

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO DE MONOS  
*AOTUS* SPP.

Julián Mauricio Cruz Castro

María José Díaz Barrera

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico

Bogotá, octubre de 2019

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO DE MONOS  
*AOTUS* SPP.

EDITH DEL CARMEN HERNÁNDEZ ROJAS

MSc. En Microbiología – Molecular

Asesora Interna

DIANA DÍAZ ARÉVALO

PhD. en Inmunología

Asesora externa

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico

Bogotá, octubre de 2019

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
<b>2.1 General</b> .....	12
<b>2.2 Específicos</b> .....	12
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	13
<b>4. MARCO TEÓRICO</b> .....	19
<b>4.1 Sistema inmunitario y Respuesta inmune</b> .....	19
<b>4.2 Células presentadoras de antígeno</b> .....	21
4.2.1 Tipos de células presentadoras de antígeno.....	23
4.2.1.1 Monocito.....	23
4.2.1.2 Células B.....	24
4.2.1.3 Células dendríticas (DCs).....	25
4.2.1.3.1 Células dendríticas convencionales (cDCs).....	27
4.2.1.3.2 Células dendríticas plasmocitoides (pDCs).....	28
<b>4.3 Captura y procesamiento del antígeno</b> .....	29
4.3.1 Captura del antígeno .....	29
<b>4.3.2 Procesamiento del antígeno</b> .....	30
4.3.2.1 Presentación a través de la vía clásica .....	31
4.3.2.2 Presentación a través de la vía no clásica (familia CD1) .....	32
<b>4.4 Aotus como modelo animal</b> .....	32
<b>4.5 Producción de anticuerpos monoclonales</b> .....	34
<b>4.6 Normatividad y condiciones éticas en murinos</b> .....	36
4.6.1 Estamentos normativos y éticos .....	38
<b>5. DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	38
<b>5.1 UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA</b> .....	38
<b>5.2 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS</b> .....	39

5.2.1 Predicción in silico de secuencias peptídicas.....	40
5.2.2 Síntesis de las secuencias peptídicas .....	41
5.2.3 Protocolo de Inmunización de ratones.....	42
5.2.4 Obtención de los esplenocitos .....	43
5.2.5 Valoración de la inmunogenicidad por ELISA .....	44
5.2.6 Producción del hibridoma.....	45
5.2.7 Obtención de células dendríticas.....	46
5.2.8 Inmunofluorescencia indirecta.....	47
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1 Predicción “in silico” .....</b>	<b>49</b>
<b>6.2 Evaluación de la inmunogenicidad de los ratones .....</b>	<b>55</b>
<b>6.3 Fusión celular .....</b>	<b>57</b>
<b>6.4 Evaluación de inmunogenicidad de los clones .....</b>	<b>58</b>
<b>6.5 Cultivo de células dendríticas.....</b>	<b>60</b>
<b>6.6 Evaluación de la afinidad de los clones frente a las células.....</b>	<b>62</b>
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>67</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>74</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE FIGURAS

Pág.

<b>Figura 1.</b> Flujograma del esquema general de procedimientos utilizados .....	40
<b>Figura 2.</b> Esquema y línea de tiempo sobre inmunizaciones, sangrías y elección de ratones aptos para sacrificio. ....	43
<b>Figura 3.</b> Predicción del fragmento extracelular mediante TMHMM con la secuencia obtenida en NCBI Protein. ....	50
<b>Figura 4.</b> Predicción del péptido señal mediante SignalP 5.0 sobre el fragmento extracelular de cada proteína. ....	51
<b>Figura 5.</b> Predicción de los epítopes B mediante IEDB sobre el fragmento extracelular libre del péptido señal de cada receptor. ....	52
<b>Figura 6.</b> Predicción de los epítopes T mediante IEDB sobre el fragmento extracelular libre del péptido señal de cada receptor. ....	53
<b>Figura 7.</b> Alineamiento entre la secuencia de interés de <i>Aotus</i> spp. versus las mismas ubicaciones en <i>Mus musculus</i> y <i>Homo sapiens</i> . ....	54
<b>Figura 8.</b> Reactividad por ELISA del suero de los ratones inmunizados con el péptido sintético de BDCA-1 (ratón 1 y 2). ....	55
<b>Figura 9.</b> Reactividad por ELISA del suero de los ratones inmunizados con el péptido sintético de CD11c (ratón 3,4 y 5). ....	56
<b>Figura 10.</b> Reactividad por ELISA del suero de los ratones inmunizados con el péptido sintético de CD103 (ratón 6,7 y 8). ....	56
<b>Figura 11.</b> Reactividad por ELISA del suero de los ratones inmunizados con el péptido sintético de CD13 (ratón 9,10 y 11). ....	57
<b>Figura 12.</b> Fotografía del cultivo de fusión celular en objetivo de 40X en microscopio de contraste. ....	58
<b>Figura 13.</b> ELISA directa de los sobrenadantes de los pozos con clones positivos probados sobre el péptido sintético de BDCA-1. ....	59
<b>Figura 14.</b> ELISA directa de los sobrenadantes de los pozos con clones positivos probados sobre el péptido sintético de CD11c. ....	59
<b>Figura 15.</b> ELISA directa de los sobrenadantes de los pozos con clones positivos probados sobre el péptido sintético de CD103. ....	60
<b>Figura 16.</b> ELISA directa de los sobrenadantes de los pozos con clones positivos probados sobre el péptido sintético de CD14	..... 60
<b>Figura 17.</b> Cultivo de células dendríticas observadas al microscopio de contraste en objetivo de 40X. ....	61
<b>Figura 18.</b> Inmunofluorescencia de células dendríticas probadas con los clones para BDCA-1, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. ....	62
<b>Figura 19.</b> Inmunofluorescencia de células dendríticas probadas con los clones para CD11c, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. ....	63
<b>Figura 20.</b> Inmunofluorescencia de células dendríticas probadas con los clones para CD103, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. ....	64

<b>Figura 21.</b> Inmunofluorescencia de células dendríticas probadas con los clones para CD14, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. ....	64
<b>Figura 22.</b> Inmunofluorescencia de monocitos de <i>Aotus spp</i> probados con los clones para BDCA-1, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X.....	65
<b>Figura 23.</b> Inmunofluorescencia de monocitos de <i>Aotus spp</i> probados con los clones para CD11c, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. ....	65
<b>Figura 24.</b> Inmunofluorescencia de monocitos de <i>Aotus spp</i> probados con los clones para CD14, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. ....	66
<b>Figura 25.</b> Inmunofluorescencia de monocitos de <i>Aotus spp</i> probadas con los clones para CD103, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X.....	66

## ÍNDICE TABLAS

	Pág
<b>Tabla 1.</b> Características principales de las células presentadoras de antígeno.....	22
<b>Tabla 2.</b> Resumen de los receptores de membrana de células presentadoras de antígeno escogidas para la predicción “in silico”, código de acceso de la base de datos NCBI Protein, y longitud (aa: aminoácidos).....	49
<b>Tabla 3.</b> Predicción “in silico” de las secuencias a sintetizar de los marcadores de membrana de las células presentadoras de antígeno de monos <i>Aotus</i> spp.....	55

## 1. INTRODUCCIÓN

La Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC ha diseñado y producido candidatos a vacuna contra la malaria químicamente sintetizados, que han llegado a ser probados en monos *Aotus vociferans*; La COLFAVAC24 fue la última combinación de péptidos vacúnales que se probó, mostrando una protección del 81,7% en los primates inmunizados y posteriormente retados con la cepa FVO de *Plasmodium falciparum*.

Sin embargo, con el objetivo de lograr un índice de protección mayor, se requiere aún más entendimiento sobre la activación de Linfocitos T por las células presentadoras de antígeno; ya que dependiendo de la subpoblación que fagocita el péptido sintético, la respuesta generada variará; por ejemplo, las células dendríticas de tipo mielóide tienen la capacidad de secretar citoquinas que logran potenciar la activación de células T ayudadoras, bien sea de tipo 1 y tipo 2, mientras que las células dendríticas foliculares y plasmocitoides presentan el péptido a las células B para diferenciarlas en células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Se establece entonces la necesidad de entender los mecanismos inmunológicos que ocurren en la presentación y procesamiento de antígeno a cargo de las células especializadas presentadoras de antígeno, especialmente las células dendríticas para posteriormente lograr caracterizar la activación de las células T vírgenes, hasta llegar a células T efectoras y de memoria de larga vida.

A pesar de que el modelo en *Aotus* spp. ha sido usado ampliamente, comercialmente no existen anticuerpos monoclonales que faciliten la identificación de los receptores presentes en las células del sistema inmune de este primate.

Este trabajo, pretende entonces, producir dichos anticuerpos monoclonales que no están disponibles comercialmente contra marcadores de superficie de membrana de las células presentadoras de antígeno del modelo animal recomendado por la OMS (*Aotus* spp) para estudios vacunales contra malaria; Y así, en el marco del proyecto, lograr evaluar, caracterizar y determinar el mecanismo de acción de las células presentadoras de antígeno de monos *Aotus* mediante pruebas *in vitro*.

