y parátopes que cada organismo tiene disponible en cada momento, el cual también es inmensamente grande (aproximadamente  $10^{11}$  diferentes especificidades) (Jerne, 1972).

### 1.6 El concepto de la Red Idiotípica .

El sistema inmune posee un comportamiento propio\* caracterizado por una red de parátopes que reconocen idiótopos e idiótopos que son a su vez, reconocidos por grupos de parátopes. A través de esta red de interacciones, el sistema alcanza un estado de equilibrio dinámico dependiente de la síntesis y decaimiento de sus elementos. (ver figura 1).

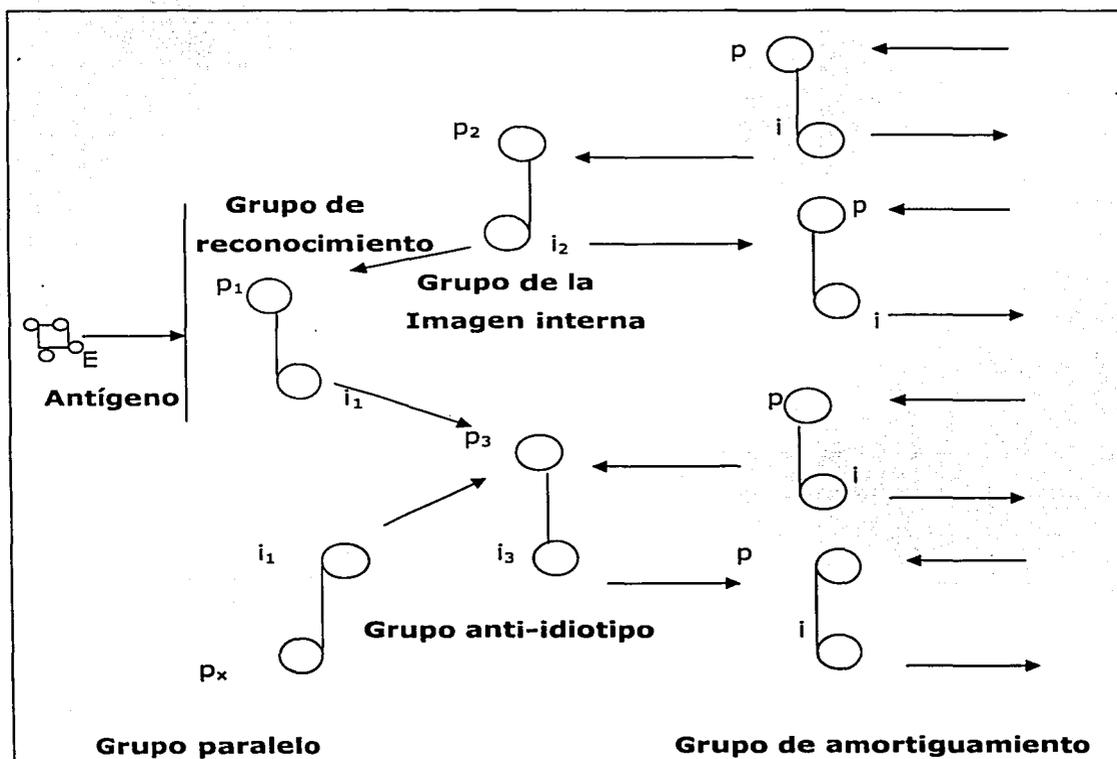


Figura 1.- Componentes básicas de la red idiotípica del sistema inmune. ( $p$ : parátopes,  $i$ : idiótopos,  $E$ : epítipo antigénico,  $\rightarrow$ : estimulación,  $\leftarrow$ : inhibición) (Jerne, 1974). Los círculos unidos por líneas representan la asociación de parátopes e idiótopos y de cada grupo de anticuerpos.

\*Eigen-behaviour en el idioma original.

Cuando el sistema se enfrenta a algún inmunógeno (E) el mismo es reconocido, con diferentes grados de precisión, por un conjunto de parátopes ( $p_1$ ) presentes en anticuerpos solubles o en los receptores de membrana de los linfocitos capaces de responder. Debido a que dichos receptores poseen también un conjunto de diferentes idiótopos ( $i_1$ ), estos dos componentes se representan formando un grupo capaz de reconocer el epítape antigénico. En concreto, dicho grupo de idiotipos y parátopes ( $p_1 i_1(E)$ ) está compuesto por todos los posibles linfocitos capaces de formar anticuerpos contra el epítape antigénico (E).

Adicionalmente, existen diferentes conjuntos de parátopes e idiótopos capaces de interaccionar con el grupo mencionado; por lo tanto, de forma subsecuente, cada parátape del conjunto  $p_1$  puede reconocer a otro idiótape del conjunto representado como  $i_2$  el cual de igual forma, se asocia a un nuevo conjunto de parátopes representado como ( $p_2$ ) para formar el grupo ( $p_2 i_2$ ). Este último grupo es uno de los principales componentes de la red y fue considerado por Jerne como la imagen especular interna del epítape antigénico al ser reconocido por el grupo capaz de reconocer directamente dicho epítape.

De manera independiente, cada idiótape del grupo  $p_1 i_1$  puede también ser reconocido por un nuevo conjunto de parátopes ( $p_3$ ) asociados a un conjunto de idiótopos  $i_3$ . Este grupo se conoce como grupo anti-idiotípico y se denomina ( $p_3 i_3$ ). De forma accesoria, también pueden existir algunos idiótopos del grupo 1 ( $i_1$ ) que se asocian a un conjunto de parátopes no relacionados, para formar un grupo paralelo ( $i_1 p_x$ ).

Como es posible observar en la figura, el conjunto de interacciones continúa de manera indefinida a través de la existencia de grupos capaces de interaccionar con aquellos de la imagen interna, o con los anti-idiotipo (estos grupos son representados por Jerne, como grupos de amortiguamiento).

Con el objeto de aproximar esta representación esquemática de la red, en términos funcionales, Jerne asoció a los elementos del grupo de la imagen interna ( $p_2 i_2$ ) como un grupo capaz de estimular la respuesta de los linfocitos del grupo de  $p_1 i_1$  y, por el contrario, aquellos del grupo  $p_3 i_3$ , como el grupo encargado de inhibirla (Jerne, 1974).

Finalmente, el sistema inmune en ausencia de estímulos antigénicos presentaría una predominancia de interacciones de tipo inhibitorio,

las cuales tendrían que ser sobrepasadas por aquellas estimuladoras, disparadas al entrar en contacto con algún antígeno.

Con el planteamiento de un mecanismo autónomo de control, Niels Jerne estableció un segundo esquema paralelo a la selección clonal, para comprender la organización del sistema inmune. Utilizando la diversidad de regiones variables de los anticuerpos para proveer al sistema inmune de elementos complementarios, la teoría fundamenta la autonomía del mismo, para determinar el origen y selección del repertorio de anticuerpos disponible y la capacidad para reconocer "lo propio de lo extraño" y mantener la homeostasis.

*iii.* La existencia de la red idiotípica.

### ***1.7 Idiotipos y red.***

La organización del sistema inmune depende de algunos principios básicos, dentro de los cuales destaca la capacidad de sus componentes para cooperar, por lo tanto, para explicar la fisiología del sistema no es posible considerar a cada grupo de linfocitos de forma independiente, si no que es necesario considerar que cada subpoblación se encuentra asociada o conectada a través de los productos de expresión que las distinguen, entre otros elementos, a través de sus idiotipos.

La red idiotípica del sistema inmune está definida, a través de dicho nivel de conexión, gracias a la capacidad de un grupo de linfocitos para reconocer específicamente un idiotipo, y transmitir señales de retroalimentación negativa o positiva.

Algunas pruebas importantes para fundamentar la existencia de la red idiotípica surgieron de un fenómeno común: la presencia en el suero de cualquier individuo normal, de anticuerpos capaces de reconocer diferentes epítopes de las regiones variables de otras inmunoglobulinas.

Existen múltiples evidencias experimentales que sugieren la capacidad del sistema inmune para reconocer determinantes antigénicos presentes en idiotipos propios o ajenos, y para producir anticuerpos específicos contra dichos determinantes

(Cazenave et al., 1977; Seferian, P.G et la., 1994; Vogel et al., 2000; Kaushik et al., 2001). Se ha reportado que al inmunizar conejos, estos son capaces de expresar inmunoglobulinas con el mismos alotipo o ratones singénicos con un antígeno y subsecuentemente con los anticuerpos producidos, se obtienen diferentes especies de anticuerpos anti-idiotipo con características variables, ver tabla 1.

Las observaciones arriba mencionadas se ven complementadas por la demostración de la capacidad de un individuo para producir, simultáneamente, una colección de diversos idiotipos característicos de otros individuos no emparentados (Urbain, J et al Hiernaux, J et al 1981). En estos experimentos se inmunizaron, independientemente, conejos no relacionados entre sí con un antígeno bacteriano (*Micrococcus luteus*), se purificaron anticuerpos contra el antígeno y posteriormente se produjeron, de forma independiente también, anticuerpos anti-idiotipo en otros conejos capaces de expresar inmunoglobulinas con el mismo alotipo. Una vez purificada cada especie de anticuerpos anti-idiotipo, se realizó una mezcla y se inmunizó un individuo produciéndose en él, una respuesta mezclada de anticuerpos anti (anti-) idiotipo específicos para cada una de las inmunoglobulinas anti-idiotipo utilizadas como inmunógeno. Cabe destacar que una de las características principales de cada una de las especies de anticuerpos producidas, fué la baja reactividad cruzada entre las mismas, junto con su alta especificidad para reconocer la molécula que le dio origen. Finalmente, si el conejo que produjo los anticuerpos anti (anti-) idiotipo es, posteriormente, inmunizado con el mismo antígeno bacteriano (*Micrococcus luteus*) muestra la capacidad para producir una respuesta mixta de anticuerpos con cada una de las especies de anticuerpos antes desarrolladas en diferentes conejos.

Estas observaciones nos hacen pensar que el repertorio de posibles idiotipos entre organismos de una misma especie es el mismo. Al parecer, la respuesta inmune no sólo depende de la selección por parte del antígeno de clones capaces de reconocer dicho antígeno, si no también depende de la historia idiotípica del individuo (Bona, 1983).

<b>Anticuerpos obtenidos</b>	<b>Características</b>
<b>Ac1</b>	Idiotipos producidos por el individuo inicialmente inmunizado. Estos anticuerpos presentan diversos idiotipos topográficamente distintos: idiotipos asociados al sitio de unión e idiotipos asociados a secciones de la región variable.
<b>Ac2</b>	<p>Anticuerpos anti-idiotipo generado contra Ac1:</p> <p><b>Ac2(α)</b> capaces de reconocer idiotipos asociados con secciones de la región variable del Ac1.</p> <p><b>Ac2(β)</b> capaces de expresar un idiótomo conformacionalmente capaz de mimetizar al epítome antigénico original, es decir, reconocen un idiótomo completamente asociado al sitio de unión. (Imagen especular interna del epítome antigénico).</p> <p><b>Ac2(γ)</b> capaces de reconocer idiotipos parcialmente asociados al sitio de unión del Ac1.</p>
<b>Ac3</b>	<p>Anticuerpos anti (anti)-idiotipo generados contra Ac2, esta respuesta es compleja y depende del tipo de Ac2 utilizado para inmunizar.</p> <p><b>Ac3(α):</b> representan un subgrupo heterogéneo capaz de reconocer idiotipos presentes en los Ac2 y aquellos inducidos por Ac2(β), poseen el mismo sitio de unión que presentan los Ac1.</p> <p><b>Ac3(β):</b> representan la imagen interna del epítome que indujo el correspondiente Ac2, algunos anticuerpos de este subgrupo, inducidos por Ac2 (α y γ), presentan reacción cruzada con el Ac1.</p>

*Tabla 1.- Cascada inmunológica; secuencia parcial de anticuerpos anti-idiotipo producidos en conejos o ratones al inmunizar con los antígeno y, subsecuentemente, con los anticuerpos producto de dicha inmunización. Estos anticuerpos muestran diferentes características a nivel de los idiotipos que expresan (Hiernaux, 1981; Urbain et al., 1983 en Bona).*

A través del análisis serológico de los anticuerpos anti-idiotipo resultantes de diversos esquemas experimentales de inmunización, se ha podido determinar la heterogeneidad de la respuesta anti-idiotipo. La existencia de diversos grupos de anticuerpos anti-idiotipo, cuyas propiedades estructurales se discutirán en la siguiente sección, nos indica diferencias a nivel estructural en los idiotipos que aquellos expresan, estas características fundamentan la existencia de diferentes grupos

idiotípicos dentro de la respuesta inmune. Por ejemplo, se han podido identificar los componentes del grupo paralelo descrito por Jerne (Bona et al., 1983). Por otro lado, la capacidad de los idiotipos para funcionar como antígenos autónomos se ha puesto de manifiesto en un sinnúmero de trabajos entre los cuales destacan: los ensayos en conejos que demuestran la capacidad de inducir la producción de anticuerpos contra el virus del mosaico del tabaco, en conejos, utilizando anticuerpos anti-idiotipo en lugar del antígeno correspondiente (Fraucotte, 1984); los experimentos que prueban la habilidad que tienen algunos anticuerpos anti-idiotipo, producidos por inmunización con algunas hormonas y neurotransmisores, por ejemplo: insulina, catecolamina  $\beta$  adrenérgica, acetilcolina entre otras, para llevar a cabo la función de dichas moléculas (Sege et al., 1978, Schreiber et al., 1980).

Finalmente cabe destacar que es posible demostrar la existencia de varios elementos que restringen la extensión de la respuesta descrita en la tabla 1; la inmunización con un antígeno o con un anticuerpo no genera una respuesta con una proporción de idiotipos o anti-idiotipos homogénea, por lo contrario, las proporciones de cada especie de inmunógeno, así como su naturaleza, concentración en suero y heterogeneidad, limitan la respuesta de los subsecuentes anticuerpos (Cerny et al., 1990).

Antes de continuar describiendo las características de los idiotipos y su capacidad como elementos reguladores de la respuesta inmune, es importante destacar el papel de los linfocitos T dentro de la hipótesis de la red idiotípica.

Al inicio, la red idiotípica del sistema inmune fue postulada incluyendo únicamente las posibles interacciones entre las regiones variables de los anticuerpos y los receptores de membrana de los linfocitos B; por lo tanto, una de sus principales limitaciones radica en la incapacidad para incluir la participación de uno de los componentes más importantes del sistema; los linfocitos T (Cerny et al., 1990).

Algunos trabajos han descrito la participación de los linfocitos T dentro de la red idiotípica (Hoffman, G. W et al., 1975; Urbain et al., 1979; Hiernaux, 1980; Kaufman et al., 1985). De hecho existen pruebas para considerar la existencia de idiotipos o estructuras similares en las regiones variables de los receptores de las células T reconocibles por algunas inmunoglobulinas (Marchalonis et al., 1992; 1994, ).

Junto a ésto, dichos receptores poseen presumiblemente la capacidad para reconocer idiotipos monoclonales cuando ratones singenéticos son inmunizados con dicho anticuerpo (Cerny et al., 1982 ; Eichmann et al., 1978 ; Lewis et al., 1978).

Finalmente estudios enfocados a estudiar la regulación de la respuesta celular han descubierto el papel de algunas interacciones idiotipo-anti-idiotipo entre células T (Anderson et al., 1976; Kimura et al., 1982; Wilson et al., 1982 ).

Colectivamente estas evidencias junto con muchos otros estudios, demuestran la habilidad que tienen los linfocitos T para reconocer idiotipos propios y para activarse como consecuencia de dicho reconocimiento. No obstante, existe poca evidencia sólida que nos permita identificar si estos linfocitos se activan en condiciones fisiológicas en el curso de la respuesta inmune; parece poco probable que los linfocitos B y los timocitos relacionados funcionalmente, puedan expresar idiotipos complementarios, ya que cada uno de estos grupos celulares reconocen epítopes con diferentes estructuras (en conformación nativa, o procesados y presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, MHC, respectivamente). Considerar la participación de los elementos que conforman el proceso de presentación antigénica es esencial para describir en términos fisiológicos la participación de los linfocitos T dentro de la red idiotípica, (figura 2).

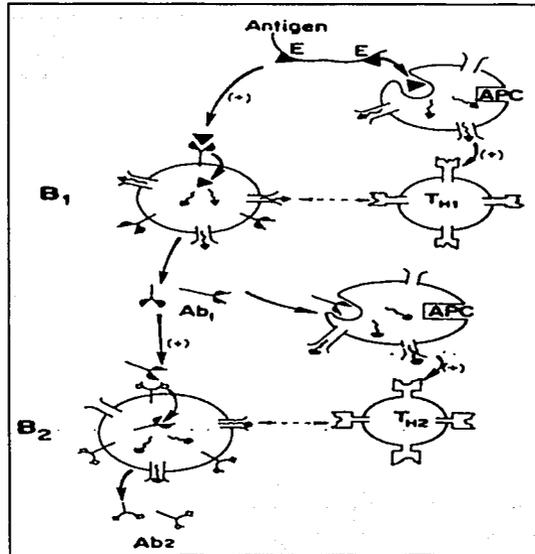


Figura 2.- La relación idiotipo anti-idiotipo, entre los linfocitos T ( $T_{H1}$ , y  $T_{H2}$ ) y B ( $B_1$  y  $B_2$ ) posiblemente requiere también de presentación antigénica (a través de las células presentadoras de antígeno profesionales APC), es decir se restringiría al MHC. En la figura se muestra una representación esquemática de la participación de los linfocitos T ( $T_{H1}$ , y  $T_{H2}$ ) dentro de la red idiotípica. Este esquema incluye la activación de los linfocitos T de forma timo-dependiente (APC- $T_{H1}$  y APC- $T_{H2}$ ) y timo-independiente ( $B_1$ - $T_{H1}$ ) (Cerny et al., 1990; McNamara et al., 1984).

### 1.8 La naturaleza de los idiotipos.

La expresión de los genes de las inmunoglobulinas es un proceso único. Gracias a una serie de mecanismos, el sistema inmune puede crear un repertorio de anticuerpos con una inmensa variabilidad a partir de un número relativamente pequeño de genes.

Los genes que codifican para las regiones variables de un anticuerpo están compuestos por dos (VL y JL) o tres (VH, JH, DH) segmentos que se combinan, al parecer, sin restricción (Wood et al., 1983). En el genoma, existen múltiples copias de estos segmentos y cada uno puede unirse, diferencialmente, gracias a un proceso conocido como recombinación somática.

La presencia de polimorfismos en las múltiples copias de los genes  $V_H$  y  $V_L$ ,  $J_H$   $J_L$  y  $D_H$  seleccionadas para formar los genes de las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina, proceso conocido como recombinación somática, es la fuente principal de diversidad para dos de las regiones hipervariables que conforman parte del sitio de unión de un anticuerpo. Adicionalmente, existe otro mecanismo que incrementa la variabilidad de una inmunoglobulina, este mecanismo depende de la incorporación y sustracción de nucleótidos en las uniones entre segmentos los génicos que conforman las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo y gracias a este, la variabilidad de dicha molécula, se ve significativamente incrementada, en particular en el tercer determinante de complementariedad (CDR 3).

Finalmente, el gen ya compuesto por los segmentos que codificaran la estructura de esta inmunoglobulina, se ve sometido a un proceso de introducción de mutaciones puntuales que aumentan, drásticamente, la variabilidad ya obtenida previamente. A este fenómeno se le conoce como hipermutación somática.

En conjunto todos estos mecanismos de diversificación genética dan como resultado un inmenso repertorio de sitios de unión. Como se mencionó anteriormente, este repertorio corresponde al potencialmente expresable por un individuo; sin embargo, este se ve restringido durante el desarrollo de una respuesta, a causa de los mecanismos de tolerancia y las modificaciones idiotípicas (Urbain et al., 1983).

La aceptación del el concepto de la red idiotípica se hace posible gracias a la existencia de un mecanismo capaz de generar anticuerpos con una inmensa diversidad estructural; si es posible sintetizar anticuerpos contra virtualmente cualquier antígeno, como define Landsteiner en: "*La especificidad de las reacciones serológicas*" (Landsteiner, 1945), es probable que el sistema pueda sintetizar anticuerpos contra los idiotipos que estos mismos despliegan.

Por otro lado, si como resultado de la recombinación somática, dos inmunoglobulinas con diferente especificidad pueden compartir un mismo segmento génico (por ejemplo  $V_L$ ), esta característica fundamenta una de las propiedades más importantes de la red: la heterogeneidad de las especies de anticuerpos anti-idiotipo observables al inmunizar, (ver tabla 1) característica postulada por Jerne a través de los diferentes grupos (anti-idiotipo, paralelo y de la imagen, (ver figura 1)).

Un idiotopo puede definirse, operacionalmente, a través de la posibilidad de obtener un anticuerpo anti-idiotipo complementario (Urbain et al., 1983), sin embargo, independientemente de la relativa facilidad experimental que implica la obtención de una población de anticuerpos anti-idiotipo, el estudio de la estructura de cada uno de los idiotopos presentes en dicha población es complicado. La inmensa variabilidad resultante de los mecanismos que dan origen al repertorio de anticuerpos (Daive et al., 1986), es una de las principales limitaciones a enfrentar para caracterizar idiotopos.

Una de las principales estrategias utilizadas para comprender la naturaleza (determinación, localización y propiedades) de dichos determinantes estructurales, es la caracterización serológica (Daive et al., 1986). Algunas observaciones de este tipo, han permitido establecer importantes propiedades como: la afinidad y distribución de un idiotopo particular dentro de una población de anticuerpos con varias especificidades; la variabilidad estructural de dicho idiotopo entre un grupo de diferentes inmunoglobulinas; su capacidad de reacción cruzada con otras especies, su multiespecificidad y la posibilidad para bloquear o inhibir la unión de otro idiotopo relacionado a cierto antígeno.

Los análisis de secuencia han permitido caracterizar, a nivel de la estructura primaria de algunos anticuerpos, los residuos que conforman determinados idiotopos (Manjula et al., 1976; Ret et al., 1979). Además de esto, algunas, modificaciones químicas de la estructura de algunos anticuerpos han probado ser útiles para determinar si la naturaleza de ciertos idiotopos depende de la presencia de residuos particulares (Dickerman et al., 1981). Con relación a la cantidad de idiotopos presentes en el paratope, se estima que cada región variable de un anticuerpo posee alrededor de 15 a 20 idiotopos (Novotny et al., 1986) y finalmente, una importante cantidad de estudios de cristalografía que han permitido distinguir las características moleculares de ciertos idiotopos incluyendo su localización dentro del paratope (Braden et al., 1996; Pollok et al., 1982).

Todas estas evidencias han permitido establecer algunos criterios de clasificación para los idiotopos, dentro de estos encontramos que debido a su localización en el paratope, los idiotopos se conocen como; asociados al sitio de unión, parcialmente asociados al sitio de unión (paratope idiotopes o near-paratope idiotopes

respectivamente) y distantes del parátipe, denominados asociados a la región variable (framework idiotopes). Cada uno de estos idiotopos puede ser reconocido por un anticuerpo anti-idiotipo complementario (ver tabla 1).

Igual que cualquier otro epítipe, los idiotopos también puede clasificarse como continuos si están conformados por un solo segmento de la secuencia de aminoácidos y como discontinuo, si su conformación depende de la proximidad de diferentes segmentos de la secuencia de aminoácidos, a causa de la estructura tridimensional del anticuerpo del cual dicho idiotopo forma parte. Los idiotopos continuos, son reconocidos por anticuerpos monoclonales completos, disociados en sus correspondientes cadenas o por péptidos sintéticos correspondientes a la región variable complementaria, no obstante, los discontinuos o conformacionales, no son reconocidos por inmunoglobulinas disociadas (Cerny et al., 1990).

Finalmente con relación a su expresión y presencia en el suero, los idiotopos se determinan como se muestra en la tabla 2.

<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Abreviatura</b>
De reacción cruzada o públicos.	Se expresan en los anticuerpos de la mayoría los individuos de la especie.	CRI, IdX
Mayores, dominantes o reguladores	Se expresan en una amplia fracción del suero.	CRIM
Menores	Se expresan en una fracción minoritaria del suero	CRIm
Privados	Se expresan solo en un grupo minoritario de individuos.	IdI

*Tabla 2.- Nomenclatura de los determinantes idiotípicos (Cerny et al., 1990).*

### **1.9 La Red idiotípica como mecanismo de regulación de la respuesta inmune.**

La respuesta inmune depende de un conjunto muy amplio de mecanismos de control que sirven para modular su capacidad y para recuperar el estado basal, cuando el estímulo antigénico desaparece. Dentro de estos factores encontramos a la capacidad de algunas células para interactuar positiva o negativamente a través de mediadores químicos como las citocinas y quimiocinas; las características de las moléculas del MHC que posee el individuo; la carga genética e historia inmunológica, entre otros. Además, existen algunos otros factores "ambientales" que determinan las propiedades de una respuesta y, en particular, podemos destacar la estereoquímica del antígeno o la dosis y vía de administración del mismo.

En asociación con los mecanismos mencionados, se ha postulado que las interacciones -idiotipo-anti-idiotipo- participan, dentro de la fisiología inmunitaria, como un mecanismo de control. Sin embargo, la presencia de idiotipos y anti-idiotipos como componentes normales en el suero de cualquier individuo, junto con su genealogía y complementariedad estructural, no son razones suficientes para considerar a la red idiotípica como un mecanismo formal de regulación, para ello, ha sido necesario analizar la capacidad de los componentes de la red para modular la respuesta inmune.

Una de las principales evidencias experimentales que han permitido establecer el papel de los idiotipos como elementos capaces de modular la respuesta inmune, surge de los experimentos que permiten inducir la expresión de idiotipos silenciosos\*, o aquellos generalmente no presentes en el suero después de una inmunización, utilizando anticuerpos anti-idiotipo. Por ejemplo, se sabe que en ratones de la cepa A/J inmunizados con hemocianina asociada a Arsonato (Ars-KLH) existe un idiotipo preferencial (CRI<sub>A</sub>), el cual no se expresa normalmente en ratones BALBc comunes; sin embargo, después de una hiperinmunización con un anticuerpo anti-CRI<sub>A</sub>, estos últimos desarrollan la capacidad de expresar dicho idiotipo (Moser et al., 1983).

---

\* *Silent Idiotypes en el idioma original*

Adicionalmente, un importante testimonio que ha permitido considerar la capacidad reguladora de los idiotipos, surge de los experimentos desarrollados en conejos irradiados y posteriormente reconstituídos con linfocitos activos provenientes de un donador con diferente alotipo. Estos experimentos demuestran que una vez transcurrido el tiempo de recuperación necesario, los conejos hospederos recuperan la capacidad de desarrollar anticuerpos propios (con un mismo alotipo), capaces de sintetizar, inmediatamente, anticuerpos con alta afinidad e idiotípicamente similares a los anticuerpos producidos por el donador. Esta situación demuestra que los linfocitos que se desarrollan en el hospedero durante el tiempo de recuperación y, que muestran idiotipos de reacción cruzada con aquellos del donador, son seleccionados positivamente por el ambiente idiotípico generado durante la reconstitución celular (VanAcker et al., 1979; Urbain et al., 1979).

La regulación de la respuesta inmune opera básicamente en dos niveles; por un lado puede llevarse a cabo seleccionando el repertorio de células efectoras disponibles y por otro a través del control de las respuestas en curso. En ambos sentidos se han desarrollado importantes observaciones que describen la participación de la red idiotípica. Algunos estudios han demostrado la capacidad que tienen los anticuerpos anti-idiotipo circulantes, para regular el número de precursores y de linfocitos B producidos por la médula ósea, a través de un grupo de interacciones entre regiones variables (Sundblad et al., 1991; Freitas et al., 1991). Otras observaciones postulan la capacidad de algunos anticuerpos anti-idiotipo para suprimir la síntesis del idiotipo correspondiente durante la etapa fetal o neonatal; por ejemplo, se sabe que la inmunización en ratones, con la vacuna anti-pneumococo (fosfocolina como inmunógeno principal) estimula la activación simultánea de dos clones capaces de reaccionar, una produciendo anticuerpos contra fosfocolina y otra sintetizando anticuerpos anti-idiotipo, los cuales reducen drásticamente la concentración de los primeros (Kleuskens et al., 1974).

Considerando la regulación de respuestas en curso, la red idiotípica parece jugar un papel como activador o supresor de la función efectora de los linfocitos (Skansen, 1994), pero, en particular, como componente importante de los mecanismos de control de la autoinmunidad. Algunos investigadores han demostrado la existencia de niveles importantes de reactividad entre las regiones variables de las inmunoglobulinas de isotipo IgG e IgM que de otra manera, mostrarían características

auto-reactivas (Adib et al., 1990). La relevancia de este último mecanismo de control periférico, se enfatiza con las observaciones que demuestran un incremento en la reactividad de las inmunoglobulinas séricas de individuos que presentan algunos padecimientos auto-inmunes (Ayouba et al., 1997; Pacheco García et al., 1999). Una de las áreas de particular interés en relación al estudio de la red es la referente a los mecanismos de tolerancia inmunológica. No es objetivo de este trabajo ahondar en este tema, sin embargo, es importante mencionar que independientemente de la predominancia del concepto de la delación clonal durante el desarrollo embrionario, la red idiotípica puede considerarse como un mecanismo complementario, a través de la consideración de la capacidad reguladora y la naturaleza de los anti-idiotipos. En particular si ahora sabemos que existe la posibilidad de poseer linfocitos B potencialmente autorreactivos en la periferia, si estos reconocen antígenos solubles durante su desarrollo (Coutinho, 1995).

Finalmente, antes de continuar, es muy importante recapitular una de las características más importantes de la red: la heterogeneidad de sus componentes. Si creemos que existen diversas especies de anticuerpos anti-idiotipo como resultado de una respuesta contra algún antígeno, la regulación se debe realizar preferencialmente por miembros selectos dentro de dichas especies de anticuerpos; en particular, por aquellos capaces de reaccionar como autoinmunógenos (Paul et al., 1982). A estos anticuerpos se les denomina idiotipos reguladores y dentro de este grupo encontramos aquellos capaces de expresar las características morfológicas de un antígeno externo, junto con otros que expresan las características de los epítopes propios, estos dos grupos se denominan como idiotipos de la imagen interna e idiotipos de la imagen especular, respectivamente, y al parecer muestran importantes diferencias en su capacidad para regular la respuesta inmune.

### **1.10 Conectividad idiotípica.**

Estudiar la participación de la red idiotípica, como parte de la fisiología del sistema inmune depende de la identificación y caracterización de sus propiedades fundamentales. En este sentido, las tres principales propiedades de la red son: los patrones de dinámica, la metadinámica y la conectividad idiotípica (Varela et al., 1991).

La dinámica de la red idiotípica involucra el análisis de los cambios en las concentraciones de idiotipos, que forman la red en determinado momento y este fenómeno está generalmente gobernado por el comportamiento de los linfocitos. Por otra parte, otra propiedad que va más allá de las fluctuaciones en las cantidades relativas de idiotipos presentes, es la producción continua de nuevas regiones variables gracias a los mecanismos de generación de diversidad inmunológica y diferenciación celular de los linfocitos. Esta propiedad se conoce como metadinámica y gracias a que cada región variable es única, la metadinámica de la red cambia constantemente produciendo nuevas configuraciones idiotípicas (Varela et al., 1991).

Finalmente, la tercera propiedad de la red y aquella que sustenta el objetivo general del presente trabajo, es la conectividad idiotípica. Esta propiedad estructural de la red está definida por el nivel de interacción entre las regiones variables de los anticuerpos al reconocer aquellas complementarias, ya sea en las inmunoglobulinas del suero o con los receptores de membrana de los linfocitos (Lacroix et al., 1998).