Con base a los resultados obtenidos, se podrá dar inicio al siguiente paso del proyecto que permitirá determinar si los péptidos sintéticos cumplen con las características para ser un buen candidato a vacuna frente a *Plasmodium* spp. mediante la caracterización de células presentadoras de antígeno y a la vez será posible extrapolar esta información, a nuevos estudios vacunales de otras enfermedades infecciosas, para lograr disminuir la morbilidad y mortalidad en países en vía de desarrollo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 General

Producir anticuerpos monoclonales que reconozcan marcadores de membrana BDCA1, CD11c, CD103 y CD14 sobre células presentadoras de antígeno de *Aotus* spp.

### 2.2 Específicos

- Seleccionar mediante herramientas bioinformáticas las secuencias de los marcadores de membrana de células presentadoras de antígeno de *Aotus* spp. a sintetizar.
- Desarrollar el hibridoma a partir del bazo de ratones cepa BALB/c inmunizados, para producir los anticuerpos monoclonales contra marcadores de superficie de membrana de células presentadoras de antígeno.
- Evaluar la afinidad de los anticuerpos monoclonales producidos, frente a las células presentadoras de antígeno de *Aotus* spp.

### 3. ANTECEDENTES

Para el desarrollo e investigación de la vacuna contra la Malaria el estudio de la respuesta inmune natural del huésped puede proporcionar indicios e información importante durante el desarrollo de la misma. Esto se evidencia en estudios sobre las etapas sexuales del parásito *Plasmodium* causante de la malaria, cuya respuesta inmune constituye la base de las posibles vacunas que bloquean la transmisión del parásito.

Dentro del estudio de la respuesta inmune inducida por la infección, los antígenos de la malaria se pueden considerar como los componentes del parásito presentes en un huésped humano que inducen dicha respuesta<sup>1</sup>. Y de esta forma se convierten en estructuras de vital importancia ya que las vacunas van dirigidas contra dichos antígenos.

Sin embargo, Toro y colaboradores<sup>2</sup> mencionan algunos obstáculos frente al estudio del comportamiento del sistema inmune bajo la estimulación infecciosa de *Plasmodium*, haciendo referencia a la existencia de diferentes cepas del parásito, a los distintos estadios, con antígenos diferentes, y además a la variación antigénica que se presenta posiblemente por recombinación genética durante el estadio sexual que se desarrolla en el vector o por presión inmunológica durante el curso de una infección, la cual parece inducir mutaciones puntuales o delección de genes.

En resumen, se espera que “los estudios sobre inmunidad e inmunopatogénesis en malaria contribuyan al desarrollo de esquemas inmunopreventivos y terapéuticos efectivos contra *Plasmodium*, sin el riesgo de activar mecanismos inmunopatogénicos”<sup>2</sup>.

Teniendo en cuenta la alta incidencia de la enfermedad y que sus mayores focos están presentes en países sub desarrollados se hace evidente la necesidad de fortalecer las herramientas de control y generar nuevos mecanismos que favorezcan la erradicación de la enfermedad parasitaria; La existencia de una vacuna contra *Plasmodium* aseguraría la disminución de personas infectadas, lo cual se vería directamente reflejado en la disminución de la morbilidad en las poblaciones más vulnerables; Sin embargo, Taylor Robinson<sup>3</sup> menciona que, una de las dificultades que obstaculizan el diseño exitoso de la vacuna contra *Plasmodium* es un conocimiento incompleto de los antígenos que generan inmunidad protectora, los tipos precisos de respuesta inmunitaria a los que apuntar y cómo se pueden inducir. Una mayor apreciación de los mecanismos de la inmunidad protectora, por una parte, y de la inmunopatología, por otra, debe proporcionar pistas críticas sobre cómo se puede lograr la mejor manipulación del sistema inmunitario.

En cuanto al funcionamiento del sistema inmune es importante entender que existen mecanismos participantes en la inmunidad natural o innata como lo son la inflamación y la fagocitosis, la cual, a través de la presentación del antígeno al linfocito, establece una interacción eficaz entre la inmunidad natural y la activación de la específica. Al respecto, menciona Vega<sup>4</sup>, que la inmunidad natural o innata es la primera línea de defensa e influye de manera importante en la dirección que

seguirá el otro tipo de inmunidad: la específica o adquirida; la cual está integrado por la inmunidad celular y la inmunidad humoral.

El principal mecanismo de defensa frente a microorganismos externos está dado por la inmunidad humoral, en donde se reconoce al antígeno, y este a su vez desencadena una serie de mediadores celulares que finalmente desemboca en la producción de anticuerpos. Como menciona Villacuesca<sup>5</sup>, son los principales efectores de la respuesta humoral del sistema inmune. Como parte del sistema inmunológico normal, los linfocitos B y las células plasmáticas derivadas de ellos, producen cientos de miles de anticuerpos que son capaces de reconocer de manera específica componentes antigénicos presentes en bacterias, virus u otros agentes invasores y formar con ellos inmunocomplejos.

Por otra parte, es evidente la necesidad de reconocer la importancia de las células dendríticas; entonces menciona Romero<sup>7</sup>, que las células dendríticas (CDs) son leucocitos que juegan un importante papel tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, siendo las células presentadoras de antígeno más potentes que existen y con la capacidad única de activar linfocitos T colaboradores que no han tenido contacto antigénico previo. Por lo cual se convierte en un punto investigativo clave en la búsqueda para la erradicación de la malaria. Así mismo, como afirma Amorim<sup>6</sup> y colaboradores, la complejidad del ciclo del parásito y también los diferentes subconjuntos de DC contribuyen a aumentar el nivel de dificultad para comprender el resultado de todas las interacciones. Es necesario un enfoque multidisciplinario para dilucidar los mecanismos involucrados en la activación de las CD por *Plasmodium*. Si entendemos cómo el parásito modula las CD, es posible manipular esta información para desarrollar una vacuna eficaz contra la malaria.

La existencia de subpoblaciones de CD<sub>s</sub>, como lo expresa Romero<sup>6</sup>, se describió por primera vez en ratones, mediante la expresión de marcadores superficiales que se utilizarían para los linfocitos T, estableciéndose dos grupos principales de CD<sub>s</sub>, CD<sub>8</sub>+CD<sub>4</sub>- y CD<sub>8</sub>-CD<sub>4</sub>+. En humanos, se sabe que existe también este tipo de subpoblaciones, aunque no se relacionan tanto con su origen, sino con su madurez o funcionalidad.

La ventaja que supone la disponibilidad de estas células en el cuerpo tanto en tejidos periféricos como en órganos linfoides, y sus subtipos en torrente sanguíneo, se ha dado a conocer en modelos murinos. Naranjo<sup>9</sup> expresa que esto se ha logrado, gracias a la relativa accesibilidad a sus distintos tejidos linfoides (bazo, ganglios linfáticos, timo) y a la identificación de la expresión de marcadores de superficie. Así marcadores comunes como el CD<sub>4</sub> y el CD<sub>8</sub> han servido de herramientas fundamentales para la clasificación de los subtipos de DCs murinas. En cambio, los trabajos realizados sobre los subtipos de DCs humanos se han restringido, principalmente, a sangre periférica.

Los marcadores superficiales de las células dendríticas, permiten identificar y caracterizar los mecanismos de presentación de antígeno de las mismas, haciendo énfasis en la importancia de producir anticuerpos monoclonales que sean capaces de reconocer estos marcadores. Los anticuerpos monoclonales, “son herramientas esenciales en el ámbito clínico y biotecnológico, y han probado ser útiles en diagnóstico y tratamiento, así como también en el estudio de las interacciones patógeno-hospedero y la marcación, detección y cuantificación de diversas moléculas”<sup>7</sup>.

Almeida<sup>8</sup> y colaboradores, mencionan que la producción de anticuerpos monoclonales se dio a conocer después de que el método del hibridoma fue

descrito por Köhler y Milstein en 1975, pero el aislamiento de un anticuerpo específico que reconoce antígenos raros o poco antigénicos siguió siendo un desafío durante décadas. Esta dificultad ahora se puede entender fácilmente mediante el análisis de los protocolos de inmunización clásicos y las técnicas utilizadas después de la publicación de su estudio. La emoción en torno a la tecnología del hibridoma cegó a los investigadores al hecho de que un gran número de epítomos inmunodominantes enmascararía otros menos antigénicos, lo que tendría el potencial de generar los anticuerpos selectivos y específicos deseados, especialmente cuando se usan células completas como inmunógeno.

“Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas modificadas y diseñadas específicamente para actuar frente a dianas concretas, con el objetivo de interrumpir un proceso patológico, estimular una acción celular determinada o desviar un mecanismo celular hacia una vía de interés”<sup>5</sup>.

El conocimiento de esta técnica permitió evidenciar un importante avance en investigación, brindando la utilización de esta metodología como fundamento para subdesarrollar demás alternativas para la producción de anticuerpos monoclonales. Esta investigación fue producto de “la culminación de una serie de estudios experimentales con líneas celulares de mieloma murino”<sup>9</sup>.

El procedimiento base para su desarrollo, tal como lo menciona Villacuesca<sup>5</sup>, comienza con la inmunización de un ratón con el antígeno de interés, tras la cual, se extraen los linfocitos B a partir del bazo del animal y se fusionan con células neoplásicas de mieloma. De esta manera se obtiene una célula de fusión, un hibridoma, que combina ciertas ventajas de sus progenitores, la capacidad de producir grandes cantidades de un único anticuerpo, propia de los linfocitos B y la capacidad de multiplicarse indefinidamente, característica de las células

neoplásicas. A continuación, se seleccionan los hibridomas capaces de producir los anticuerpos deseados y se produce la expansión del clon de mayor interés. Finalmente se procede a la purificación de los anticuerpos obtenidos. De esta manera se obtiene una fuente casi inagotable de anticuerpos producidos por un clon celular, que derivan de un único linfocito B, y que son por tanto idénticos y específicos de epítomos individuales.