Una de las principales observaciones de la existencia de complementariedades estructurales a nivel de los anticuerpos, surge de los estudios serológicos desarrollados para caracterizar "anticuerpos naturales" o aquellos presentes en el suero en ausencia de estímulo antigénico (Digiero et al., 1983).

Aunado a esto, con el objeto de describir la existencia de dicha complementariedad espontánea, se han llevado a cabo investigaciones para caracterizar hibridomas derivados de ratones en diversas fases del desarrollo embrionario y durante la etapa neonatal.

A partir del análisis de la reactividad de los anticuerpos (de isotipo IgM) producidos por estos hibridomas, se ha podido establecer la existencia de un nivel considerable de conectividad y aunado a ello, se sabe que dicha conectividad no es propiedad de algunos grupos de inmunoglobulinas y más bien es característica del repertorio producido en dichas etapas del desarrollo y vida extrauterina (Holmberg et al., 1984; 1986).

El análisis de la secuencia de los genes que codifican para dichas inmunoglobulinas neonatales con alta conectividad, muestran que son parte del material genético de la línea germinal, presentan poca diversidad de unión, y demuestran el uso preferencial de algunos fragmentos génicos para las regiones variables ( $V_H$  y  $V_L$ ), próximos hacia los segmentos de diversidad D (Carlsson et al 1989).

En conjunto, todas estas evidencias indican la existencia de una complementariedad natural entre los anticuerpos; sin embargo, estas observaciones no son suficientes para considerar a la conectividad como parte funcional del sistema. En este sentido, las principales pruebas que fundamentan la importancia de la conectividad como parte de la fisiología del sistema inmune surgen del estudio de la actividad de los anticuerpos neonatales. Se ha reportado que la administración de anticuerpos anti-idiotipo durante la etapa neonatal, altera la producción de los idiotipos correspondientes (Lundkvist et al., 1989); también se sabe que algunos anticuerpos neonatales pueden incrementar la tasa de división celular de otros linfocitos (Coutinho et al., 1980) y, finalmente, algunas otras observaciones demuestran la capacidad de los anticuerpos neonatales para seleccionar el establecimiento de otros linfocitos B (Vakil et al., 1986).

En asociación con la conectividad neonatal, en los últimos años se ha reportado un conjunto de observaciones que fortalecen la participación de la conectividad idiotípica como parte importante de la fisiología inmunitaria. A través del análisis de la reactividad de las inmunoglobulinas séricas, algunos autores han podido determinar desviaciones importantes en la conectividad durante algunas patologías autoinmunes e infecciosas (Ayoub et al., 1997; Pacheco García et al., 1999; Tovar Rivera et al., 2000).

En la siguiente sección se describirán las características generales del sistema que hemos escogido para analizar la participación de la red idiotípica.

### **1.11 Respuesta inmune durante la vacunación antiviral.**

La secuencia general de respuesta a una infección viral aguda en ratones es la siguiente:

- 1.- La aparición de células T CD4.
- 2.- La aparición de células T CD8.
- 3.- La aparición de linfocitos B que producen inicialmente IgM (aproximadamente al día 6 de la infección y posteriormente IgG e IgA tiempo después).

Los títulos virales disminuyen aproximadamente al día 5 u 8 y esta situación coincide con un aumento en la actividad de los linfocitos citotóxicos y las células plasmáticas. Aproximadamente tres días después de la desaparición del virus, la actividad citotóxica ya no es perceptible y aumentan los títulos de células de memoria que persisten hasta por 18 meses o más (Ada, 1999).

La secuencia de eventos arriba descrita, nos muestra únicamente una pequeña parte de los mecanismos disponibles para defendernos contra cualquier agente infeccioso. El sistema inmune ha desarrollado un importante número de adaptaciones que nos permiten hacer frente a una interminable diversidad de estrategias de infección, dentro de las cuales se incluyen: la infección intracelular, la síntesis de toxinas, la latencia, la formación de estructuras de resistencia (quistes) y la mímica molecular entre otras. Por todas estas razones y en asociación con otras variables importantes como el estado de salud, la dosis y vía de entrada del antígeno, la respuesta inmune es significativamente distinta en cada caso.

En particular, durante las infecciones virales, se sabe que existe un papel preponderante de algunos componentes del sistema inmune y en particular, la actividad de los linfocitos citotóxicos, para limitar y, eliminar al virus en cuestión. Por otra parte, la actividad neutralizante de los anticuerpos producidos durante la infección es un componente eficaz para el control de la viremia (Ada, 1999).

Se sabe que la patogénesis de una infección particular es un factor que determina la intensidad y el tipo de respuesta que debe inducir una vacuna, por lo tanto en este sentido, existen algunos requisitos importantes que determinan la obtención de una vacuna eficaz (ver tabla 3).

Una estrategia que permite modular la respuesta inmune a una vacuna para obtener la respuesta más eficaz contra el patógeno en cuestión, es el adyuvante que se

mezcla con la preparación Inmunogénica. Un adyuvante, por definición, es cualquier sustancia que incrementa la respuesta del antígeno con el cual se mezcla (Jenaway, 2001) y en particular, existen tres tipos de adyuvantes según su modo de acción: aquellos que generan un acumulo de antígeno en la zona de aplicación controlando la liberación del mismo, los que aumentan la internalización del antígeno por las células presentadoras y, finalmente, los que inducen la secreción de factores capaces de incrementar la respuesta como citocinas y quimiocinas, por ejemplo: aquellos que estimulan la síntesis IL6 pueden alterar las respuestas de IgG e IgA en las mucosas, los que estimulan la producción de IL4 pueden incrementar las respuestas Th2, favoreciendo la síntesis de inmunoglobulinas y por el contrario inhiben la proliferación de células citotóxicas y finalmente, el uso como adyuvante o la estimulación de la síntesis de IL12 favorece las respuestas citotóxicas incluyendo la producción de interferón gama.

<b>Requisito</b>
Activación de las correspondientes subpoblaciones de células presentadoras de antígeno y la expresión de los componentes necesarios para la coestimulación.
Activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T y B, con el objeto de generar importantes poblaciones de células de memoria.
Incorporación de la suficiente cantidad de epítopes (preferencialmente de tipo inmunodominante) para activar el mecanismo de presentación antigénica y activar linfocitos T y B.
Incorporar los epítopes necesarios para inducir la respuesta de anticuerpos con mayor afinidad posible.
Asegurar una persistencia prolongada de los epítopes inmunogénicos como agregados, formando complejos inmunes o presentes en la superficie de las células dendríticas foliculares.

*Tabla 3.- Requerimientos básicos para obtener una vacuna eficaz (Ada, 1999).*

Finalmente las características del componente inmunogénico de cada vacuna también influyen a la protección que esta confiere, se sabe que la utilización de virus completos atenuados por radiación gama, la presencia de antígenos encapsulados, agregados o acoplados a microesferas, junto con el uso de antígenos recombinantes, favorecen la aparición de respuestas citotóxicas.

En conjunto, todas estas evidencias nos permiten concluir que existen importantes diferencias entre la respuesta inmune contra una infección natural en comparación con la inmunización artificial. El uso de adyuvantes, la preparación del inmunógeno y sus características dirigen respuestas inmunes de acuerdo con los lineamientos del diseño de dicha vacuna y a causa de ello, las respuestas inmunes de una población inmunizada con un tipo particular de vacuna no es siempre homogénea (figura 2).

### ***1.12 Características generales de la Hepatitis A.***

La hepatitis A es una inflamación aguda del hígado causada por un virus de RNA no encapsulado de la familia picornaviridae (HAV). El principal efecto de la infección es la interferencia de las funciones hepáticas a causa de la multiplicación viral en los hepatocitos, junto con la inflamación y daño hepático a causa de la respuesta inmune que desarrolla el individuo para controlar la infección. El curso de la misma puede dividirse en cuatro etapas clínicas: una etapa de incubación asintomática de 10 a 15 días; una fase preictérica de varios días, en la cual los síntomas generales son: la falta de apetito, náuseas, vómito y dolor abdominal; una etapa icterica que presenta como principal síntoma el aumento en los valores normales de bilirrubina hasta 40mg/l, en esta etapa el daño hepático es considerable; no obstante, sólo el 0.2% de los casos muere si no se desencadena la manifestación fulminante de la enfermedad.

Finalmente, la ultima etapa o de convalecencia es lenta, pero en la gran mayoría de los casos la recuperación es total. La única forma eficaz para diagnosticar el padecimiento es a través de pruebas serológicas o por medio de análisis bioquímicos de función hepática.

El virus es altamente estable; resiste altas temperaturas (70°C hasta por 10 minutos, pH de hasta 1 por horas y altas concentraciones de detergentes entre otras condiciones. El virión del HAV es una partícula con simetría icosaédrica simétrica con un diámetro de 27 a 32nm, compuesto únicamente por proteínas virales y RNA. Su genoma consiste en una cadena de RNA de aproximadamente 7.5 Kb, con una región 5' no traducible, sin cap y asociada covalentemente a una proteína viral. El genoma completo del virus codifica para tres proteínas virales de 30 a 33 kDa, 24 a 30 kDa y 21 a 28 kDa respectivamente, un par de proteasas, proteínas de la cápside y una RNA polimerasa. El antígeno de superficie inmunodominante está conformado por los residuos Ser 102 y Ser 14 de la proteína viral 1 y la Asp 70 de la proteína 3.

La antigenicidad del virus no es simple, sólo existe un serotipo identificado, los antígenos virales son conformacionales, la cápside no es antigénica y en general no existe reacción cruzada con otros virus de la hepatitis, finalmente, la neutralización del mismo se lleva a cabo por anticuerpos con isotipo IgM o IgG (Previsani et al., 2000).

La principal forma de transmisión es a través de la ingestión de alimentos y agua potable contaminados por heces fecales, aunque también es posible infectarse a través del sexo oral o anal y por transfusiones sanguíneas.

Debido a estas características, las sociedades con mayor riesgo son aquellas con niveles socioeconómicos bajos y con niveles de sanidad inapropiados.

Según la OMS nuestro país se encuentra en una región de muy alto riesgo con incidencias superiores a 150 casos por cada 100,000 habitantes al año (Previsani et al., 2000). Independientemente del uso de la vacuna como parte del esquema de vacunación nacional, un análisis realizado con 5262 niños mexicanos demostró que la seroprevalencia es del 70% en niños de 6 a 10 años y de casi el 90% de niños de 11 a 15 años (Tanaka, 2000), situación que afirma que el principal grupo afectado por la hepatitis son los menores.

Finalmente, el tratamiento para la hepatitis consiste básicamente en terapias de inmunización pasiva con sueros hiperinmunes y por inmunización activa para la cual existen diferentes vacunas comerciales preparadas básicamente con cepas del virus inactivado. La vacuna utilizada para inmunizar a los individuos del presente trabajo fue AVAXIM de Aventis-Pasteur y sus características se describen en la sección 4.1.

### **1.13 La red idiotípica y las infecciones virales.**

Se ha encontrado importante evidencia para establecer la posible participación de la red idiotípica durante las infecciones virales; la primera evidencia publicada al respecto, demuestra la existencia de anticuerpos anti-idiotipo con especificidad para reconocer anticuerpos anti-HBsAg (antígenos de superficie del virus de la hepatitis B) (Troisi, 1985). Análisis de la composición de la aparente respuesta anti-idiotipo durante la infección con influenza virus, sugieren la presencia de múltiples familias de idiótopos con diferentes patrones de expresión, gracias muy posiblemente a la expresión preferencial de algunos segmentos V, D, J, debido al fenómeno de mutación somática o a causa de los mecanismos de selección. (Liu et al., 1981).

Adicionalmente la dominancia de algunos idiotipos ha sido documentada en particular en la respuesta inmune de los mamíferos contra hepatitis B, situación que sugiere que la habilidad para responder, a través de una respuesta anti-idiotipo, contra un epítope particular del virus es una característica evolutivamente conservada (Kennedy et al., 1983)

El potencial regulatorio de estos anti-idiotipos ha sido analizado gracias a las observaciones que demuestran la disminución de los títulos de anticuerpos anti-idiotipo, cuando los títulos virales disminuyen (Ibarra et al., 1988) y formalmente, a través de los experimentos de manipulación *in vivo* de la inmunidad a través de la inmunización con anticuerpos anti-idiotipo relacionados con epítopes del virus de la hepatitis B (Kennedy, et al 1983; Kennedy et al., 1984).

Finalmente también se han alteraciones en el perfil de conectividad de individuos infectados con VIH-1 (Padierna Olivos et al., 2000).

## II. ANTECEDENTES DEL TRABAJO EXPERIMENTAL.

Igual que muchas áreas del conocimiento biológico, la inmunología en nuestros días se enfrenta a una importante paradoja: independientemente de la posibilidad que tenemos para manipular genes y genomas, diseñar moléculas y controlar comportamientos celulares, nos enfrentamos a limitaciones significativas para comprender al sistema en su conjunto, (Coutinho, 1995), el enfoque reduccionista que ha caracterizado al estudio del sistema inmune en los últimos años nos ha hecho perder la perspectiva general necesaria para comprender algunos fenómenos importantes como son la selección de los repertorios de moléculas efectoras; el establecimiento de la tolerancia inmunológica; la regulación de la respuesta y el reconocimiento entre lo propio y lo extraño. En búsqueda de respuestas para éstos fenómenos, una de las principales manifestaciones del enfoque global de estudio del sistema inmune es la teoría de la red idiotípica.

Como hemos planteado anteriormente, los avances posteriores al concepto de la red idiotípica han arrojado importantes evidencias para su fundamento, no obstante, en esa búsqueda, el desarrollo de la teoría se ha inclinado hacia responder cuestiones al parecer ya resueltas por la selección clonal y a causa de ello, ha perdido impacto. Debido a una mala interpretación del significado de este concepto, el desarrollo de la red se ha restringido al análisis de la participación de algunos idiotipos en fenómenos inmunológicos muy específicos y al uso de los mismos como herramientas o inmunógenos (Coutinho, 1989).

Existe un argumento que aparentemente confronta a la teoría de la selección clonal y a la red idiotípica. Para la selección clonal, el estado inmunológico previo a cualquier reto antigénico está caracterizado por la presencia de precursores en reposo a la espera de un estímulo externo, junto a esto, la selección del repertorio de moléculas efectoras sucede únicamente a través de un proceso de eliminación de autorreactividades y, por lo tanto, la única posible estimulación proviene de la presencia de antígenos externos (Janeway, 2001). Por lo contrario, la red idiotípica predice la existencia de cierta actividad autónoma, manifiesta a través de la presencia de linfocitos activos antes de cualquier reto antigénico.

Estos dos puntos de vista no son inconciliables, y esta engañosa contradicción no es mas que un conflicto de complementariedad. La red idiotípica y la selección clonal coexisten y forman parte de la organización general del sistema (Coutinho, 1989).

Para poder comprender las fronteras entre estas dos formas de operación y para definir el posible traslape entre ellas, es necesario estudiar la participación de la red a través del análisis de alguna de sus propiedades; entre ellas la conectividad idiotípica. Como ya hemos mencionado, se sabe que la existencia de subpoblaciones celulares que expresan autorreactividades, en particular al nivel de los anticuerpos, es parte de la fisiología del sistema inmune (Huetz, et al 1989; Coutinho et al., 1995; Cohen et al 1991). Gracias a esto, se ha sugerido que las manifestaciones autoinmunes pueden desarrollarse como resultado de las alteraciones en la conectividad idiotípica la cual es necesaria para regular la respuesta inmune. (Rossi et al., 1989). Desafortunadamente probar esta hipótesis requiere del análisis cuantitativo de la conectividad idiotípica y esta situación no había sido posible hasta el desarrollo de un método basado en la separación por isoelectroenfoque (IEF) de múltiples grupos de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> con diferentes especificidades. A través del análisis de la reactividad de las inmunoglobulinas séricas contra dichas fracciones, se pudo establecer por primera vez un patrón de conectividad y observar, las alteraciones de conectividad a causa del Lupus eritematoso sistémico (Ayoub et al., 1996).