“Actualmente, se han desarrollado procedimientos que permiten obtener anticuerpos monoclonales completamente humanos, reduciéndose considerablemente el potencial inmunogénico. El primero de ellos, *adalimumab*, fue autorizado en 2003”<sup>10</sup>.

Finalmente, “el desarrollo de los anticuerpos monoclonales y la producción de vacunas, entre otros, han dado lugar a un gran número de patentes que, actualmente, están autorizados y comercializados para el beneficio de la sociedad”<sup>8</sup>.

## **4. MARCO TEÓRICO**

### **4.1 Sistema inmunitario y Respuesta inmune**

El sistema inmunitario está conformado con un gran conjunto de tejidos, células y moléculas que tienen como función principal la protección del organismo contra agentes infecciosos como las bacterias, hongos y parásitos; así mismo, el sistema inmunitario tiene gran importancia en los procesos tumorales.

Para defender competitivamente al cuerpo humano, el sistema inmunitario ha desarrollado diversos mecanismos, sin alterar el equilibrio del individuo y preservando “lo propio”. El conjunto de mecanismos y procesos orientados a mantener y mejorar esta función se conoce como respuesta inmune.

La respuesta inmune se basa principalmente en la capacidad del sistema inmunitario de reconocer efectivamente señales de peligro que indican la presencia, bien sea de agentes infecciosos o procesos tumorales<sup>11</sup>.

La respuesta que se inicia de inmediato, al primer contacto con un patógeno, se conoce como respuesta innata, y la que se despliega cuando la innata no

logro erradicar el agente o ingresa por segunda vez o más, se conoce como respuesta adaptativa<sup>12</sup>.

La respuesta innata, tiene como función principal el reconocimiento rápido de patógenos y/o tejidos dañados y la señalización de la presencia de señales de peligro a las células involucradas en la respuesta adaptativa<sup>13</sup>.

Este tipo de respuesta está dada por componentes celulares como las células fagocíticas y las células Natural Killer (NK), y también algunos factores de carácter soluble como el complemento y los interferones de tipo 1 (IFNs I). Las células que pertenecen a esta respuesta inicial usan también, ciertos receptores de reconocimiento de patrones que corresponden a estructuras determinadas que se repiten entre los variados patógenos y que se conservan aun a lo largo de su evolución; unos de los más importantes receptores se conocen como los Toll-like receptor (TLRs)<sup>11</sup>.

La respuesta adaptativa tiene un carácter altamente específico, cada linfocito posee receptores contra algún antígeno específico; Esta célula se origina por selección clonal de los linfocitos antígeno-específicos. La memoria inmunológica también es un importante fundamento de este tipo de respuesta, garantizando una respuesta más rápida y efectiva frente a patógenos a los que el organismo se expuso anteriormente, facilitando así una inmunidad protectora de larga duración.

Las células efectoras de la respuesta adaptativa son los linfocitos T y B. Los linfocitos T, generan señales que determinan la respuesta inmune; existen dos tipos de linfocitos T efectoras: células CD8+ o linfocitos T citotóxicos y los CD4+ o linfocito T ayudador (T Helper, Th). Estos últimos se subdividen en Th1 y Th2 en función del estímulo recibido y del patrón de citoquinas secretado<sup>14</sup>.

Los linfocitos Th1 se originan en respuesta a la secreción de los linfocitos CD4+ de IFN- $\gamma$  e IL-2 y facilitan la respuesta inmune celular. Los linfocitos Th2 se activan cuando secreta IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, y promueve una respuesta inmune mediada por anticuerpos<sup>15</sup>.

Para que se dé una respuesta inmunitaria adaptativa es indispensable que las células presentadoras de antígeno (APCs) ejerzan su función sobre los linfocitos T. De esta forma, las APCs se encargan de presentar el antígeno procesado a través de la vía clásica, por medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o por la vía no clásica a través de CD1. Dentro de la denominación de células presentadoras de antígeno se distinguen dos grupos: células “no profesionales” donde están los linfocitos B, los monocitos, las células endoteliales y los macrófagos; y las células “profesionales” donde se encuentran a las células dendríticas (DCs)<sup>11</sup>.

#### **4.2 Células presentadoras de antígeno**

Las células presentadoras de antígeno (APCs) son células que tienen la capacidad y la función de capturar, procesar, y presentar antígenos mediante fragmentos de péptidos expresados en la superficie celular mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) para su posterior reconocimiento por parte de los linfocitos T, con el objetivo de lograr una respuesta inmune efectiva <sup>16</sup>. Su papel, como células guardia o centinela resulta crucial en la reacción del sistema inmunológico frente la presencia de un agente extraño o antígeno <sup>17</sup>.

Las APCs fagocitan microorganismos, los hidroliza en pequeños fragmentos moleculares y los incorpora en sus correspondientes moléculas presentadoras de antígeno; este grupo celular está compuesto básicamente por precursores en la medula ósea: macrófagos y linfocitos B en los tejidos, y células dendríticas distribuidas prácticamente en todos los tejidos y órganos del cuerpo <sup>18</sup>. Se puede observar las características más importantes de las principales células presentadoras de antígeno en la Tabla 1.

Diversos estudios han evidenciado que una gran variedad de células provenientes de diferentes tejidos y fluidos también pueden expresan moléculas de CMH de clase I y II, generando así reconocimiento de antígeno por parte de los linfocitos T; Sin embargo, dicha expresión se da en bajas concentraciones y bajo condiciones específicas y variadas. Estos tipos de células incluyen: monocitos, células de Kuppfer, células endoteliales, células epiteliales intestinales, fibroblastos, queratinocitos e incluso linfocitos T activados <sup>16</sup>.

Feature and cell type	Macrophages	DC	B cells
MHC class II expression	low levels induced by bacteria, cytokines	constitutive	constitutive up-regulated upon activation
Antigen type	exogenous, endogenous	exogenous endogenous	exogenous, endogenous via specific Ig receptors
Presentation by MHC molecules	MHC class II	MHC class I/II	MHC class II
Co-stimulation (B7 expression)	low levels induced by bacteria and cytokines	constitutively high levels	low levels up-regulated upon activation
Location	lymphoid tissue connective tissue body cavities	lymphoid tissue connective tissue epithelium	lymphoid tissue blood

**Tabla 1.** Características principales de las células presentadoras de antígeno

Tomado de: Makala LHC, Nishikawa Y, Suzuki N, Nagasawa H. Immunology: Antigen-Presenting Cells in the Gut. J Biomed Sci. 2004;11(2):130–41 <sup>16</sup>.

#### 4.2.1 Tipos de células presentadoras de antígeno

Diferentes tipos celulares tienen en común la capacidad de expresar en su membrana MHC de clase II, y por dicha condición también poseen la capacidad de presentar el antígeno a los linfocitos T CD4+ ayudadores <sup>19</sup>.

A continuación, se dará una descripción de las principales células presentadoras de antígeno.

##### 4.2.1.1 Monocito

El monocito que se origina en la médula ósea, circula por el torrente sanguíneo y pasa a los tejidos donde se expresa como macrófago y prolifera localmente. Presentan además MHC tipo II <sup>19</sup>; Sin embargo, las células dendríticas llegan a expresar de 10 a 100 veces más el MHC tipo II <sup>17</sup>.

Los macrófagos en reposo tienen pocas o ninguna molécula del MHC tipo II en la superficie; la expresión de este último es inducida después de la ingestión de microorganismos y el reconocimiento de sus patrones moleculares ajenos. Presentan el antígeno y activan la célula T por estimulación, también expresan MHC tipo I, por lo que también activan los LT CD8+, actúan como células efectoras, son citotóxicas y poseen la capacidad de fagocitar a las células reconocidas como extrañas (tumoraes o infectadas) y a microorganismos ya que activan el complemento dando lugar a opsoninas, las cuales facilitan dicho proceso <sup>19</sup>.

Estas células expresan diversos receptores, dentro de ellos el receptor manosa y receptor secuestrador que reconocen componentes microbianos; Una vez haya

unión entre el receptor y el microorganismo se lleva a cabo la fagocitosis para su posterior degradación <sup>20</sup>.

A pesar de que muchas de las moléculas expresadas por los macrófagos no se han caracterizado, se conoce la molécula CD14, la cual tiene la capacidad de unirse a los complejos de la endotoxina bacteriana, más conocida como lipopolisacárido (LPS); Lo cual evidencia su alta capacidad para fagocitar y presentar antígenos bacterianos <sup>20</sup>.

Los macrófagos liberan también citocinas, que atraen a los neutrófilos, aumentando la respuesta inflamatoria y también libera factores que estimulan la proliferación de fibroblastos y células endoteliales, colaborando en la reparación de tejidos afectados y lesionados <sup>19</sup>.

Los monocitos expresan marcadores de superficie de membrana específicos, el más conocido e importante, es el **CD14**, pero también expresan CD2, CD11b, CD16, CD31, CD56, CD62L y CD115 <sup>21</sup>.

#### 4.2.1.2 Células B

Las células B cumplen un papel esencial en la respuesta inmune humoral; Durante la respuesta dependiente de células T, las células B se diferencian en células de memoria o células plasmáticas que secretan anticuerpos específicos de antígeno de alta afinidad a través de un complejo proceso que implica la participación de células T ayudadores CD4+ <sup>22</sup>.

Adicional a la captación específica de antígenos a través de sus inmunoglobulinas de superficie, presenta el antígeno a las células T a través del MHC tipo II; y solo en circunstancias especiales presenta actividad coestimuladora <sup>19</sup>.

Sin embargo, el papel de estas células como APCs no ha sido muy estudiado y tenido en cuenta debido a la baja prevalencia de células B que posean un receptor antígeno específico, y también su ausencia en tejidos como la piel, y mucosas, medios por los cuales ingresan la mayoría de patógenos y antígenos ambientales <sup>23</sup>.

Los marcadores de superficie de membrana más significativos expresados por las células B son CD19, CD20, CD21, CD23, CD23, CD24, CD40, CD72, CD79, CD138 <sup>24</sup>.

#### 4.2.1.3 Células dendríticas (DCs)

Son células cuya función primordial consiste en servir de enlace entre el sistema inmune innato y adaptativo. A diferencia de los monocitos, son células que tienen encargado el trabajo de detectar el patógeno, procesarlo y trasladarse a los órganos linfoides secundarios más cercanos para presentar los antígenos. Allí se encargan de activar los linfocitos T y dirigirles en su diferenciación hacia una respuesta defensiva adecuada <sup>18</sup>.

Las células dendríticas conforman un grupo bastante heterogéneo de células; Todas ellas expresan variadas familias de moléculas en su superficie celular, las cuales les confieren su función presentadora de antígeno. Algunas de estas moléculas son los receptores de patrón de reconocimiento de patógenos específicos, los TLRs, los receptores de lectinas del tipo C, los receptores Fc y los receptores de complemento <sup>17</sup>.

Morfológicamente las células dendríticas se caracterizan por sus prolongaciones citoplasmáticas denominadas dendritas, las cuales le confieren una gran capacidad de movimiento, así como también la capacidad de interactuar con los efectores de la respuesta innata (Célula NK y NKT), como también con las células de la respuesta inmune adaptativa (Células T y B). Las células dendríticas fueron descritas como las células que mejor cumplen el papel de presentar el antígeno ya que tiene una alta capacidad para estimular a las células T y también posee la capacidad exclusiva de inducir la expansión clonal de células T naive <sup>11</sup>.

Debido a los diversos mecanismos que posee la célula dendrítica para capturar material extracelular, logran presentar antígenos de casi cualquier tipo de agente patógeno, y tiene dos rutas disponibles para ello. La primera ruta es a través de receptores fagocíticos como el receptor de Manosa y DEC 205; Dichos receptores reconocen una gran gama de bacterias y virus. Los antígenos captados de esta manera, ingresan a la vía endocítica, en la cual logran ser procesados y presentados sobre MHC clase II para su posterior reconocimiento por células T CD4+. La segunda vía, es el ingreso directo al citosol, especialmente para patógenos virales, ya que estos no inducen actividad coestimuladora en otros tipos de células presentadoras de antígeno <sup>25</sup>.

Se diferencian dos clases amplias de células dendríticas: las células dendríticas convencionales, que son las que participan en forma más directa en la presentación del antígeno y la activación de células T indiferenciadas, las cuales son de origen mieloide. Y las células dendríticas plasmocitoides, un linaje bien definido que produce altas cantidades de interferones de tipo 1, especialmente en infecciones virales y su origen es linfoide <sup>17</sup>.

Los marcadores de superficie de membrana más relevantes que expresan las células dendríticas maduras son BDCA-1, CD8, CD11c, CD11b, CD103, CD205, MHC II <sup>21</sup>.

#### 4.2.1.3.1 Células dendríticas convencionales (cDCs)

Este tipo de célula dendrítica se puede encontrar en el organismo en tres áreas diferentes: tejidos periféricos, órganos linfoides secundarios y en sangre periférica; representando del 0.09 – 0.44% de los leucocitos presentes en el torrente sanguíneo <sup>11</sup>.

En la piel se pueden distinguir dos tipos de cDCs: las células de Langerhans, las cuales residen en la epidermis; y las células intersticiales, presentes en la dermis <sup>11</sup>.

Las células dendríticas convencionales (cDCs) que se encuentran en los órganos linfoides secundarios capturan el antígeno microbiano velozmente y, tras la estimulación mediante los receptores que reconocen patrones específicos (Pattern Recognition Receptors, PRRs), inducen la proliferación y secreción de IL-2 de linfocitos T antígeno específicos <sup>26</sup>.

De tal modo que no solo están implicadas en la inducción a la inmunidad, sino que además se encargan de la tolerancia inmunológica a través de la captura y presentación de antígenos propios en ausencia de señales de alerta y/o inflamación.

Este grupo celular está ampliamente relaciona con los monocitos; Y en cuanto a ensayos *in vitro* supone una ventaja, ya que los monocitos de sangre periférica que son estimulados con GM-CSF y IL-4 dan origen a células dendríticas (células dendríticas derivadas de monocito) <sup>27</sup>.

#### 4.2.1.3.2 Células dendríticas plasmocitoides (pDCs)

Estas células representan del 0.09 – 0.37 % del total de leucocitos presentes en sangre periférica de humanos <sup>11</sup>. Las pDCs expresan selectivamente los Toll Like Receptor 7 y 9 (receptores de reconocimiento de patrones tipo Toll), y están especializadas en una secreción masiva y veloz de interferones de tipo I (alfa, beta y omega), en respuesta a diversos patógenos <sup>28</sup>.

Las células productoras de interferones de tipo I, pueden estimular la activación y acción de otras células como las Natural Killer (NK), linfocitos B, linfocitos T y las cDCs <sup>29</sup>.

Las pDCs no son fuertemente inductoras de la proliferación de linfocitos T; y sus procesos de captura, procesamiento y presentación antigénica son mucho menos eficaces si se comparan con los de las cDCs, ya que expresa niveles inferiores de MHC II <sup>30</sup>. sin embargo, se ha demostrado que estas células tienen la capacidad de fagocitar antígenos solubles, y anticuerpos unidos a antígenos restringidos por MHC II (como por ejemplo BDCA-2) <sup>31</sup>.

### 4.3 Captura y procesamiento del antígeno

La relación que hay entre los monocitos/macrófagos y las células dendríticas se da por la función compartida de presentar antígenos. Aunque las dos son consideradas APCs profesionales, presentan funciones diferenciadas: Los monocitos/macrófagos destruyen patógenos e inician la inflamación, mientras que las células dendríticas hidrolizan los antígenos para presentarlos a los linfocitos T colaboradores para inicio a la respuesta adaptativa <sup>18</sup>.

La presentación del antígeno está dividida en tres fases principales, la captura del antígeno, el procesamiento del mismo y la presentación, incorporando los antígenos a las moléculas de HCM.

#### 4.3.1 Captura del antígeno

Este proceso puede realizarse mediante diversos mecanismos que se exponen a continuación.

El primer mecanismo es mediante los receptores de reconocimiento de patrones presentes en todas las células presentadoras de antígeno, donde los patógenos son adheridos a la membrana de las APCs mediante estos receptores representados por los TLR y receptores de lectinas tipo c <sup>32</sup>. Allí, mediante la contracción de la actina y la miosina y junto al citoesqueleto son capaces de emitir pseudópodos, englobar al microorganismo y endocitarlo dando origen a una vacuola intracelular llamada fagosoma <sup>18</sup>.

El segundo mecanismo que se conoce se da mediante los receptores Fc que reconocen los diferentes isotipos de las IgG; este proceso se denomina opsonización <sup>32</sup>. Las IgG secretadas por los linfocitos B se unen por medio de sus regiones variables a los antígenos de superficie de los patógenos. Así, las regiones constantes de estas inmunoglobulinas son reconocidas por los receptores Fc de los macrófagos, dando lugar a una fagocitosis específica a cargo de las Inmunoglobulinas <sup>18</sup>.

Por último, las APCs logran capturar el antígeno mediante receptores del complemento CR1, CR3 y CR4. Este mecanismo se da gracias a que ciertos microorganismos producen una ruptura de la proteína del complemento C3 en dos subunidades (C3a y C3b); Así, la C3b se une de manera covalente a la superficie de los patógenos que serán reconocidos por las células al iniciar la fagocitosis <sup>33</sup>.

#### 4.3.2 Procesamiento del antígeno

Los antígenos que son capturados por las APCs son procesados en diferentes compartimientos intracelulares y son cargados en moléculas presentadoras de antígeno (MHC) <sup>34</sup>. Los antígenos proteicos son presentados por medio de la vía clásica (MHC), mientras que los antígenos lipídicos son presentados mediante una vía no clásica (CD1) <sup>35</sup>.

Hay dos vías diferentes para la presentación de péptidos antigénicos en las moléculas de MHC; Los antígenos de origen exógeno son interiorizados por fagocitosis o endocitosis y, normalmente son procesados y cargados en moléculas de MHC tipo II en compartimiento Golgi <sup>34</sup>. Mientras que, los antígenos endógenos son dirigidos parcialmente por el proteosoma, asociados al transportador TAP

(Transporter Associated with Antigen Presentation) y transferidos al retículo endoplasmático donde finalmente son cargados en moléculas MHC tipo I <sup>36</sup>.