Con el uso de una modificación de esta metodología, se ha demostrado que existen alteraciones de conectividad en otra importante enfermedad autoinmune cutánea, el Penphigus Vulgaris (Pacheco García et al., 1999). Si consideramos que el repertorio de anticuerpos anti-idiotipo tiene la función de eliminar posibles autorreactividades patológicos (Rossi et al., 1989), no es sorprendente encontrar diferencias significativas de conectividad entre individuos enfermos y sanos.

Junto a esto, también se han llevado a cabo estudios de conectividad idiotípica para dos importantes enfermedades infecciosas, inicialmente, L. Padierna Olivos y colaboradores demostraron que existen diferencias significativas en los patrones de conectividad idiotípica de pacientes sanos e infectados por VIH-1 (Padierna Olivos et al., 2000).

Por otra parte T. Tovar Rivera y colaboradores han reportado la incapacidad de distinguir los patrones de conectividad entre pacientes sanos e infectados por *Micobacterium tuberculosis* y *Micobacterium leprae* (Tovar Rivera et al., 2001).

Finalmente, desde esta perspectiva y con el objeto de entender más claramente los procesos que alteran la conectividad idiotípica, es necesario estudiar otras patologías, entre las que destacan las enfermedades virales. Junto a esto, el estudio de las alteraciones en la conectividad idiotípica de individuos sanos que responden de manera distinta a un estímulo antigénico o inmunogénico, es muy importante para entender el papel de la red como parte de la organización del sistema inmune.

### III HIPOTESIS.

- Existirán diferencias significativas en los patrones de conectividad idiotípica de las inmunoglobulinas séricas (IgG) de individuos vacunados contra hepatitis A que muestran claras diferencias en la respuesta humoral treinta días después de la aplicación de la primera dosis de vacuna.

## IV. OBJETIVOS

### **4.1 Objetivo General:**

- Determinar si existen diferencias significativas en los patrones de conectividad idiotípica de individuos vacunados contra el virus de la hepatitis A, que muestran distintas concentraciones de anticuerpos específicos contra el virus 30 días después de de la aplicación de la primera dosis de vacuna.

### **4.2 Objetivos Particulares:**

- Obtener una preparación enriquecida con fragmentos  $F(ab')_2$  a partir de un suero hiperinmune altamente heterogéneo por digestión enzimática.
- Obtener diferentes fracciones por isoelectroenfoque de la preparación enriquecida con fragmentos  $F(ab')_2$ .
- Determinar la reactividad del suero de cada individuo inmunizado contra la preparación total de  $F(ab')_2$ , con el objeto de analizar preliminarmente la conectividad idiotípica entre los grupos con diferente respuesta a la vacuna.
- Construir los patrones de conectividad idiotípica para cada grupo experimental, a través de la medición por ELISA de la reactividad del suero de cada individuo inmunizado contra cada una de las fracciones obtenidas por isoelectroenfoque.

## V. MATERIALES Y METODOS.

### ***5.1 Individuos y muestras serológicas.***

36 niños de 2 años de edad, seleccionados a partir de un estudio de campo realizado en nuestro laboratorio para evaluar la eficacia de una vacuna contra Hepatitis A, conforman los grupos experimentales del presente trabajo. Los individuos fueron originalmente seleccionados en la Unidad Familiar No. 1 del I.M.S.S en Saltillo, Coahuila y cada individuo recibió un esquema primario de vacunación. La vacuna utilizada (AVAXIM, Laboratorios Pasteur Merieux, Francia) está compuesta por dos dosis (primera dosis y refuerzo indicado 6 o 12 meses después) y posee las siguientes características: 160 unidades de virus inactivado de Hepatitis A (HAV) (cepa GMB) cultivado en fibroblastos humanos (línea celular MRC-5), 0.30mg de hidróxido de aluminio, 2.5 µg de 2-fenoxietanol, 12.5 µg de formaldehído y medio M199 hasta un volumen de 0.5 ml.

### ***5.2 Determinación de las concentraciones de anticuerpos IgG específicos contra el virus de la Hepatitis A.***

A lo largo del estudio de evaluación de la vacuna en cuestión, se cuantificó para cada individuo, la concentración de anticuerpos específicos contra el virus antes de recibir la primera inyección (muestra 1 o basal), treinta días después de la primera inyección (muestra 2), antes de la segunda inyección (muestra 3) y finalmente treinta días después de esta última (muestra 4), a través de un inmunoensayo enzimático comercial (Sanofi-Pasteur, Francia).

Se agregaron 10µl de cada suero a la placa pretratada con un extracto total del virus de la hepatitis A. Posteriormente se agregaron 200 µl del anticuerpo conjugado con peroxidasa y la reacción se dejó incubar por 3 h a 40 °C. Al terminar la incubación se lavó la placa 5 veces con 400µl de un amortiguador de Tris-NaCl pH 7.4 conteniendo Tween al 1 %. Para revelar la reacción se utilizaron 200 µl del reactivo cromogénico (Tetrametilbenzidina) dejando incubar a temperatura ambiente por 30 minutos en la oscuridad. Finalmente los datos de densidad óptica fueron medidos a 450 nm (filtro de

lectura) y 630 nm (filtro de referencia) en un lector para ELISA modelo E360 (Bio-Tek Instruments. Winooski Ver, EUA.).

La concentración de anticuerpos anti-HAV, presentes en la muestra medida, se calcula considerando una relación inversamente proporcional al valor de la densidad óptica obtenido.

Cabe destacar que este ensayo comercial está hecho para diagnosticar seroconversión por Hepatitis A, y para ello se incluyen controles negativos y positivos (reactivos incluidos en el kit) para cada prueba; en este caso, solo se consideraron los valores de los controles negativos para validar la reproducibilidad de cada prueba, como se reporta en el instructivo correspondiente (Sanofi-Pasteur, 1999).

### ***5.3 Criterios de inclusión y determinación de los grupos experimentales:***

Para conformar los grupos experimentales, construir los patrones de conectividad idiotípica y llevar a cabo las comparaciones pertinentes, los criterios de inclusión fueron los siguientes: a partir del total de los individuos involucrados en el estudio arriba mencionado, se consideraron 36 individuos clasificados en función de las concentraciones de IgG específica anti HAV en suero obtenidas a lo largo de todo el esquema (grafica 1). El primer grupo (n=6 individuos) incluyó aquellos pacientes con un aumento gradual en la concentración hasta un valor máximo treinta días después de la inyección 2. El segundo grupo (n=15 individuos) se caracteriza por una concentración creciente, un pico treinta días después de la inyección 1, valores decrecientes hasta antes de la inyección 2 y un valor máximo de concentración treinta días después de la segunda inyección. Este grupo posee una respuesta cercana al comportamiento clásico; es decir, el título de anticuerpos aumenta tras la primera inmunización hasta alcanzar un valor máximo variable, se inicia un periodo de regresión hacia los valores basales y se observa un aumento dramático del título tras la siguiente inmunización (Janeway, 2001).

El grupo 3 (n=15 individuos) presenta una respuesta muy activa y sostenida desde la primera inmunización, en este caso los títulos de anticuerpos aumentaron

drásticamente desde la primera inyección y continuaron en aumento sostenido hasta treinta días después de la inyección 2.

Finalmente, el presente trabajo forma parte de un proyecto mas grande que pretende determinar si existen cambios en los patrones de conectividad idiotípica, durante la vacunación contra hepatitis A, entre los tres grupos experimentales arriba definidos. Para llevar a cabo dicho objetivo, se construirán y compararan los patrones de conectividad idiotípica de los individuos de cada grupo, considerando tres muestras séricas (muestra 1, 2 y 3) recabadas a lo largo de todo el esquema de inmunización (ver sección 5.1). Por lo tanto, de forma inicial, se decidió construir y comparar los patrones de conectividad idiotípica entre los tres grupos correspondientes, considerando únicamente las muestras de suero después de 30 días de la primera inyección (muestra 2). Dicha muestra corresponde al momento de mayor variabilidad en las concentraciones séricas de anticuerpos anti HAV entre los individuos de cada grupo experimental y por lo tanto, en esta muestra esperamos una mayor variabilidad en la conectividad idiotípica.

#### ***5.4 Cuantificación de IgG total.***

Se determinó la concentración total de IgG para cada suero, utilizando un sistema de nefelometría (Array 360 Beckman, Fullerton, CA, EUA), con el objetivo de llevar a cabo los ensayos de conectividad en igualdad de concentraciones entre todos los individuos evitando así, encontrar diferencias entre ellos relacionadas con la concentración.

### **5.5 Obtención de una fracción de IgG enriquecida con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y libre de la porción Fc.**

Para construir los patrones de conectividad idiotípica, se utilizó una fracción enriquecida con fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Esta fracción, se obtuvo por digestión enzimática de un suero policlonal para administración intramuscular (Beriglobina P; producida por Laboratorios Aventis-Pasteur, Francia), compuesto por una mezcla pura y ampliamente heterogénea de IgG, proveniente de donadores sanos.

Dicha fuente de fragmentos de inmunoglobulina nos aporta un conjunto muy diverso de posibles idiotipos para establecer confiablemente un patrón de reacción idiotipo-anti-idiotipo.

La digestión enzimática se realizó de acuerdo a una modificación del método de Lamoyi (Lamoyi et al., 1983): se dializaron aproximadamente 2 ml de la preparación contra un amortiguador de acetatos 20 mM pH 4.0 durante 4 h a 4 °C, después de la diálisis, la concentración total de inmunoglobulina fue cuantificada colorimétricamente por el método de Bradford (Bradford et al., 1976) utilizando un reactivo comercial (Biorad, Richmond, CA, EUA) y sometida a digestión con pepsina (Sigma, St Louis Missouri, EUA) disuelta en el mismo amortiguador.

La digestión se llevó a cabo con una relación de peso enzima/substrato del 5%, durante 24 h a 37 °C en un incubador (Napco, Winchester, VA, EUA). Pasado este tiempo la reacción se detuvo con 100 µl de Tris-base 2 M pH 8.0 (Sigma, St Louis Missouri, EUA) e inmediatamente dializada contra PBS pH 7.2. Este proceso se llevó a cabo incluyendo una muestra control, en las mismas condiciones pero en ausencia de enzima.

El producto resultante se sometió a una cromatografía de afinidad con una columna de proteína A (Pierce-Endogene, Rockford, IL, EUA), para eliminar trazas de inmunoglobulinas parcialmente digeridas o fragmentos que pudieran interferir en la reacción idiotipo-anti-idiotipo.

Finalmente la condición de dicha fracción se evaluó por electroforesis, en gel de poliacrilamida al 10 %, según el método de Laemli (Laemli, 1970) (figura 2), revelando con plata amoniaca y por Western blot, por el método de Towbin (Towbin,

1979.), para descartar cualquier reactividad posible entre la fracción de  $F(ab')_2$  y el componente conjugado que se utilizó para realizar los ensayos inmunoenzimáticos. Para el Western Blot se electrotransfirió, en una cámara semiseca (Owl, Portsmouth, NH, EUA) una proporción de la fracción total y del control negativo (aproximadamente 0.5µg de proteína en ambos casos) a papel de nitrocelulosa seleccionando proteína-A conjugada con peroxidasa (Sigma, St Louis Missouri, EUA) y quimioluminiscencia con Luminol (Pierce-Endogen, Rockford, IL, EUA) como sistema de revelado (ver figura 3). Seleccionamos el reactivo Luminol, debido a que muestra una sensibilidad de detección superior (pg de proteína) a la resultante en los ensayos de ELISA revelados con el mismo componente conjugado pero con el sistema de OPD. La concentración final de proteína se calculo colorimétricamente por el método de Bradford (Bradford et al., 1976).

### **5.6 Isoelectroenfoque.**

Con el fin de obtener diferentes subfracciones de fragmentos  $F(ab')_2$  a partir del producto de la digestión, se llevo a cabo un proceso de separación por isoelectroenfoque (IEF). Este procedimiento se realizó en una cámara *Rotofor* (Biorad, Richmond, CA, EUA), en la cual la separación se lleva a cabo de forma distinta a los procedimientos clásicos de IEF en gel. En este caso; la separación de la muestra sucede en solución acuosa y gracias esta característica, al termino del proceso es posible recuperar un conjunto de fracciones de proteína, en condiciones para ser utilizadas en posteriores análisis.

En este caso; las condiciones de separación fueron las siguientes: inicialmente se realizó una precorrida durante una hora, únicamente con la solución de corrida compuesta por: urea 3M, 18.6% de glicerol, 0.01% CHAPS y 3% de anfólitos con un gradiente de pH de 5 a 9 (una mezcla al 2 % pH 7-9 y al 1 % pH 5-8) (Sigma, St Louis Missouri, EUA). Al término, se agregó la preparación de  $F(ab')_2$  previamente dializada contra (PBS 0.0015 M de fosfatos, 0.015 M NaCl) para eliminar el exceso de sales y se dejó proceder a 12 watts por 4 h a 5 °C. Al término de este tiempo, se recuperaron veinte fracciones y se midió el pH de cada una. Se agregó a cada

fracción NaCl a saturación para precipitar y extraer los anfolitos, y después se dializaron extensivamente contra PBS (Pacheco, et al 1999).

Las concentraciones de cada fracción se midieron colorimetricamente por el método de Bradford (Bradford et al., 1976). En la figura 4 se muestra la relación entre los puntos isoeléctricos de cada fracción y su concentración de proteínas.

## **5.7 ELISA**

El patrón de conectividad idiotípica se estableció a partir de la reactividad de los sueros contra cada una de las 20 fracciones obtenidas por IEF, y contra una proporción de todas las fracciones. Dicha reactividad se midió a través de un inmunoensayo enzimático de la siguiente manera: placas de 96 pozos de alta capacidad de pegado (Costar, Cambridge, Mass, EUA), fueron tratadas con 100  $\mu$ l/pozo de una solución 5 de cada fracción y 10  $\mu$ g/ml de la fracción total en solución salina amortiguada con boratos pH 8.2 (BBS). Las placas se incubaron por 2 h a 37 °C y durante una noche a 4 °C. Posteriormente se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l/pozo de BBST 0.1% en un lavador automático (Bio-Tek Instruments, Winooski Ver, EUA). Subsecuentemente las mismas se bloquearon con 150 $\mu$ l/pozo de una solución de gelatina de piel de bovino 0.1 % en BBST, durante 1 h a 37 °C para evitar el pegado inespecífico del suero en los sitios no ocupados.

Posteriormente, conociendo las concentraciones de IgG total en cada individuo, ajustamos cada suero a 10  $\mu$ g/ml (en PBST 0.3 % y EDTA 10 mM), agregando 100  $\mu$ l/pozo a la placas pretratadas. El tiempo de incubación en este caso fue de; 1 hora a 37 °C y toda la noche a 4 °C, la incubación nocturna nos permite asegurar una reactividad total entre el suero y las fracciones en cuestión.

Una vez más, las placas se lavaron tres veces con PBST 0.1 % y después se agregaron 100 $\mu$ l/pozo de una solución 8000 veces menos concentrada de proteína A conjugada con peroxidasa (Sigma, St Louis Missouri, EUA), como componente cromogénico.

Al término de un intervalo de incubación de 1 h a 37°C, las placas se revelaron con una solución de orto-fenilen-diamina (OPD) (Sigma, St Louis Missouri, EUA). Este ensayo se hizo como se reporta en la literatura (Pacheco García et al., 1999).

Finalmente los datos de densidad óptica se midieron a 490 nm (filtro de lectura) y 630nm (filtro de referencia) en un lector para ELISA modelo E360 (Bio-Tek Instruments, Winooski Ver, EUA).