Así, el péptido unido al antígeno del MHC es la estructura reconocida por el TCR, y la capacidad de respuesta de un linfocito T está determinada por el ensamblaje efectivo de este complejo tri-molecular <sup>37</sup>.

#### 4.3.2.1 Presentación a través de la vía clásica

Las células presentadoras procesan antígenos de carácter exógeno permitiendo su asociación a moléculas del MHC tipo II; y los antígenos endógenos son procesados para ser presentados en moléculas del MHC tipo I. Un tercer mecanismo se denomina “presentación cruzada”, la cual permite el procesamiento de antígenos exógenos cargados a moléculas del MHC tipo I <sup>38</sup>.

Los antígenos que son capturados y presentados mediante el MHC II son transportados desde el compartimiento lisosomal hacia la membrana celular; Estos complejos péptido-MHC tienen una alta estabilidad, permitiendo el reconocimiento por el TCR <sup>39</sup>.

Adicional a ello, las células dendríticas a diferencia de los macrófagos expresan bajos niveles de proteasas lisosomales, lo cual se refleja en una degradación más lenta del antígeno, quedando retenido por más tiempo en los órganos linfoides favoreciendo la presentación antigénica <sup>40</sup>.

Las moléculas del MHC I representan otra vía de presentación antigénica que es usada por las células dendríticas; A través de este mecanismo se presentan péptidos endógenos, originados a partir de proteínas celulares y péptidos exógenos por presentación cruzada <sup>41</sup>.

#### 4.3.2.2 Presentación a través de la vía no clásica (familia CD1)

La familia de CD1 hace presentación de antígenos lipídicos a los linfocitos T <sup>42</sup>. En humanos, la familia CD1 está conformada por 5 miembros CD1a-c (grupo 1); CD1d (grupo 2) y CD1e (grupo 3); Mientras que en ratón solo se ha descrito el grupo CD1d <sup>43</sup>.

Las moléculas CD1 muestran diferentes patrones de tráfico intracelular, relacionado con el reparto del antígeno en distintos compartimientos celulares. Es importante resaltar las similitudes entre en MHC II y CD1, pero así mismo diferencias que los hacen sistemas autónomos e independientes. Como por el ejemplo, que en la presentación de antígeno por moléculas CD1 la maduración de células dendríticas no es significativa ni relevante <sup>44</sup>.

#### **4.4 *Aotus* como modelo animal**

Las primeras investigaciones en las cuales se utilizaron primates como modelos experimentales se iniciaron en 1920. Desde entonces son muchas las especies de primates utilizadas en el estudio de enfermedades infecciosas y parasitarias <sup>45</sup>.

En lo que se refiere al paso del modelo animal al modelo humano, se considera que la respuesta inmunológica de los mamíferos tiene suficientes denominadores comunes como para poder estudiar una infección determinada en diferentes especies y luego extrapolar sus resultados a la especie humana. Sin embargo, entre más próximo sea el modelo animal desde el punto de vista filogenético, esta extrapolación será más significativa <sup>46</sup>.

Desde que se realizaron las primeras infecciones con *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, las diferentes especies de *Aotus* se han utilizado para la detección de fármacos antipalúdicos, el desarrollo de vacunas contra la malaria y más recientemente usados como modelos para la fisiopatología de la malaria. No todos los parásitos del género *Plasmodium* logran infectar en monos *Aotus*; sin embargo, una vez que una población aislada de parásito se ha adaptado a una especie, se puede transmitir fácilmente a otras <sup>47</sup>.

Los estudios de seguridad y eficacia protectora en modelos animales son pasos críticos para el desarrollo de vacunas y medicamentos, y los modelos de primates son probablemente los más apropiados para este propósito <sup>47</sup>.

Aunque dentro del género *Aotus* existen varias especies susceptibles a *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, *Aotus lemurinus griseimembra* representa el mejor modelo actual de primates para estudios en malaria debido a su alta susceptibilidad a la infección por formas sanguíneas y esporozoitos de ambas especies de *Plasmodium*. Aunque la validación final de este modelo depende de ensayos en humanos, en las últimas dos décadas, estos monos han demostrado ser muy útiles para probar múltiples candidatos a vacuna contra la malaria antes de los ensayos clínicos en humanos <sup>47</sup>.

Parte de las limitaciones en el uso del modelo de *Aotus* en la investigación de la malaria es la falta de herramientas disponibles para la evaluación de la respuesta inmune. Se ha invertido un gran esfuerzo en la evaluación de reactivos humanos que pueden reaccionar de forma cruzada con las proteínas de *Aotus* y la caracterización molecular para evaluar la similitud con las moléculas humanas <sup>47</sup>.

Por otro lado, se suma a los conflictos del uso del modelo de monos *Aotus* la inconformidad que manifiestan organizaciones encargadas de proteger los derechos de los animales <sup>45</sup>. Muchos de estos conflictos se ven generados por aspectos como la extinción de especies, que son respaldados por gobiernos en los que se ha estipulado estamentos para regular y controlar la captura y/o utilización de animales silvestres, en este caso, para uso científico <sup>47</sup>.

Por lo anterior, es importante el conocimiento de normatividad y percepción de la sociedad frente al tema, pues debe ser un punto a tener en cuenta en el desarrollo de alternativas experimentales.

#### **4.5 Producción de anticuerpos monoclonales**

Los mAbs se pueden clasificar en función de sus objetivos o funciones respectivas. La técnica de hibridoma consiste en inyectar primero un antígeno específico en un ratón y obtener las células plasmáticas específicas de antígeno del bazo del ratón <sup>48</sup>. La célula plasmática aislada se fusiona con una célula inmune cancerosa para la inmortalidad. Esta célula híbrida se clona para producir muchos clones hijos idénticos, que producen continuamente el anticuerpo monoclonal de interés. Inicialmente, con esta tecnología solo se producían anticuerpos monoclonales murinos (derivados de un solo ratón). Como estos

anticuerpos murinos desencadenaron fuertes reacciones inmunes en humanos, especialmente en la administración repetida, se crearon otros tipos de mAb mediante ingeniería adicional y tecnología recombinante <sup>49</sup>.

A pesar de las ventajas inherentes a la fabricación de mAb humanos naturales, la baja eficiencia del proceso de aislamiento del hibridoma históricamente fue un inconveniente técnico que fue demasiado grande para superar, y en su lugar se han utilizado muchos otros métodos para producir mAb humanos en los últimos años para satisfacer la demanda de generación de anticuerpos terapéuticos. La principal desventaja del método de hibridoma es la baja eficiencia de fusión. Sin embargo, durante las últimas décadas, este problema se ha superado lentamente a través de mejoras en varias características técnicas del proceso <sup>50</sup>.

El paso más difícil y crítico en la producción de hibridomas humanos es la capacidad de fusionar eficientemente las poblaciones deseadas de linfocitos con un compañero de mieloma. Existen tres técnicas básicas utilizadas para generar hibridomas con el propósito de producir mAb: (i) el uso de agentes químicos como PEG, (ii) virus fusogénicos y (iii) citofusión eléctrica. La técnica más común, sin embargo, implica la fusión química con PEG <sup>50</sup>.

El paso final en la generación de un hibridoma humano es aislar productos de fusión exitosos como clones derivados de células individuales, un proceso a menudo denominado clonación biológica. Hay varias ventajas en aislar los hibridomas individuales temprano y hacerlos crecer de manera clonal. Con frecuencia, se crean poblaciones mixtas de hibridomas productores de mAb después de la fusión. Dependiendo del experimento, puede haber cientos o incluso miles de clones diferentes producidos. La clonación celular es un paso esencial para garantizar que finalmente se genere un anticuerpo monoclonal <sup>50</sup>.

Finalmente, la producción de mAbs completamente humanos fue posible a través de dos tecnologías: exhibición de fagos y ratones transgénicos <sup>49</sup>.

#### **4.6 Normatividad y condiciones éticas en murinos**

La investigación con animales experimentales es tan antigua como la ciencia misma, razón por la cual, en la medida en que se han definido condiciones de trabajo en el área, se han ido ajustando las políticas en investigación abriéndose así un campo de conocimiento y capacitación que brinda soporte a la investigación biológica y biomédica que requiere su uso. Gracias al uso de los animales, se han hecho grandes descubrimientos para un gran número de afecciones los cuales han sido constantemente reportadas <sup>51</sup>.

Estos descubrimientos o aportes nos conducen racionalmente a asumir una postura de excepcional aceptación del uso del animal en condiciones de trato y protección humanitaria para la investigación <sup>51</sup>.

La experimentación es válida si es reproducible, es una premisa universal de la investigación científica y que debe ser aplicada en el campo de la experimentación con animales. Por ello el esfuerzo que hace el equipo investigador por conocer los comportamientos normales, adaptativos, el dolor, el malestar, el miedo, la angustia y la molestia mínimas para favorecer la permanencia de un equilibrio entre las condiciones biológicas y etológicas del animal se verá expresado en el resultado de su ensayo o investigación <sup>51</sup>.

La primera condición del investigador que trabaja con animales de laboratorio es el respeto por la vida, por el dolor o el sufrimiento a que éstos pueden ser sometidos en los trabajos bajo su responsabilidad <sup>51</sup>.

Las ventajas del ratón sobre otros animales experimentales incluyen la posibilidad de manipular información genética nueva dentro de la célula y transmitirla a la línea germinal. Por otro lado, el ratón tiene un ciclo reproductivo muy corto con tamaño de camadas grandes; es un animal pequeño, manejable, resistente, bien caracterizado en cuanto a su biología y muy usado en el laboratorio. Es relativamente barato en comparación con otros animales experimentales y su mantenimiento, aun en condiciones de alta seguridad, es relativamente sencillo <sup>52</sup>.

Algunos de los aspectos más importantes para cualquier proyecto que involucre la utilización de modelos animales serían: <sup>52</sup>

- Los experimentos que involucren animales vivos deben ser realizados por o bajo la supervisión de científicos calificados, es decir con conocimiento y experiencia en etología y cuidado animal.
- El cuidado de los animales de experimentación debe ser supervisado por un veterinario u otro científico entrenado que conozca fisiología en ambientes cerrados y patologías propias de los bioterios.
- El experimento se debe basar en el conocimiento previo de la enfermedad o problema en estudio.
- Se debe evitar todo el daño y sufrimiento innecesario en los animales durante los experimentos.
- Si es necesario sacrificar algún animal de experimentación, el procedimiento debe ser realizado "humanitariamente" Ningún animal debe ser descartado hasta que se esté seguro de su muerte <sup>52</sup>.

#### 4.6.1 Estamentos normativos y éticos

Los ratones son mantenidos siguiendo las normas de bioética conforme a lo indicado en la Ley 84 de 1989 <sup>53</sup>, la resolución 8430 de 1993<sup>54</sup>, emitida por el Ministerio de Salud de Colombia y la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, octava edición, del Instituto Nacional de Salud <sup>55</sup>. También se consideró lo estipulado por la Asociación Americana Medica Veterinaria (AVMA) en el panel de Eutanasia en 2013. Todos los animales son mantenidos con comida Rodent Diet 5010 y agua.

Esta investigación cuenta con el aval del comité de ética de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A regulado por el acuerdo No. 285/2008, capítulo VII <sup>56</sup>. (Anexo 1)

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1 UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA

Para el estudio fueron utilizados los esplenocitos obtenidos de 12 ratones hembras de cepa BALB/c, péptidos producidos sintéticamente de receptores de membrana de células presentadoras de antígeno de *Aotus* spp. y monocitos derivados de sangre periférica de humano y *Aotus* spp.

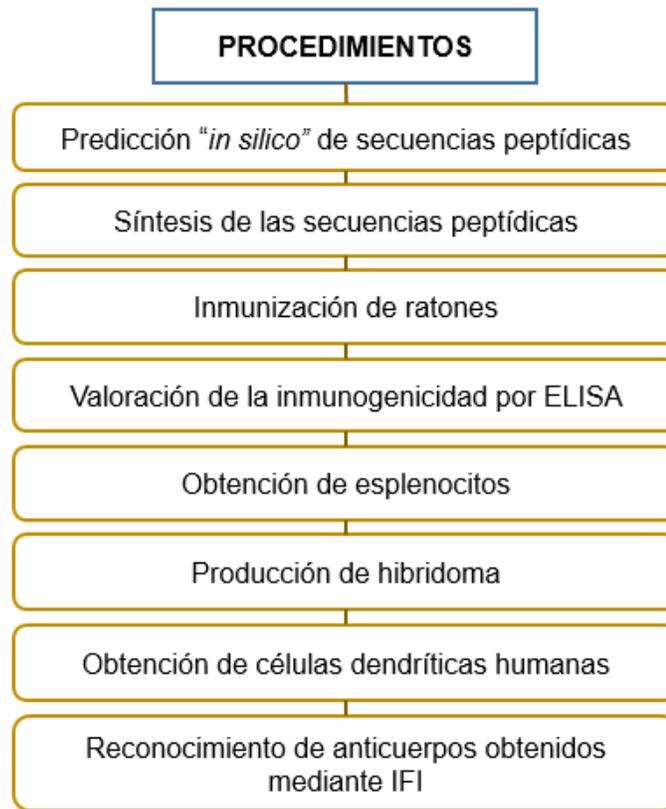
Estos ratones son procedentes de la Universidad Nacional de Colombia, presentaban pesos entre 10 a 15 gramos, y tenían aproximadamente 6 semanas

de edad. Se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, el cual cuenta con un ambiente estandarizado acorde a las necesidades de las especies que allí se alojan, garantizando el bienestar de los animales y la seguridad del personal que trabaja en la institución. Todos los animales se encuentran a temperatura ambiente, son alimentados con comida Rodent Diet 5010 y agua.

Se dispusieron los ratones en grupos de tres para cada una de las cajas, las cuales fueron previamente rotuladas con la información de los animales y el grupo funcional al que pertenecían. Adicional a esto, el aseo de las cajas en donde se mantienen fue realizado tres veces por semana, incluyendo el cambio de comida y agua.

Lo anterior, cuenta con el aval del comité de ética de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A regulado por el acuerdo No. 285/2008, capítulo VII.

## **5.2 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS**



**Figura 1.** Flujograma del esquema general de procedimientos utilizados.

### 5.2.1 Predicción *in silico* de secuencias peptídicas

La selección de los péptidos necesarios en la inmunización del modelo murino se realizaron haciendo uso de herramientas bioinformáticas. Para ello, se tomaron las secuencias de las proteínas BDCA-1, CD103, CD11c y CD14 de *Aotus spp*, obtenidas mediante formato FASTA haciendo uso de la base de datos NCBI Protein; con dicha secuencia se predijo cual era la porción de la proteína disponible en membrana mediante el programa TMHMM Server. Esta predicción permitió identificar las regiones de cada una de las proteínas que se encontraban

expuestas extracelularmente y, por ende, podrían ser potencialmente identificadas por los anticuerpos a generar.

Una vez obtenida la porción de membrana se conoció la presencia y localización del péptido señal de las secuencias mediante SignalP 4.0 Server. Una vez determinadas las regiones extracelulares y luego de retirar el péptido señal, se identificaron los epítopes reconocidos por las células B y células T mediante el programa IEDB Analysis Resource; por último, mediante un alineamiento BLAST entre las secuencias de *Mus musculus*, *Homo sapiens*, y *Aotus spp* descritas en el GenBank, se seleccionaron los péptidos a sintetizar e inmunizar en ratones, siendo criterio de selección que las secuencias difieran en el 50% o más entre *Mus musculus* y *Aotus spp*.

### 5.2.2 Síntesis de las secuencias peptídicas

Las secuencias proteicas seleccionadas (Tabla 2) se sintetizaron químicamente por el grupo funcional de síntesis química de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), mediante el sistema de fase sólida múltiple usando la aproximación de ter-butoxycarbonyl (t-Boc) <sup>57</sup>. Los péptidos se hidrolizaron con TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95%/2,5%/2,5%), siendo purificados mediante RP-HPLC, con posterior liofilización y análisis mediante espectrometría de masas (Maldi-TOF) para confirmar su peso molecular. Adicionalmente, se realizó dicroísmo circular (que es una aproximación de la composición estructural de las proteínas en disposición de las hojas alfa, beta hélices y polipropinil); el espectro se registró a 20°C utilizando un espectropolarímetro Jasco J-815 acoplado a un sistema Peltier PFD-425S para el control de la temperatura. Se utilizaron soluciones de péptido en 0,1 mg/mL en diferentes porcentajes de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) <sup>58</sup>. Los

espectros se recogieron de 195 a 260 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1 mm (los parámetros utilizados fueron: velocidad de exploración de 100 nm / min), el tono de datos 0,2 nm, la respuesta 2s, 1 nm ancho de banda y 3 scans).

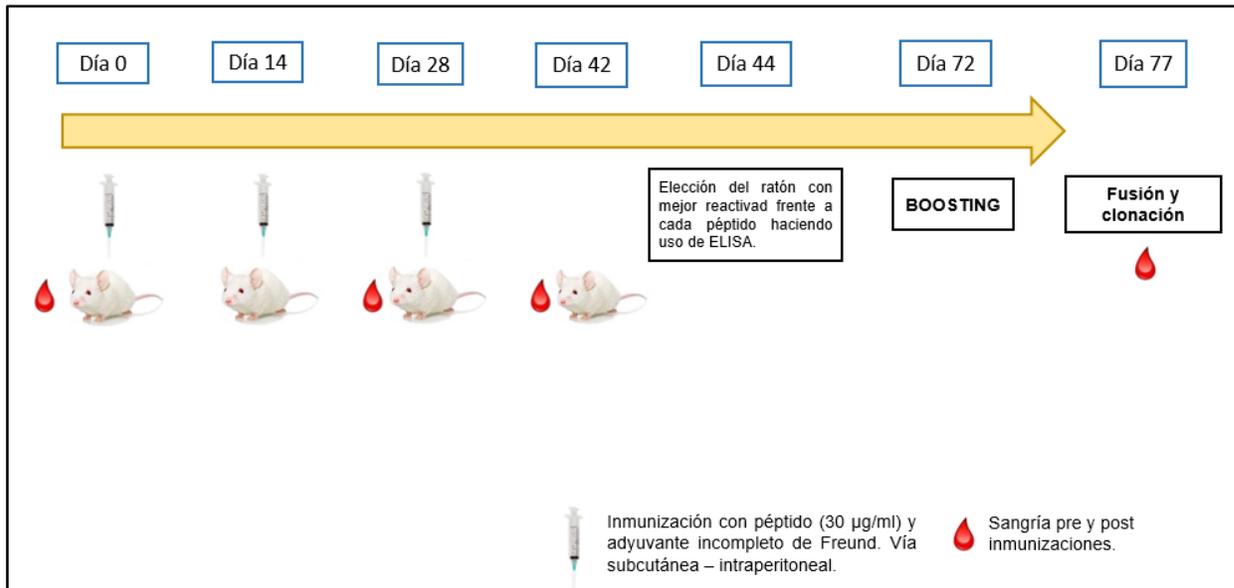
Como resultado de la síntesis química de las secuencias peptídicas de interés, fueron entregados los péptidos en estado liofilizado, uno por cada proteína de membrana (BDCA-1, CD11C, CD103 y CD14).