Durante los ensayos de ELISA se incluyeron algunos controles para evaluar el pegado inespecífico, para ello, se utilizó 100µl por pozo de una solución 10µg/ml de la fracción total de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y el componente cromogénico. Junto a esto, cada medición se llevo a cabo por duplicados con un intervalo de confianza entre replicas no mayor al 10 %.

### ***5.8 Análisis Estadístico.***

Con el objetivo de comparar las concentraciones de IgG total entre los grupos, se realizo un ANOVA de una vía. Por otro lado, para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos experimentales en términos de la reactividad contra dicha preparación total, se aplicó también, un ANOVA de una vía a los valores de densidad óptica de cada suero contra la preparación total.

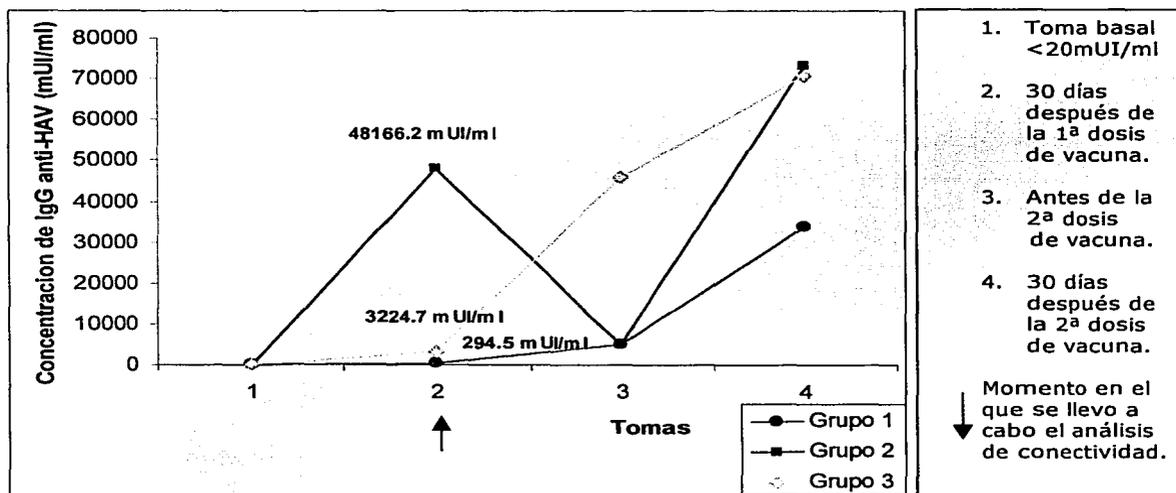
Para analizar los patrones de conectividad idiotípica se utilizó un análisis de función discriminante. Este análisis nos permite encontrar diferencias significativas entre los grupos en términos de la reactividad de cada suero contra las veinte fracciones obtenidas por IEF, y a su vez, nos permitió establecer las fracciones que hacen mayor diferencia entre dichos grupos.

Finalmente se probó si existen diferencias estadísticamente significativas entre los individuos, en términos de dichas fracciones a través de un análisis multivariado de varianza (MANOVA). Todas estas pruebas se llevaron a cabo con el programa SPSS versión 10, considerando en cada caso una probabilidad de encontrar diferencias debidas al azar menor al 5%.

## VI. RESULTADOS

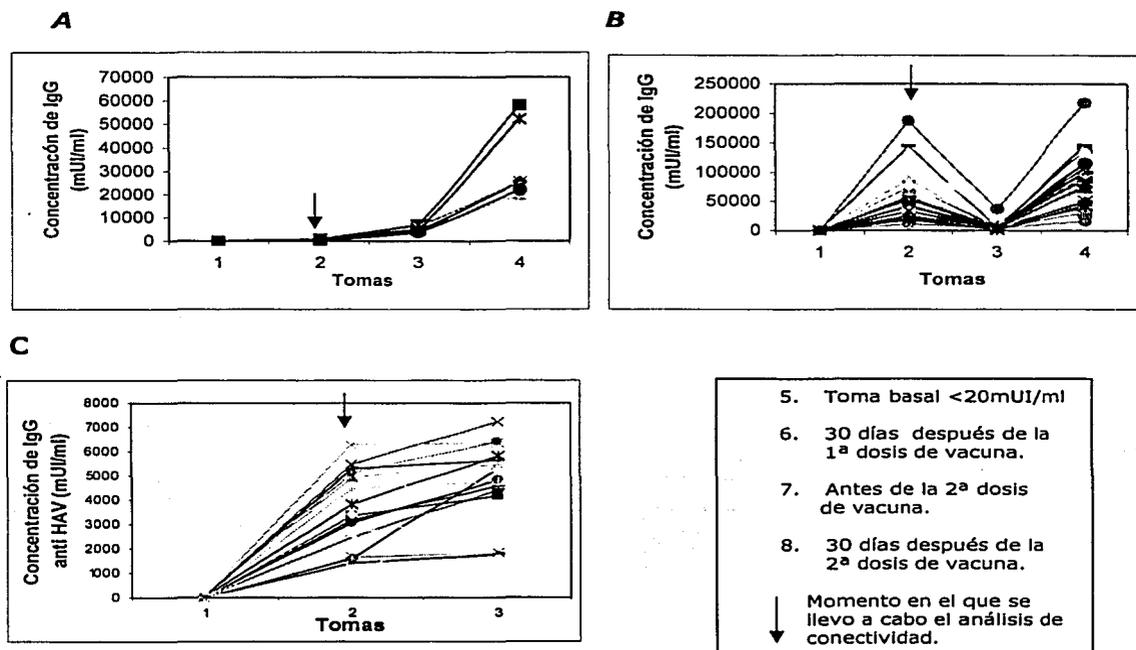
### 6.1 Características de los grupos experimentales.

Utilizando los valores de concentración de IgG específica contra el virus de la Hepatitis A, obtenidos a partir del estudio de campo, se establecieron tres grupos experimentales cuyas características se muestran en la gráfica 1. Estos individuos mostraron concentraciones basales de anticuerpos contra el virus menores a las consideradas internacionalmente, como de seroconversión, es decir; un valor equivalente o mayor a 20 mUI/ml de anticuerpos específicos contra el virus. Dicho título de anticuerpos en sangre es, generalmente menor al medido después de una infección natural. (Feinstone, 1999).



Gráfica 1.- Valores promedio de concentración de IgG específica contra HAV, de todos los individuos de cada grupo experimental. Los valores dentro de la gráfica muestran la el valor promedio de anticuerpos anti-HAV al momento del análisis de conectividad idiótica.

concentración de IgG lento llegando a un máximo de concentración, sólo 30 días después de la segunda dosis de vacuna. Por otra parte, el grupo 2 mostró una respuesta similar a la respuesta inmune clásica a dos inmunizaciones descrita en la literatura (Janeway 2001), en este grupo encontramos un aumento significativo en los títulos de IgG anti HAV después de la primera dosis, una disminución hacia los valores basales, seguido de un aumento drástico de concentración después del refuerzo (6 meses después). Finalmente el grupo 3 mostró una respuesta en aumento desde la primera toma hasta valores superiores a 70,000 mUI/ml después de la segunda dosis. La gráfica 2 muestra el comportamiento de cada grupo experimental de forma individual.



Gráfica 2.- Concentración de IgG sérica específica contra el virus de la Hepatitis A, en los individuos de cada grupo experimental a lo largo del esquema de vacunación. A: grupo 1, B: grupo 2 y C: grupo 3 (en el grupo 3 se muestran los valores correspondientes únicamente a las tomas 1,2,3).

## 6.2 Electroforesis y análisis por Western Blot de la fracción enriquecida con fragmentos $F(ab')_2$ .

Una vez llevada a cabo la digestión enzimática del suero hiperinmune que se utilizó como fuente de idiotipos para construir los patrones de conectividad idiotípica, la composición de la fracción resultante se muestra en la figura 3.

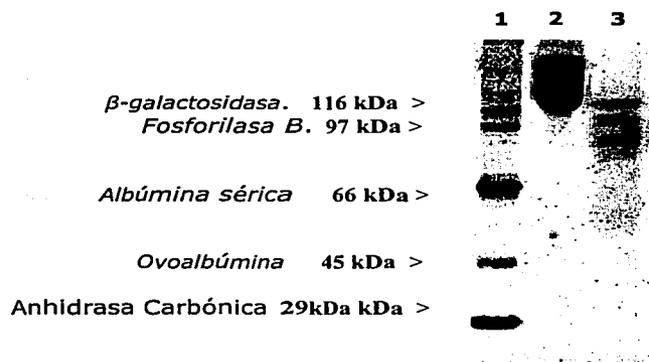


Figura 3.- Electroforesis, bajo condiciones no reductoras en gel de poliacrilamida al 10% y revelada con plata amoniacal. (1): Mezcla de marcadores de peso molecular (Sigma, St-Luis... Missouri), (2): IgG no digerida (3): fracción digerida de IgG.

Posteriormente, para evaluar si existe reactividad entre la fracción de fragmentos  $F(ab')_2$  y el componente de proteína A-peroxidasa (conjugado utilizado en los ensayos de ELISA), se realizó un Western Blot cuya imagen se muestra en la figura 4



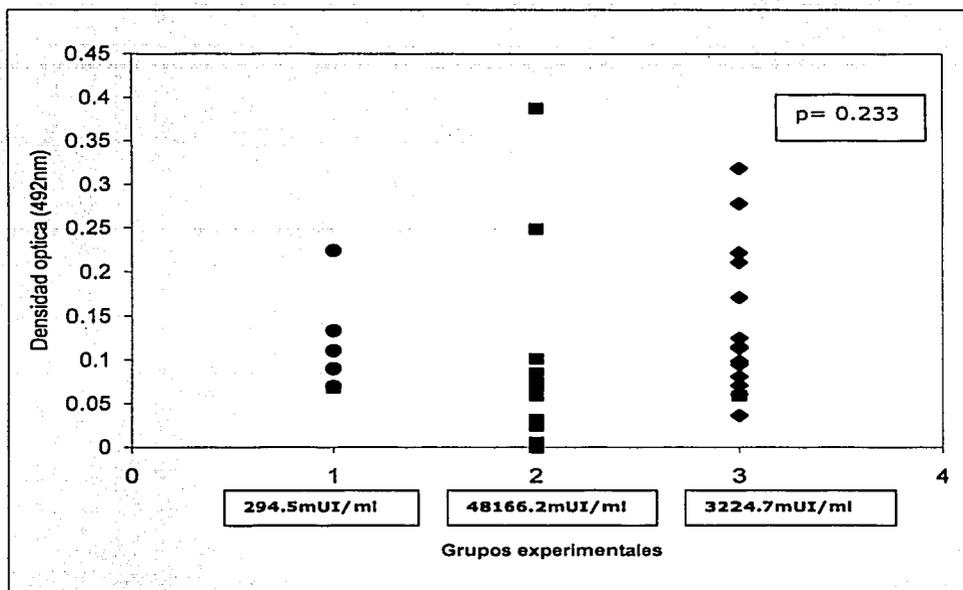
Figura 4.- Western Blot del producto de la digestión en papel de nitrocelulosa y revelado con proteína A-peroxidasa-luminol. (1): 0.5 µg de IgG no digerida, (2): 0.5 µg de la fracción de  $F(ab')_2$ .

La fracción de fragmentos  $F(ab')_2$  separada por electroforesis, produjo dos bandas con pesos moleculares aparentes de entre 116 y 85 kDa. Esta situación es lógica ya que esta muestra no fue sometida a una cromatografía por exclusión para purificar solo la fracción pura de fragmentos  $F(ab')_2$  (108 kDa). Observamos también, una tercera banda con peso molecular aparente superior a 116kDa, por lo tanto, con el objeto de evaluar si existe reactividad entre la fracción de fragmentos  $F(ab')_2$  y el componente de proteína A-peroxidasa (conjugado utilizado en los ensayos de ELISA), que pueda generar falsos positivos durante los experimentos de conectividad por inmunoensayo enzimático, se realizó un Western Blot utilizando como componente conjugado, proteína A-peroxidasa. Este ensayo nos muestra que existe reactividad en comparación con un control de IgG no digerida (ver figura 4).

### **6.3 Análisis de la reactividad contra la fracción total de $F(ab')_2$**

Para caracterizar de forma preliminar la conectividad idiotípica de cada grupo experimental, se midió, a través de nuestro sistema de ELISA, la reactividad contra una preparación total de  $F(ab')_2$ . Los valores de reactividad demostraron ser muy bajos sin embargo; por lo tanto estos resultados son únicamente un indicio parcial de la conectividad total entre los grupos experimentales.

No existen diferencias estadísticamente significativas, al compararse los grupos experimentales, a través de un análisis de varianza ( $p= 0.233$ ). La gráfica 3 muestra una distribución de los valores de reactividad contra la fracción total de  $F(ab')_2$ , para cada grupo.

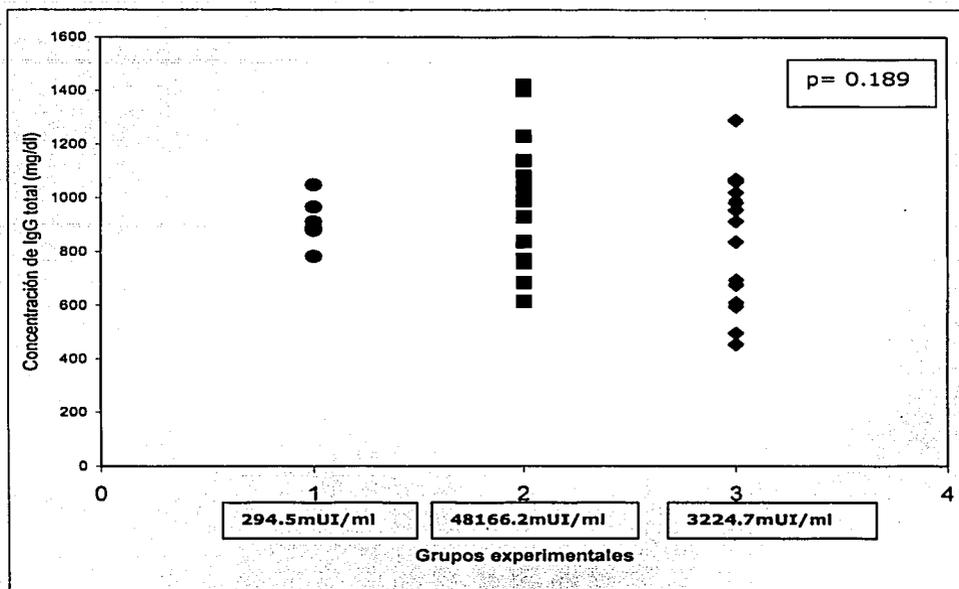


*Gráfica 3.- Interacciones idiotipo-anti-idiotipo (DO 490nm) entre las IgG séricas de cada grupo experimental y la fracción total de fragmentos  $F(ab')_2$ . Se muestran los valores valor promedio de anticuerpos anti-HAV, para cada grupo al momento del análisis de conectividad idiotípica.*

#### **6.4 Análisis de la concentración total de IgG entre los grupos experimentales:**

Antes de continuar con los análisis posteriores, se estudió la posibilidad de encontrar diferencias en la conectividad idiotípica, debidas a la variaciones en la concentración total de IgG en el suero de cada individuo.

Para ello, comparamos la concentración total de IgG entre cada grupo por ANOVA. La gráfica 4 muestra que las concentraciones para cada grupo son homogéneas ( $p = 0.189$ ).



Gráfica 4.- Comparación de las concentraciones totales de IgG en el suero de los individuos, con diferente respuesta a una vacuna contra Hepatitis A. Se muestran los valores promedio de anticuerpos anti-HAV, para cada grupo al momento del análisis de conectividad idiotípica.

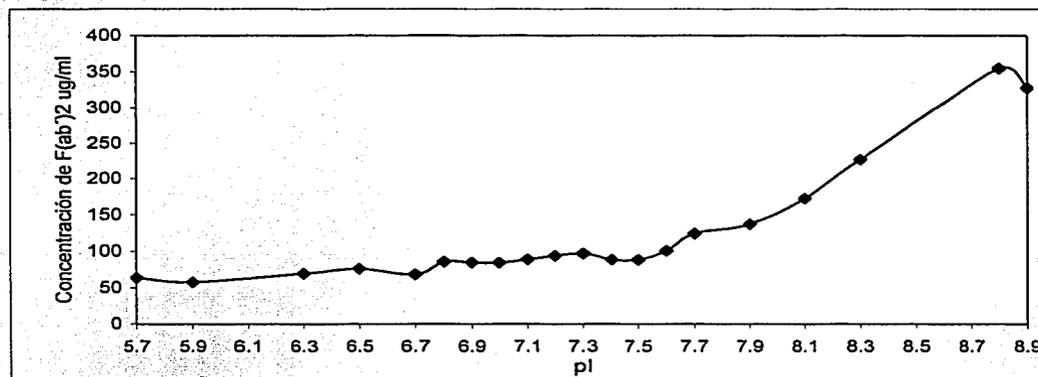
### 6.5 Diferencias significativas en los patrones de conectividad idiotípica entre los grupos experimentales.

Como se menciona anteriormente, la determinación de la reactividad contra una fracción compuesta por la totalidad de posibles especificidades, es sólo un análisis preliminar para describir la conectividad de los grupos. Por lo tanto, para obtener un esquema más sólido de comparación, se construyó un patrón de conectividad idiotípica para cada individuo, utilizando veinte diferentes subfracciones de fragmentos  $F(ab')_2$ , obtenidas a partir del IEF. Estas fracciones son equivalentes a veinte grupos de especificidades diferentes a nivel del idiotipo, ya que debido a la estructura de un fragmento  $F(ab')_2$ , la separación por punto isoeléctrico depende mayoritariamente de las regiones variables e hipervariables de dicho fragmento de

anticuerpo, es decir, los diferentes puntos isoelectricos están determinados básicamente por los idiotipos.

El IEF utilizando el sistema *Rotofor*, nos permitió obtener veinte diferentes subfracciones de fragmentos  $F(ab')_2$  compuestas por distintos idiotipos, a partir de una mezcla ampliamente heterogénea de inmunoglobulinas previamente digeridas, aunado a esto, esta metodología nos permitió también, separar y recuperar una cantidad significativa de proteína (aproximadamente 2.5 mg), con la cual fue posible llevar a cabo los análisis de conectividad idiotípica correspondientes.

El gradiente de pH obtenido en este isoelectroenfoque, mostró ser significativamente homogéneo ya que no existe variación mayor o menor a 0.2 de unidad de pH entre cada fracción). Finalmente, como era de esperarse, el IEF produjo fracciones con diferentes puntos isoelectricos (pI) y con diferentes concentraciones de proteína (grafica 5).



Gráfica 5.- Relación entre los valores de pI y la concentración de total de IgG obtenida en cada fracción después del IEF

A partir de las mediciones de la reactividad de cada suero contra las fracciones separadas por IEF, se construyeron los patrones de conectividad idiotípica correspondientes. La gráfica 6 muestra los patrones de conectividad idiotípica de cada grupo de individuos con diferente respuesta a la vacuna.

Los patrones de conectividad de los grupos 1 y 3 muestran una aparente tendencia hacia valores de densidad óptica (490 nm) mayores, esta tendencia es especialmente significativa entre los grupos 2 y 3. Al comparar, en conjunto, los patrones de

conectividad de cada individuo es posible advertir posibles diferencias entre los mismos; sin embargo, esta situación se observa más claramente al graficar los patrones de conectividad promedio para cada grupo (gráfica 7).

A partir de las gráficas que se muestran en las figuras 5 y 6 no es posible establecer si las aparentes diferencias entre cada grupo son estadísticamente significativas. Por lo tanto, se realizó un análisis de función discriminante, utilizando los valores de densidad óptica obtenidos de los ensayos de ELISA, con el objetivo de determinar las fracciones de fragmentos  $F(ab')_2$  que permitan establecer la mejor discriminación entre los grupos experimentales.

La gráfica 8 muestra la localización de los 36 individuos analizados, con respecto a dos funciones discriminantes canónicas necesarias para discriminar entre los tres grupos experimentales.

$$X: F_1 = \sum_{n=1}^{20} (C_n DO_n)$$

$$Y: F_2 = \sum_{n=1}^{20} (C'_n DO_n)$$

C: coeficiente canónico estándar.

n: 20

DO: valor de densidad óptica.

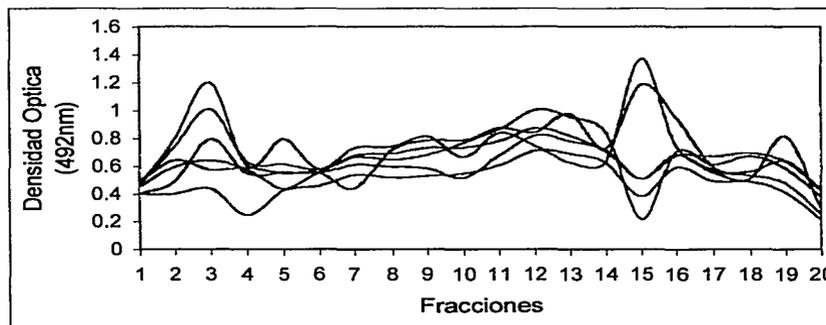
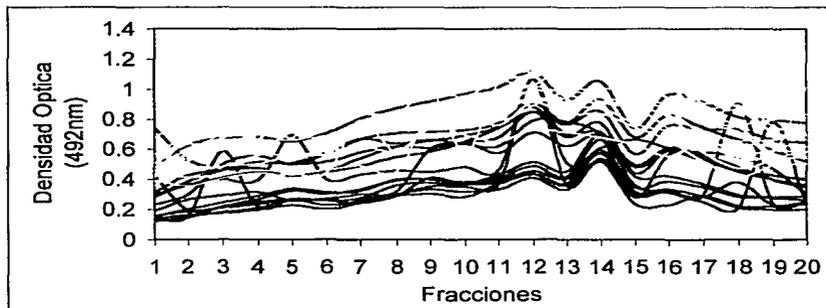
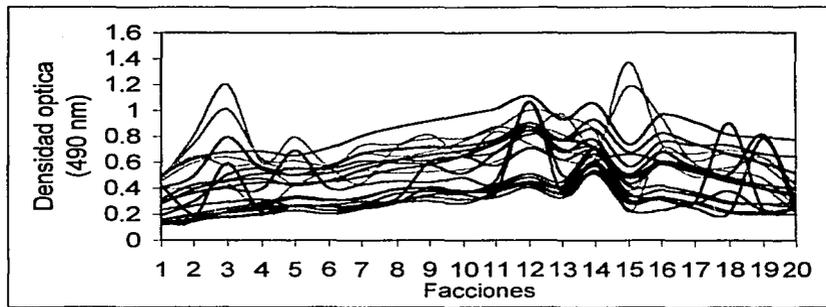
Como podemos observar, el análisis permite una discriminación estadísticamente significativa entre los grupos ( $\Lambda$  Wilks' = 0.00789,  $p < 0.0001$ ). Estos ensayos de ELISA reportaron valores control para pegado inespecífico significativamente bajos.

Se calcularon los coeficientes canónicos estándar de cada fracción con el objeto de seleccionar las fracciones que diferencian más claramente los patrones de conectividad de cada grupo (ver tabla 4 y gráfica 9). Esta selección nos permite probar, por medio de un análisis de varianza multivariado (MANOVA), las diferencias de conectividad observadas, considerando únicamente, las fracciones que hacen mayor diferencia entre los grupos. El resultado de esta prueba nos permite concluir que las diferencias en los patrones de conectividad observadas a partir del análisis de función discriminante son estadísticamente significativas con respecto a las 8 fracciones que mejor discriminan entre los grupos ( $\Lambda$  Wilks' = 0.0349,

$p < 0.0000001$ ), tomando en cuenta todos estos resultados podemos indicar que existen diferencias significativas en los patrones de conectividad idiotípica de los individuos con diferente respuesta a la inmunización contra hepatitis A 30 días después de recibir la primera dosis de vacuna.

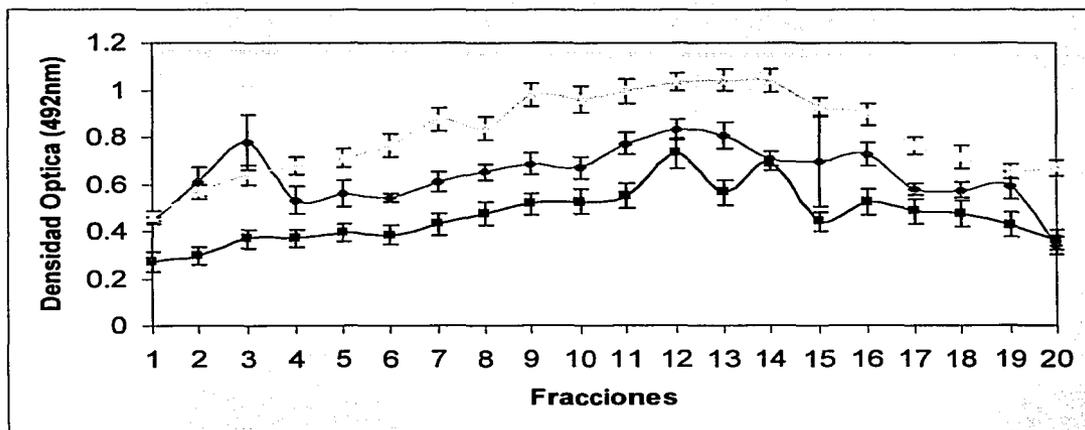
<b>Fracción</b>	<b>Función #1 (eje x)</b>	<b>Función #2 (eje y)</b>
<u>1</u>	-0.8464	1.80157
<u>2</u>	-1.58024	-2.16225
<u>3</u>	-0.37101	-1.00537
<u>4</u>	-0.78881	2.94725
<u>5</u>	0.66654	-0.13005
<u>6</u>	4.19298	-181974
<u>7</u>	-0.5934	1.74582
<u>8</u>	-1.49221	-0.76451
<u>9</u>	1.23185	-1.12095
<u>10</u>	0.3106	0.8795
<u>11</u>	-0.37819	1.33624
<u>12</u>	-0.8687	0.33990
<u>13</u>	4.81826	-4.57133
<u>14</u>	-2.32902	2.69908
<u>15</u>	2.50396	-0.25876
<u>16</u>	-6.85117	2.33052
<u>17</u>	1.48192	-0.55056
<u>18</u>	-0.28374	-0.18606
<u>19</u>	0.57783	-1.49956
<u>20</u>	0.85538	0.29049

*Tabla 4.- Coeficientes canónicos estándar para cada una de las funciones discriminantes y para cada fracción separada por IEF, (se subrayan las fracciones con mas alto coeficiente en valor absoluto y que diferencian claramente los patrones de conectividad idiotípica).*



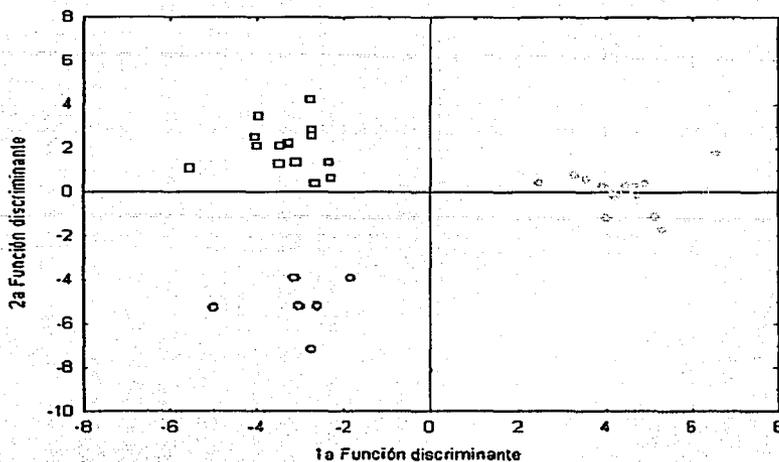
■ Grupo 1: 294.5mUI/ml ■ Grupo 2: 48166.2mUI/ml □ Grupo 3 3224.7mUI/ml

*Gráfica 6 .- Comparación de los patrones de conectividad idiotípica de las inmunoglobulinas séricas de cada grupo de individuos con diferente respuesta a la inmunización contra Hepatitis. La gráfica superior muestra la comparación entre los grupos 1 y 2; la gráfica intermedia muestra la comparación entre los grupos 2 y 3; la gráfica inferior muestra la comparación entre los grupos 1 y 3. Se muestran los valores promedio de anticuerpos anti-HAV, para cada grupo al momento del análisis de conectividad idiotípica.*

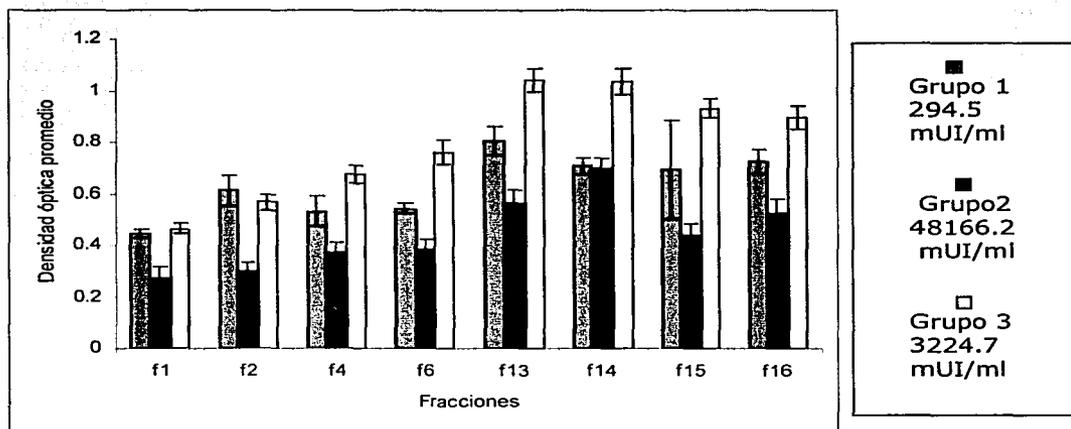


■ Grupo 1: 294.5mUI/ml ■ Grupo 2: 48166.2mUI/ml □ Grupo 3: 3224.7mUI/ml

Gráfica 7.- Comparación de los patrones de conectividad idiotípica de cada grupo, considerando el valor de reactividad promedio obtenido para cada fracción. Las percentilas muestran los valores de error estándar de la media. Valor promedio de los controles de pegado inespecífico considerados: 0.02275. Se muestran los valores promedio de anticuerpos anti-HAV, para cada grupo al momento del análisis de conectividad idiotípica (30 días después de la primera dosis).



Gráfica 8.- Localización de cada uno de los individuos ( $n=36$ ) analizado con relación a las dos funciones discriminantes utilizadas,  $\Lambda$  Wilks' = 0.00789,  $p < 0.0001$ .



Gráfica 9.- Promedio del valor de densidad óptica de cada individuo para las 8 fracciones de punto isoeléctrico que diferencian más claramente los patrones de conectividad de cada grupo experimental. Grupo1(azul), grupo 2(rojo), grupo 3(amarillo).  $\Lambda$  Wilks' = 0.0349,  $p < 0.0000001$ . Las percentilas muestran el error estándar de la media.

## VII. DISCUSION

Uno de los principios fundamentales del sistema inmune es la habilidad de sus componentes para reconocer constituyentes propios (Avrameas, 1991). Cada día es más claro que la existencia de moléculas que expresan autorreactividades y su participación como parte de la fisiología inmune, es un evento normal entre los elementos que conforman la respuesta inmune.