### 5.2.3 Protocolo de Inmunización de ratones

En este estudio, se utilizaron 12 ratones hembras destetadas de raza BALBc, procedentes de la Universidad Nacional de Colombia, que presentaban pesos entre 10 y 15 gramos. Para la inoculación de los péptidos se prepararon en una proporción de 30 µg de péptido en 50 µL de PBS + 50 µL de adyuvante incompleto de Freund. Los ratones fueron divididos en 4 grupos, el grupo 1 fue inoculado con el péptido BDCA-1 (ratón 0, 1 y 2), el grupo 2 con el péptido CD11C (ratón 3, 4 y 5), el grupo 3 con el péptido CD14 (ratón 6, 7 y 8), y finalmente el grupo 4 con el péptido CD103 (ratón 9, 10 y 11). Con el fin de obtener el suero pre-inmune, mediante punción de la vena facial, se realizó una sangría previa a la primera inmunización. Cada ratón se inmunizó en una oportunidad inicial vía subcutánea y las dos posteriores por vía intraperitoneal (días 0, 14 y 28), obteniendo luego de cada inmunización muestras de sangre para la obtención de suero (post segunda y post tercera inmunización).

Un mes después de la última inmunización, con el fin de obtener los esplenocitos necesarios para la fusión celular en la realización del hibridoma, los ratones fueron inmunizados (boosting) con el péptido sin adyuvante de 4 a 5 días antes de la

eutanasia. Para ello los ratones fueron sacrificados mediante método físico por dislocación cervical con previa sedación haciendo uso de Ketamina + Xilacina teniendo en cuenta consideraciones éticas de bienestar animal. Finalmente, se hizo recolección de muestra de sangre pos sacrificio mediante punción cardiaca.



**Figura 2.** Esquema y línea de tiempo sobre inmunizaciones, sangrías y elección de ratones aptos para sacrificio.

#### 5.2.4 Obtención de los esplenocitos

Para este procedimiento, realizado tras el sacrificio, se delimito un área específica previamente desinfectada junto con el material requerido. Se inició confirmando la ausencia de los signos vitales del ratón y posteriormente este fue ubicado en posición cubito dorsal con fijación de los miembros en una superficie rígida. Se identificó en la cavidad abdominal específicamente la línea alba y sobre esta, se

procedió a realizar una incisión de aproximadamente 2 a 3 centímetros. Los músculos de la cavidad abdominal fueron retraídos para exponer las vísceras, ubicar el bazo y proceder a su extracción.

Después de extraído el bazo, éste fue puesto en medio de cultivo IMDM completo en donde se obtuvieron los esplenocitos sometiendo el órgano a perfusión. Por último, se realizó recuento celular de los mismos utilizando cámara de Neubauer®.

#### 5.2.5 Valoración de la inmunogenicidad por ELISA

Con el fin de lograr determinar el ratón que en cada uno de los grupos presento mejor respuesta frente al péptido inoculado y proceder a la eutanasia para obtención de esplenocitos, se realizaron dos ensayos. Primero, mediante ELISA se determinó la reactividad frente al péptido, y segundo, mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI) se evaluó la afinidad de los anticuerpos frente a las células que se encuentran dirigidas.

Una vez obtenidos los sueros preinmune, post segunda y post tercera inmunización se analizaron para determinar su reactividad, realizando ensayos de ELISA, para lo cual se utilizaron placas Nunc Maxisorp (BioLegend, Cat: 423501) de poliestireno de 96 pozos de fondo plano, las cuales fueron cubiertas con los péptidos sintetizados a razón de 1  $\mu\text{g}$ /pozo. En cada pozo se colocó el suero de los ratones (1:100 en PBS con leche descremada 5%), las placas fueron incubadas por dos horas a 22°C. Los anticuerpos específicos fueron detectados usando IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich, Cat:

SAB3701085) como segundo anticuerpo, la reacción fue revelada utilizando como sustrato fosfatasa alcalina (P-nitrofenil fosfato).

Se consideraron como positivos aquellos valores superiores al promedio de la reactividad del suero pre-inmune, más dos desviaciones estándar.

#### 5.2.6 Producción del hibridoma

Para dar inicio a la producción del hibridoma, con anterioridad se cultivó células de mieloma (PAI, que no produce anticuerpos), donadas por el Doctor Gerd Pluschke del Swiss Tropical Institute, hasta alcanzar una concentración de veinte millones. Para la fusión, las células se mezclaron en una proporción de 1 célula de mieloma por cada 5 de bazo mediante el uso de polietilenglicol (peso molecular 1.400-1.800, Sigma Aldrich cat: 10783641001). Se adicionó un 1 mL polietilenglicol durante un minuto (gota-gota); inmediatamente, se diluyó con 1 mL de medio IMDM incompleto, adicionándolo también gota a gota. Después de este paso, se llevaron las células híbridas a 10 mL, se centrifugaron y fueron resuspendidas a una concentración de 1'000.000 de células/ mL de medio HAT-20% de suero fetal bovino (HAT: Hipoxantina, Aminopterina y Timidina). Estos hibridomas fueron cultivados en placas de 96 pozos e incubados durante 16 días a 37° en una atmósfera con CO<sub>2</sub> 5%.

Con el fin de seleccionar los clones, después de 12 días de incubación, se realizó ELISA analizando los sobrenadantes de las células híbridas. Los clones positivos fueron pasados a cajas de cultivo de 24 pozos. Los pozos que empezaron a presentar colonos fueron analizados por inmunofluorescencia. De estos, los clones positivos, fueron clonados por dilución límite y después de 12 a 15 días, los pozos

que empezaron a mostrar crecimiento clonal en el cultivo se analizaron por inmunofluorescencia.

### 5.2.7 Obtención de células dendríticas

Para dar inicio al cultivo de células dendríticas humanas, fue necesario partir de muestras de sangre periférica. Esta fue una muestra obtenida de un donante voluntario de la institución, anti coagulada con heparina, de la cual se obtuvo después de un gradiente de Ficoll-Hypaque una capa de células mononucleares. Estas células fueron lavadas 3 veces con medio IMDM completo y cuantificadas en cámara de Neubauer® con azul de tripan.

Después de la cuantificación y dependiendo la caja de cultivo que se iba a utilizar, se realizaron cálculos para determinar la cantidad de células que se pondrían por pozo. Se agregaron las células con medio IMDM completo, y se verificó su presencia mediante microscopía. Se llevaron a la incubadora por 3 horas a 37° en una atmósfera con CO<sub>2</sub> 5%. Teniendo en cuenta que los monocitos son células adherentes, después de este tiempo se encontraron adheridas a la caja de cultivo, y toda aquella célula que no era monocito quedó en el sobrenadante, el cual se retiró. Se adicionó nuevamente medio de cultivo IMDM completo y fue llevado a la incubadora a 37° en una atmósfera con CO<sub>2</sub> 5%.

Se realizaron tres estímulos de maduración después de la siembra, estos fueron en el día 1, 3 y 6. Los dos primeros estímulos se realizaron con IL4 (100-200ng/ml)

y GM-CSF (50ng/ml), mientras que el estímulo realizado el día 6 se hizo con lipopolisacarido (100ng/ml) y sobrenadante de células P388-D1 (productoras de IL1  $\beta$  e IL6). El proceso de maduración se evidencio a través de las características morfológicas vistas por microscopía, evidenciándose la presencia de sus numerosas proyecciones de membrana.

Posteriormente entre los días 2 y 3 después del último estímulo, se colecto el sobrenadante de los cultivos y luego se procedió a la recolección de las células, para lo cual estas se sometieron para su desprendimiento a la incubación con tripsina, llevándolas a incubadora de 5 a 10 minutos a 37° en una atmósfera con CO<sub>2</sub> 5%, se verificó su desprendimiento mediante microscopía, posterior a esto, las células fueron lavadas 3 veces con medio IMDM completo, se centrifugaron y finalmente se cuantificaron en cámara de neubauer® con azul de tripan.

#### 5.2.8 Inmunofluorescencia indirecta

A partir de las células que fueron obtenidas en el cultivo de células dendríticas, se tomaron 25.000 células diferenciadas que fueron sembradas en cada uno de los pozos de una lámina de vidrio cubierta con poli-L-lisina. Se dejaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con el fin de que se precipitaran y se adhirieran a la lámina. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se dejaron secando durante toda la noche. Al día siguiente, las láminas fueron recogidas y se guardaron en el congelador a -70°C. Se descongelaron únicamente las láminas necesarias en el momento que se iba a realizar análisis de los anticuerpos monoclonales.