La concepción clásica (clonal) del sistema, junto con la participación de la red idiotípica han resultado en la consideración de dos mecanismos independientes de organización: uno encargado de la respuesta contra antígenos externos y dependiente de los procesos de selección, activación y expansión clonal (redes funcionales), junto con otro encargado del reconocimiento de lo propio, la selección de repertorios y el establecimiento de la tolerancia, asociado al conjunto de autorreactividades normales y operado por de la redes idiotípicas reguladoras (Coutinho, 1989).

Evidentemente, el establecimiento de las fronteras entre cada uno de estos niveles de organización, depende del estudio detallado de las propiedades de cada componente y con relación a la red idiotípica, una de estas propiedades centrales es la conectividad. Esta propiedad básica de la red está definida por la configuración de las interacciones normales entre los elementos propios del sistema inmune, en particular, a través de los idiotipos.

En este trabajo, se definieron y compararon los patrones de conectividad idiotípica de 36 individuos vacunados contra hepatitis A, que mostraron claras diferencias en la concentración de anticuerpos específicos contra antígenos del virus, a lo largo del esquema de vacunación (ver grafica 1 y 2). Estos individuos fueron seleccionados a partir de un estudio de campo, previamente realizado en nuestro laboratorio, para determinar la concentración de IgG específica contra el virus.

Se establecieron 3 grupos experimentales, considerando los cambios en la concentración de IgG específica en el suero durante todo el esquema de vacunación (ver sección 5.2). Durante la selección se consideraron únicamente aquellos individuos que mostraron concentraciones basales de anticuerpos anti-HAV iguales o menores a 20mUI/ml (valor internacional de seroconversión, (Feinstone et al., 1999)), ya que para poder establecer un patrón de conectividad idiotípica confiable, es importante

considerar sólo aquellos individuos que no muestren signos de haber estado en contacto con el virus antes de ser vacunados ya que esta situación podría alterar la historia inmunológica del paciente, por ejemplo, desencadenando los procesos de adquisición de memoria, modificando también el estado de la conectividad idiotípica presente en ese momento. No se han reportado pruebas que indiquen cambios en la conectividad a causa de la hepatitis A, sin embargo, se sabe que la infección por VIH-1 genera importantes cambios en los patrones de conectividad de los anticuerpos con isotipo IgG e IgM (Padierna Olivos et al., 2000).

Una vez seleccionados los individuos, se utilizó una versión modificada de un método descrito previamente para establecer los patrones de conectividad correspondientes (Ayoub et al, 1997). Las principales modificaciones a la metodología original son las siguientes: la separación por IEF de la preparación de fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, se realizó en fase líquida en una cámara Rotofor (Biorad EUA), en vez de en una fase semisólida. Los ensayos de reactividad entre las fracciones descritas y las muestras séricas se realizaron a través de un inmuno-ensayo enzimático y no por Western Blot. La desventaja más importante de esta metodología, es la capacidad para obtener sólo 20 diferentes fracciones de fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, ya que esta situación restringe los ensayos de conectividad a solo 20 posibles grupos de idiotipos. Esta es la principal limitación de la metodología empleada en el presente trabajo y quizá la limitante principal para cualquier ensayo de conectividad idiotípica. La robustez de este tipo de análisis depende de la consideración de un número muy grande de diferentes idiotipos, la variabilidad del repertorio de anticuerpos es, de por lo menos  $1 \times 10^{11}$  diferentes inmunoglobulinas (Jeřaway, 2001) y aunque existen mecanismos (i.e. delección clonal) que reducen este valor para conformar el repertorio disponible durante una respuesta, cualquier diseño experimental encaminado a medir la conectividad idiotípica por medios serológicos necesita incluir un número relevante de especificidades y esta situación es aún, metodológicamente, imposible.

Utilizando la separación por IEF en fase semisólida es posible obtener un número de mayor fracciones con diferentes especificidades; sin embargo, este análisis es también limitado si consideramos la inmensa variabilidad del repertorio.

Contemplando las limitaciones de las metodologías disponibles para medir la conectividad idiotípica, y en particular, considerando que el análisis estadístico

presentado, nos muestra que aún con aproximadamente la mitad de las fracciones, es posible discriminar entre los patrones de conectividad de cada grupo, no hay razón para pensar que estas modificaciones puedan alterar las conclusiones de este análisis. Además, una ventaja del sistema *Rotofor* es que nos permite separar una mayor cantidad de proteína para utilizarse posteriormente, lo que incrementa la reproducibilidad inter-ensayos y favorece el análisis. (Pacheco García et al., 1999). Otro factor que incrementa la confiabilidad del ensayo de conectividad es el uso de una mezcla altamente heterogénea de inmunoglobulinas como fuente de idiotipos durante los ensayos de ELISA; en este caso particular se utilizó preparación pura de IgG de administración intramuscular (Beriglobina P, Aventis Pasteur), proveniente de donadores sanos. Esta preparación policlonal nos asegura un amplio contenido de distintos idiotipos en cada una de las fracciones de isoelectroenfoque y, por lo tanto, nos permite establecer, con mayor confiabilidad, los patrones de conectividad de cada individuo estudiado.

Como un primer intento para caracterizar la conectividad idiotípica se analizó la reactividad de cada individuo contra una fracción total de fragmentos F(ab'), (ver gráfica 3). El resultado de la comparación entre los tres grupos a partir de la conectividad contra dicha fracción, nos demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p= 0.233$ ).

Es muy importante comentar que esta aseveración es poco confiable ya que los valores de densidad óptica obtenidos a través del ensayo de ELISA, son considerablemente bajos para establecer un análisis contundente. Este bajo nivel de reactividad entre los sueros y la fracción que posee un grupo ampliamente heterogeneo de idiotipos puede atribuirse a un enmascaramiento de la autoreactividad de los anticuerpos anti-idiotipo presentes en el suero de los individuos estudiados (Mouthon et al., 1995). No obstante, creemos que la información que nos aporta esta observación es útil como un acercamiento preliminar a la conectividad entre los grupos.

Una variable importante durante los análisis de conectividad, es la concentración de IgG en la muestra de cada individuo y las fracciones de fragmentos de inmunoglobulina. Para evitar observar cambios en los patrones de conectividad

debidos a las concentraciones, todas las muestras serológicas se ajustaron a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  y las concentraciones de cada una de las fracciones de fragmentos  $F(ab')_2$  a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  antes de desarrollar los experimentos de conectividad. No obstante, con el objeto de conocer si las concentraciones séricas de IgG son homogéneas, se analizó si existirán diferencias significativas a través de un análisis de varianza (ver grafica 4). Esta prueba nos mostró que las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas y por lo tanto podemos concluir que la distribución de concentraciones entre los tres grupos es homogénea ( $p=0.189$ ). Con el objeto de establecer un análisis de conectividad más fino, se construyeron los patrones de conectividad idiotípica para cada individuo, a través de la medición de la reactividad del suero contra veinte diferentes fracciones de fragmentos  $F(ab')_2$  obtenidos por IEF. Estas fracciones están caracterizadas por poseer un punto isoeléctrico dentro de un intervalo de 5.7 a 8.9, con una variación constante entre unidades de 0.2, por ejemplo: si una fracción tiene un pI de 6.5, esta incluye los fragmentos  $F(ab')_2$  con pI de 6.4-6.5-6.6 (ver grafica 5). Es importante mencionar que el gradiente de pH obtenido para la separación de los fragmentos  $F(ab')_2$  del presente trabajo, es significativamente homogéneo lo que nos indica que la separación se llevo a cabo con una concentración de proteína adecuada y en condiciones satisfactorias.

Como ya hemos mencionado, cada una de las fracciones representa un conjunto muy diverso de diferentes idiotipos ya que las posibles variaciones de pI en los fragmentos  $F(ab')_2$  depende básicamente de la región hipervariable del anticuerpo (Ayoub, 1996).

Como era de esperarse, la separación por IEF nos produjo fracciones con diferentes concentraciones de fragmentos  $F(ab')_2$ ; la gráfica 5 muestra la distribución de dichas concentraciones entre las 20 fracciones obtenidas. Al parecer las fracciones con pI cercanos al fisiológico son las de mayor concentración.

A partir de los ensayos de ELISA utilizando cada una de las diferentes fracciones de pI, se construyeron los patrones de conectividad idiotípica de cada individuo. La gráfica 6 muestra la comparación de los patrones de conectividad de los individuos de cada grupo. En este caso es posible observar que los patrones de conectividad idiotípica del grupo que desarrollo una respuesta de anticuerpos específicos contra HAV lenta durante el esquema de vacunación (gpo 1), junto con el grupo que mostró

un aumento constante en las concentraciones de IgG anti-HAV (gpo 3) revelan una tendencia hacia valores de densidades ópticas superiores (420 nm). A partir de dicha representación grafica es posible advertir ciertas diferencias en los patrones de conectividad. Esta tendencia se observa más claramente en la grafica 7, la cual representa los patrones de conectividad idiotípica promedio.

Estos resultados demuestran que existe una alteración en la conectividad de las IgG y, en consecuencia, una desviación importante de la autorreactividad fisiológica como se ha reportado para algunas enfermedades autoinmunes y, en particular, durante la infección por VIH-1 (Padierna Olivos et al., 2000).

Para establecer si las diferencias en los patrones de conectividad idiotípica, observadas entre los individuos con diferente respuesta inmune a la vacuna contra hepatitis A, son estadísticamente significativas, se aplicó una análisis de función discriminante.

Esta prueba estadística tiene como objetivo establecer qué tan fácil es discriminar entre varios grupos de individuos, cuando existen diferentes variables medidas para cada uno (Manly, et al 1997), por lo tanto, es muy útil en la determinación de las diferencias entre los patrones de conectividad, ya que éstos se construyen a través de la medición de varias variables para cada individuo analizado (en este caso, la DO de cada una de las veinte fracciones obtenidas por IEF).

Se puede observar que el análisis de función discriminante diferencia muy claramente los patrones de conectividad idiotípica de cada grupo experimental ( $\Lambda$  Wilks' = 0.00789,  $p < 0.0001$ ). La gráfica 8 muestra la localización de cada individuo con respecto a las dos funciones necesarias para establecer la correspondiente discriminación y, como puede notarse, no existe traslape alguno entre los grupos experimentales, por lo tanto las diferencias de conectividad son significativas.

A través del calcularon los coeficientes canónicos estándar de cada fracción, utilizando las funciones discriminantes previamente establecidas, para definir cuántas y cuales fracciones de pI, hacen mayor diferencia entre los individuos. En este caso se encontraron 8 fracciones con dichas características.

La tabla 4 muestra los coeficientes correspondientes para cada fracción de pI junto con las fracciones que diferencian más claramente los patrones de conectividad de cada grupo.

Con el objeto de observar más claramente las diferencias en los patrones de conectividad idiotípica, entre los grupos con diferente respuesta inmune a la vacuna, se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA). Esta prueba demuestra que las diferencias globales en los patrones de conectividad idiotípica son estadísticamente significativas con relación a las 8 fracciones descritas. ( $\Lambda$  Wilks' = 0.0349,  $p < 0.0000001$ ). En la gráfica 9 se muestra una comparación de los valores de reactividad (DO promedio de todos los individuos de cada fracción). Es posible observar que existen diferencias entre los tres grupos en la mayoría de las fracciones, no obstante, para la fracciones 1 y 2 no existen diferencias entre los grupos experimentales 1 y 3; sin embargo, para la fracción 14 no se observan diferencias entre los grupos 1 y 2.

Por ultimo, es importante mencionar que los resultados presentes se limitan al estado de la conectividad de los individuos 30 días después de recibir la primera inyección de la vacuna y antes de la aplicación del refuerzo, ya que, como se sabe, la conectividad es una propiedad dinámica que depende del tiempo y la situación inmunológica del individuo (Pacheco García et al., 1999). Este análisis preliminar, forma parte de un proyecto más grande diseñado para establecer las diferencias en la conectividad de estos individuos a lo largo de todo el esquema de vacunación.

Nuestro objetivo general fue analizar si las diferencias en la respuesta humoral, en particular en la síntesis de anticuerpos, presentes en individuos que fueron inmunizados contra hepatitis A, treinta días después de recibir la primera dosis de vacuna, implican cambios en la composición de las interacciones idiotipo-anti-idiotipo, y por lo tanto, reflejan cambios en, los patrones de conectividad idiotípica, en dicho momento.

Nuestros análisis demuestran que los patrones de conectividad idiotípica de individuos con diferente respuesta a una inmunización contra hepatitis A y en particular, los que muestran una respuesta poco o muy activa (grupos 1 y 3, respectivamente) en comparación con los que desarrollaron una respuesta cercana a la normalidad (grupo 2) difieren significativamente ( $\Lambda$  Wilks' = 0.00789,  $p < 0.0001$ ).

Los resultados del presente trabajo son congruentes con la teoría. Se sabe que la respuesta inmune humoral contra el virus de la hepatitis A tiene una participación importante (Fenistone, 1999) y junto a esto, la respuesta que se induce al administrar

la vacuna tiene como objetivo la estimulación de anticuerpos capaces de neutralizar al virus. Por estas razones, es lógico pensar que las variaciones en la respuesta a la vacuna contra el virus de la hepatitis A, puedan depender de los cambios en la composición del repertorio normal de anticuerpos anti-idiotipo y, en consecuencia, reflejar una variación en el estado normal de conectividad idiotípica.

Es necesario estudiar más a fondo las causas que generan los cambios observados en la producción de anticuerpos durante la administración de una vacuna, sin embargo, si consideramos que la respuesta inmune humoral esta influenciada por los mecanismos de selección del repertorio, los fenómenos reguladores dependientes de las interacciones intercelulares y la de los factores que determinan la memoria inmunológica (fenómenos en los cuales la actividad de la red es preponderante, Coutinho, 1989) es posible pensar que la respuesta durante una inmunización dependa de las interacciones idiotipo-anti-idiotipo explicadas por la Teoría de la red idiotípica.

En el contexto de la existencia de dos elementos de organización del sistema inmune, el primero a través de "la red idiotípica" (compuesto por el conjunto de linfocitos conectado entre sí y a cargo de la regulación, selección y reconocimiento de lo propio) y el segundo compuesto por la actividad clonal del sistema ("linfocitos desconectados"), se ha considerado que la respuesta inmune contra antígenos externos es una actividad básicamente dependiente de este último elemento de organización (Coutinho, 1989)

Las implicaciones del presente trabajo, además de aquellas evidencias obtenidas por los grupos que han llevado a cabo proyectos de conectividad realizados con individuos sanos y e infectados por VIH-1, *Mycobacterium tuberculosis* y *leprae* (Padierna Olivos et al., 2000, Tovar Rivera et al., 2001), favorecen dicha visión de la organización dual del sistema, sin embargo, también ponen de manifiesto; el traslape de las funciones de cada elemento, durante la respuesta inmune.

## VIII. CONCLUSIONES.

- Cuando se analiza la conectividad a través de la medición de la reactividad en el suero contra una mezcla total, altamente heterogénea, de fragmentos  $F(ab')_2$  de IgG, los individuos que desarrollan tres diferentes respuestas humorales, treinta días después de la aplicación de la primera dosis de vacuna contra hepatitis A, no presentan diferencias estadísticamente significativas de conectividad idiotípica.
- Cuando se analiza la conectividad a través de la medición de la reactividad en el suero contra una mezcla de fragmentos  $F(ab')_2$ , separada en veinte diferentes fracciones de pI, para formar un patrón de conectividad, los individuos que desarrollan tres diferentes respuestas humorales, muestran diferencias estadísticamente significativas en sus perfiles de conectividad idiotípica al comparar dichos patrones.
- Las variaciones en la magnitud y el tiempo de la respuesta humoral, a causa de la administración de una vacuna contra el virus de la hepatitis A, pueden explicarse por cambios en la composición de las interacciones idiotipo, anti-idiotipo reflejadas a su vez, en cambios en la conectividad idiotípica de las inmunoglobulinas séricas de cada individuo inmunizado.
- Se sugiere la participación de la red idiotípica como mecanismo de control de la respuesta humoral durante la vacunación contra hepatitis A.

## IX REFERENCIAS

- Ada, G. (1999). *Immunology of vaccination*, en Plotkin, S.A. y Orenstaein. A.W. Vaccines. 3a ed. Saunders. EUA. 14-40pp.
- Adib, M et al. (1990). *IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM*. J. Immunol. 145, 3795.
- Anderson, L et al (1976). Specific unresponsiveness to transplantation antigens induced by autoimmunization with syngeneic antigen-specific T lymphoblasts. Nature. 264:778-780pp.
- Avrameas, S. (1991). *Natural Antibodies: from "Horror Autotoxicus" to gnothi seauton"*. Immunol Today (hoy Trends in Immunol)12:5.154-159pp.
- Ayouba, A et al. (1997). *Distinguishable patterns of connectivity in serum immunoglobulins from SLE patients and healthy individuals*. Scand. J of Immunol. 45:408-416pp.
- Braden, B.C et al. (1996). *Crystal structure of an Fv-Fv idiotope-anti-idiotope complex at 1.9 Å resolution*. J Mol Biol. 22: 264(1).137-51pp
- Brenner, S., Milstein, C. (1966). Nature. 211 :242pp.
- Burnet F. M., Fenner, F. (1949). The production of Antibodies. 2a ed. Australia.
- Burnet M.F. (1957). *A modification of Jerne's Theory of antibody production*. Aust, J, Sci. 20:67-73pp.
- Burnet, F.M. (1966). Nature. 210 :1308pp.
- Carlsson, A et al. (1989). *V-region connectivity correlates with limited N-region diversity and germ line V-gene expression*.
- Cazenave, P.A. (1973). *L'idiotypie comparées anticorps qui, dans le sérum d'un lapin immunisé contre la sérumalbumine humaine, sont dirigés contre des régions différentes de cet antigène*. FEBS letters 31.348pp.
- Cazenave, P.A. (1977). *Idiotypic and anti-idiotypic regulation of antibody synthesis in rabbits*. PNAS.74;5122-5125pp
- Cazenave, P.A., Oudin, J. (1973). *L'idiotypie comparées anticorps qui, dans le sérum d'un lapin immunisé contre le fibrinogène humaine, sont dirigés contre deux fragments distincts de cet antigène*. C.R. Acad. Sci (Paris), D. 276.243pp.
- Cerny, J, et al. (1982). *Immunoglobulin idiotypes expressed by T cells*. J.Exp.Med. 156 :719.730pp

- Cerny, J., Hiernaux, J.(1990). *Concept of Idiotypic Network:descriptions and functions*, en Idiotypic Network and Disease. American Society for Microbiology. EUA. 13-29pp.
- Coutinho, A et al. (1980). *The self non-self discrimination and the nature and acquisition of the antibody repertoire*. Ann. Immunol, Inst Pasteur. 131C. 235pp.
- Coutinho, A. (1989). *Beyond clonal selection and network*. Immunol Rev. 110. 63-87pp.
- Coutinho, A. (1995). *The network theory 21 years later*. Scand,J,Immunol. 42: 3-8pp.
- Daive, J.M et al. (1986). *Structural correlates of idiótopos*. Ann. Rev of Immunol. 4:147-65pp.
- Dickerman, J et al. (1981). *Loss of an individual idioype on chemical modification*. J of Exp. Med. 153: 1273pp.
- Dighiero, G et al. (1983) *Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens*. J. Immunol. 131: 2267pp.
- Eichmann, K et al. (1978). *Recognition of idiotypes in lymphocyte interactions. Antigen dependent cooperation between T and B lymphocytes that possess similar and complementary idiotypes*. Eur. J. Immunol. 26:195-224pp.
- Fenistone, M.S. (1999). *Hepatitis A vaccine*, en Plotkin, S.A. y Orenstaein. A.W. Vaccines. 3a ed. Sounders. EUA. 14-40pp.
- Fraucotte, M. (1984). *Induction of anti-tobacco mosaic virus antibodies in mice by rabbit anti.Idiotypic antibodies*. J.Exp.Med 160:1485-1494pp.
- Freitas, A.A et al. (1991). *Normal serum Ig participate in the selection of periferial B-cel repertotires*. PNAS. 88: 5640-5644pp.
- Gally, J.A., Edelman, G.M. (1970). Nature. 227:341pp.
- Gaulton, G.N., Weiner (1990). *Viral infections*, en Idiotypic Network and Disease. American Society for Microbiology. EUA. 31-68.pp.
- Gowans JL., Knight EJ. (1964) *The route of recirculation of lymphocytes in the rat*. Proc R Soc Lond [Biol] 159:257-282.
- Hiernaux, J et al. (1981). *Neonatal treatment with low doses of anti-idiotypic antibody leads to expression of a silent clone*. J.Exp.Med. 153:1004-08pp.
- Hiernaux, J., Bona, C. (1980). *Immune Network*, en Bona, C et al. Lymphocytic regulation by Antibody. EUA 269-297pp.

- Hilschmann N., Craig LC. (1965). *Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins*. PNAS. 53:1403-1409pp.
- Hoffman, G.W. (1975) *A theory of regulation and self-nonself discrimination in an Immune network*. Eur. J Immunol. 5:638-647pp.
- Holmberg, D et al. (1984). *Reactions amongst IgM antibodies derived from neonatal mice*. Eur. J. Immunol. 17. 399.
- Holmberg, D et al. (1986). *The high idiotypic connectivity of "natural" newborn antibodies is not found in adult, mitogen-reactive B cell repertoire*. Eur. J. Immunol. 16. 82pp.
- Huetz, K et al. (1989). *Ontogenic development of auto-antibody repertoires in spleen and peritoneal cavity of normal mice*. Eur. J. Immunol. 24. 237-239pp.
- Ibarra, M.Z et al. (1988). *IgG, IgM autoanti-idiotypes against antibody to HBaAg in chronic Hepatitis B*. Hepatology. 8:775-780pp.
- Iverson, G.M., Dresser, D. W. (1970). *Immunological paralysis induced by anti-idiotypic antibody*. Nature.227;274pp.
- Janeway, C. et al. (2001). Immunobiology. 5a ed. Garland. EUA. 732p.
- Jerne, K.N. (1955). *The Natural-Selection Theory of Antibody Formation*. PNAS. 41, 849,857pp.
- Jerne, K.N. (1971). *The somatic generation of immune recognition*. Eur, J, Immunol. 1:1-9pp.
- Jerne, K.N. (1972). *What precedes clonal selection?*. CIBA foundation Symposium Amsterdam assoc Scie Pub. 1-5pp.
- Jerne, K.N. (1974). *Towards a network theory of the immune system*. Ann, Immunol (Pasteur). 125C:373-389pp.
- Kaufman, M. J. et al (1985). *Toward s a logical analysis of the immune response*. J of Theor. Biol.114:527-561pp.
- Kaushik, M et al (2001). *Idiotypic-antiidiotypic B cell interactions generated against protective antigen of a morbillivirus in mice*. Cell Immunol. 10:209.1.10-8pp.
- Kennedy, R.C et al (1984). *Antibody to hepatitis B virus induced by ingesting antibodies to the idio type*. Science. 223:930-931pp.
- Kennedy, R.C et al. (1983). *Common idiotypic determinant associated with human antibodies with hepatitis surface antigens*. J Immunol. 130: 385-389pp.
- Kimura, H et al (1982), *Anti-idiotypic cytotoxic T cells in rats with graft versus-host disease*. Nature.308: 463-464pp.

Kleuskens, F et al. (1974). *Regulation of immune response by autogenous antibody against receptors*. PNAS. 71: 5083pp.

Lacroix, S et al (1998). Self reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. J, Immuno, Met. 117-137pp.

Laemli, (1970). Nature 227,680

Lamoyl, E. y Nissonof, A. et al (1982). *Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments from mouse IgG of various subclasses*. J. Immunol Met. 56:235-243.

Landsteiner, K. (1945). *The specificity of serological reactions*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Léderberg, J.(1959). Science. 129:1649pp.

Lewis, G, K et al. (1978). *Purification of functional determinant specific idiotypic-bearing murine T cells*. J. Exp. Med. 148:915-924pp.

Liu, Y. N et al. (1981). *Idiotypic of clonal responsiveness to influenza virus hemagglutinin*. J. Exp. Med. 154: 1523-1538.

Lundkvist G. et al. (1989). *Evidence for a functional network amongst natural antibodies in mice*. PNAS.

Mage, R.G. (1973). *Altered quantitative expression of immunoglobulin allotypes in the rabbit*. Curr Top Microbiol. Immunol. 251:54-62pp.

Manjula, B. N et al.(1976). *Subunit interaction in mouse myeloma protein with anti-galactin activity*. PNAS. 73:932pp.

Manly, F.J. B. (1994). *Multivariate Statistical Methods*. 2 ed. Chapman and Hall.

Marchalonis et al. (1992). *Human autoantibodies reactive with synthetic autoantigens from T cell receptor beta chain*. PNAS. 89:3325pp.

Marchalonis et al. (1994). *Natural occurring human autoantibodies to defined T cell receptor and light chain peptides*. Adv. Exp. Med. Biol. 347:135pp.

Mazumdar, H.P. (1989). *Working out a theory*, en Mazumdar, H.P Immunology 1930-1980. Canada. 1-13pp.

McNamara, M., Kohler, H. (1984). *Regulatory idiotypes*. J.Exp.Med. 159:623-628.

Milstein C. (1975). *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature. 7;256(5517):495-7pp.

Moser, J et al. (1983). *Induction of silent idiotypes in BALB/c mice*. Ann N Y Acad Sci. 418:257-64pp.

- Mouthon, L. et al. (1995). *Invariance and restriction towards a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires in healthy adults*. J. Immunol. 154: 5769pp.
- Nossal, G.J.V., Lederberg, J. (1958). Nature 181, 1419pp.
- Novotny, J. M et al. (1986). Location of antigenic epitopes on antibody molecules. J. Mol. Biol. 189: 715-721.
- Oudin, J., Cazenave, P.A. (1971). *Similar idiotypic specificities in immunoglobuline fractions with different antibody functions or even without detectable antibody function*. PNAS. 68:2616pp.
- Páchecho García, U et al. (1999). *Altered pattern of connectivity in serum immunoglobulins from pemphigus vulgaris patients*. Scand. J. Immunol. 49:424-430pp.
- Padierna Olivos, et al. (2000). *Connectivity and VIH-1 infection: role of CD4 T-cell counts and VIH-1 copy number*. Scand J. Immunol 52. 1-11.
- Paul, W., Bona, C. (1982). Regulatory Idiotypes and immune networks: a hipótesis. Immunol today (hoy Trends in Immunol). 3. 230pp.
- Pauling, L.J. (1940). J. Am. Chem Soc. 62,2643pp.
- Pollok, B et al. (1982). *Structural and biological properties of a monoclonal auto-anti(anti.idiotype) antibody*. Nature. 299:447-449pp.
- Previsani, N et al. (2000). *Hepatitis A*. Reporte de la OMS. Department of Comunicable Diseases and Surveillance. OMS.
- Reth, M et al. (1979). *Analysis of the repertoire of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenil acetyl) antibodies in C57BL/6 mice by cell infusion*. Eur. J. Immunol. 9: 1004pp.
- Rossi, et al. (1989). *Anti-idiotypes against autoantibodies in pooled normal human polyespecific Ig*. J. Immunol 143, 4104pp.
- Schreiber, A.B et al. (1980). *Anti-aloprenolol anti-idiotypic antibodies bind beta-adrenergic receptors and modulate catecholamine-sensitive adenylate cyclase*. PNAS. 77. 7385pp.
- Seferian, P.G., Rodkey, L.S. (1994). *Antibody synthesis induced by endogenous internal images*. Appl. Biochem. Biotechnol. 47:2-3. 213.26pp.
- Sege, K., Peterson, P.A. (1980). *Use of anti-idiotypic antibodies as cell surface receptor probes*. PNAS. 75:2443pp.
- Silverstain, A.M. (1999). *The history of Immunology*, en Paul, W. Fundamental Immunology. 4a ed. Lippincot-raven. EUA. 19-37pp.

- Skansen, S.U et al. (1994). *Lymphokine production induced by streptococcal pyrogenic exotoxine-A is selectively down-regulated by pooled human IgG*. Eur. J. Immunol. 24:916-922.
- Sundblad, A et al. (1991). *Normal serum Immunoglobulines influence the numbers of bone marrow pre-B and B cells*. Eur. J. Immunol. 21: 1155-1161pp.
- Talmage D.W. (1957). *Is that Theory Necessary?*, en Mazumdar, H.P Immunology 1930-1980. Canada. 1-13pp.
- Tanaka. J. (2000). *Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America*. Vaccines. 18. 57-60.
- Tonegawa S. (1983). *Somatic generation of antibody diversity*. Nature. 302(5909):575-81pp
- Tovar Rivera, R.T et al. (2001). *Connectivity patterns in tuberculosis and leprosy patients are indistinguishable from that of healthy donors*. Scand, J Immunol.
- Towbin, H et al. (1979) *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some application*. PNAS 76:4350-3.
- Troisi, C. L et al. (1985). *Detection of an IgManti-idiotypic directed against HBs in hepatitis B patientes*. Hepatology. 5. 758-762pp.
- Urbain, J et al. (1979). *Synthesis of antibodies ad immunoglobulines bearing recipient allotypic markers and donor Idiotypic specificities in irradiated rabbits grafted with allogenic cells from hyperimmune donor*. Ann Immunol. Inst Pasteur. 130 C: 397-406pp.
- Urbain, J et al. (1981). *Idiotypic regulation of immune networks*. Contemp.Top.Immunol. 8:113-148pp.
- Urbain, J et al. (1983). *From clonal selection to immune networks: induction of silent clones*, en Bona, C. Immune Networks. Annals of the New York Academy of Science. 418.1-8pp.
- Urbain, J. (1979). *Idiotypic network and self-recognition in the immune system*. Ann. Inst Pasteur Immunol, C. 130. 281-288pp.
- Vakil, M et al. (1986). *Functional characterization of monoclonal auto-anti-idiotypic antibodies isolated from the early B cell repertoire of BALB/c mice*. Eur. J. Immunol. 16, 1159.
- VanAcker, A.G et al. (1979). *Synthesis of high affinity antibodies in irradiated rabbits grafted with allogenic cells from hyperimmune donors*. Ann Immunol. Inst Pasteur. 130 C: 385-396pp.

Varel, F., Coutinho, A. (1991). Second generation immune networks. *Immunol today* (hoy Trends in immunol). 12:159pp.

Vogel, M et al (2000). *Mimicry of human IgE epitopes by anti-idiotypic antibodies*. J. Mol. Biol. 19:298, 5, 729-35pp.

Whitehouse, H.L.K. (1967) *Nature* 215:341pp.

Wilson, D.B et al. (1982). *Speculations on the nature of allospecific T-cell receptors and mechanisms of tolerance to self-MHC gene products*. Behring Inst. Mitt. 70:210-212pp.

Wood, C y Tonegawa, S et al (1983). *Diversity and joining segments of mouse immunoglobulin heavy chain genes are closely linked and in the same orientation: implication for the joining* PNAS. 80:3030pp.

## X. AGRADECIMIENTOS.

El principal agradecimiento del presente trabajo es, de forma muy especial y con gran admiración a Felipe Massó y a Luis Felipe Montaña por transferirme una de las mejores herramientas disponibles; la experiencia.

Junto a esto agradezco el apoyo de todos los miembros del Departamento de Biología Celular del: Elvira, Araceli, Ema, Rebeca, Estrella, Gisela. Finalmente agradezco al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Un agradecimiento especial al M en C. Salvador Sánchez Colón por su ayuda durante el análisis estadístico del presente trabajo y a todos los sinodales por sus valiosos comentarios.

Este proyecto se realizó con apoyo del programa PAPIIT-UNAM (1N207901) y con apoyo del CONACyT (I35653-M).