Para iniciar la inmunofluorescencia, las láminas fueron bloqueadas con leche al 1% en PBS 1X, o albúmina bovina al 1%. Se dejaron incubando durante 30

minutos, y posterior a este tiempo se lavaron 3 veces, cada lavado durante 5 minutos con PBS 1X. Se eliminó el exceso de PBS y se adicionaron los anticuerpos monoclonales de interés. Se dejó incubando la lámina durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de transcurrido este tiempo se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X y se elimina el exceso. Se adicionó el segundo anticuerpo marcado con FITC (anti-ratón IgG FITC, Sigma Aldrich cat: FI-2000) en dilución 1:100 y se dejó incubando durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente y oscuridad. Se realizó después de este tiempo 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X, retirando el exceso, y se agregó finalmente DAPI (0.5Mg/mL) durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno, y se retiró el exceso de PBS. Finalmente, se dejaron secar en oscuridad y se agregó solución de montaje, se cubrieron los pozos con una lámina cubre objetos y se leyó en el microscopio de fluorescencia.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Predicción “*in silico*”

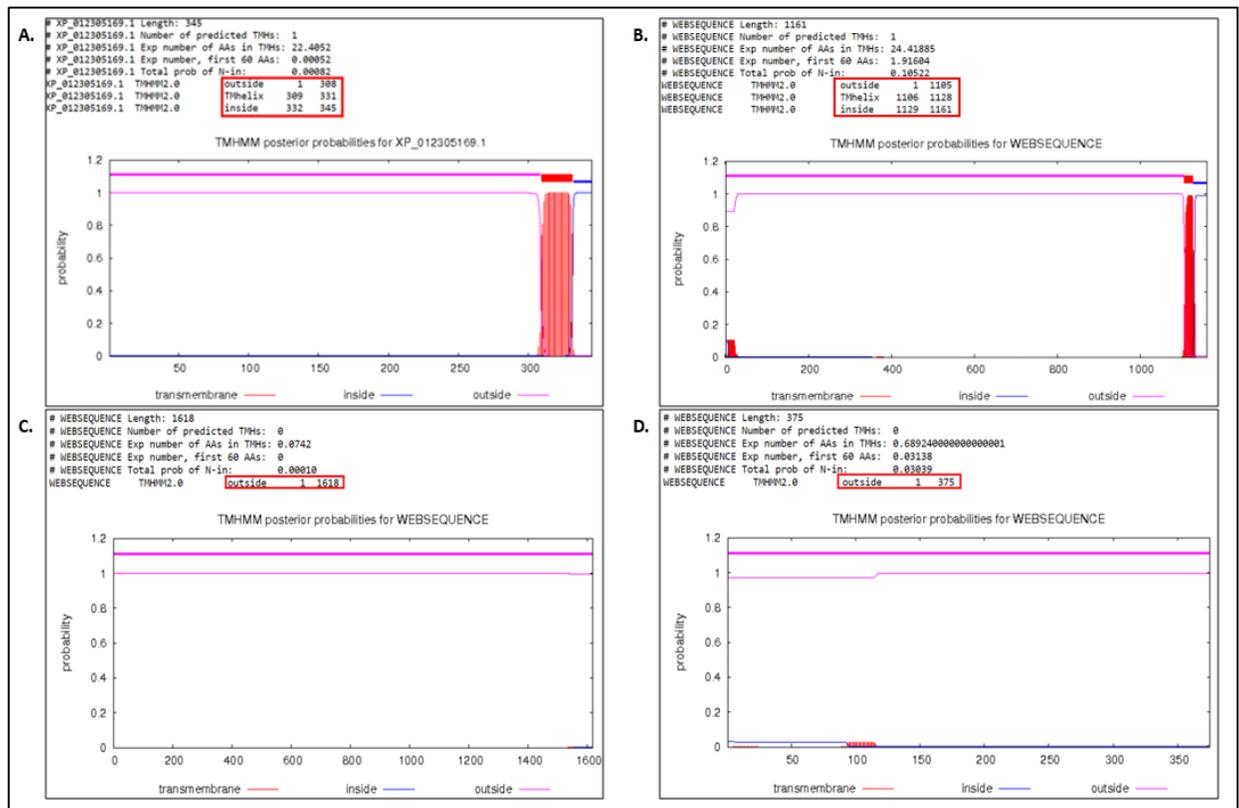
Para la predicción “*in silico*” de los péptidos correspondientes a los receptores de membrana de las células presentadoras de antígeno, en especial células dendríticas; se requirió obtener las secuencias de las proteínas de interés en *Aotus* spp.; las utilizadas para el análisis fueron obtenidas mediante NCBI Protein y se observan en la tabla 2.

CÉLULA DE ORIGEN	RECEPTOR DE MEMBRANA	NÚMERO DE ACCESO (NCBI Protein)	LONGITUD (aa)
CÉLULA DENDRÍTICA	BDCA-1	XP_12305169.1	345
CÉLULA DENDRÍTICA	CD11c	XP_012325376.1	1161
CÉLULA DENDRÍTICA	CD103	XP_021526954.1	1618
MONOCITO	CD14	XP_012324561.1	375

**Tabla 2.** Resumen de los receptores de membrana de células presentadoras de antígeno escogidas para la predicción “*in silico*”, código de acceso de la base de datos NCBI Protein, y longitud (aa: aminoácidos).

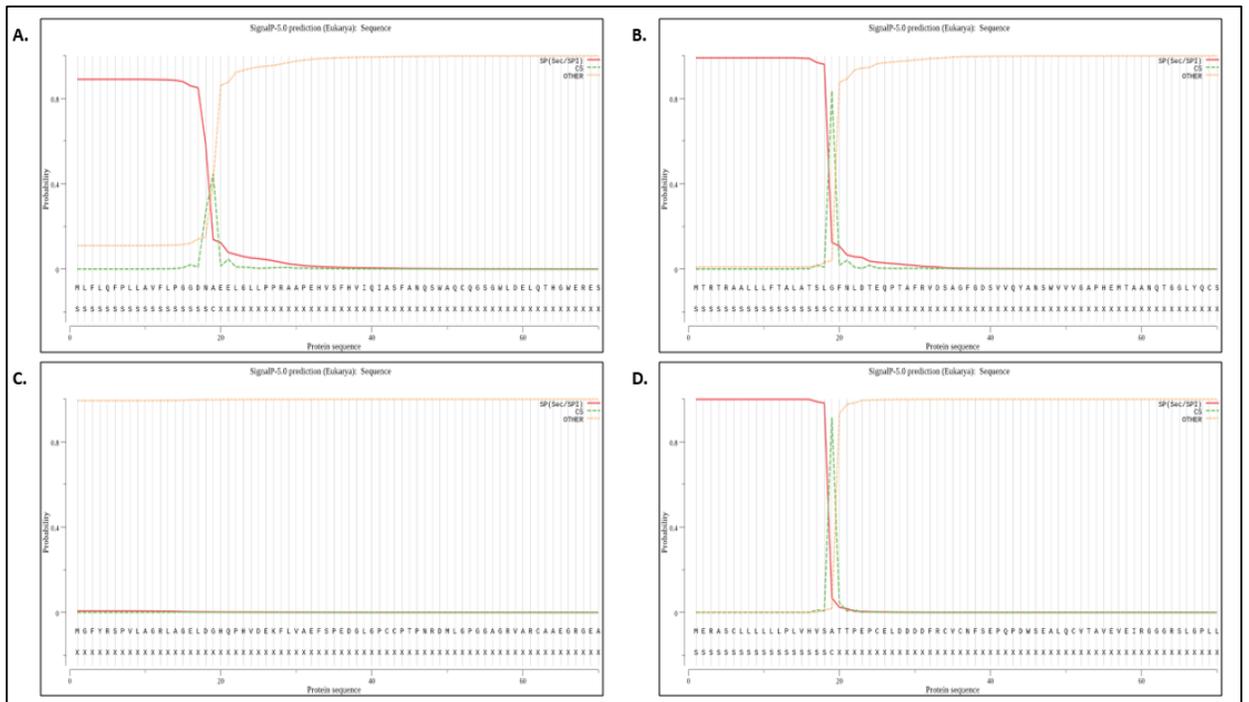
Sobre las secuencias anteriormente mencionadas, se determinó el fragmento extracelular, así respecto a la secuencia correspondiente a BDCA-1 se estableció que su fragmento extracelular estaba entre las posiciones 1 y 308, como se muestra en la figura 2-A. En cuanto a la secuencia del receptor CD11c se definió que su fragmento extracelular está ubicado entre las posiciones 1 y 1105, como se evidencia en la figura 2-B. Así mismo, respecto al fragmento extracelular de CD103 se determinó que la secuencia en su totalidad hace parte del dominio

extracelular, como lo indica la figura 2-C. Por último, el receptor CD14 también se asocia en su totalidad al fragmento extracelular, como se puede observar en la figura 2-D.



**Figura 3.** Predicción del fragmento extracelular mediante TMHMM Server con la secuencia obtenida en NCBI Protein. A: proteína BDCA-1, B: proteína CD11c, C: proteína CD103 y D: proteína CD14

Posteriormente, fue necesario conocer la ubicación del péptido señal dentro de la región extracelular de cada proteína para excluirlo de la predicción “*in silico*”, obteniendo para BDCA-1, CD11c y CD14 la ubicación del péptido señal entre las posiciones 1 a 19 con punto de corte en la secuencia DNA-EE, SLG-FN Y VSA-YY respectivamente, mientras que para CD103 no se presentaba péptido señal, como se evidencia en la figura 3.

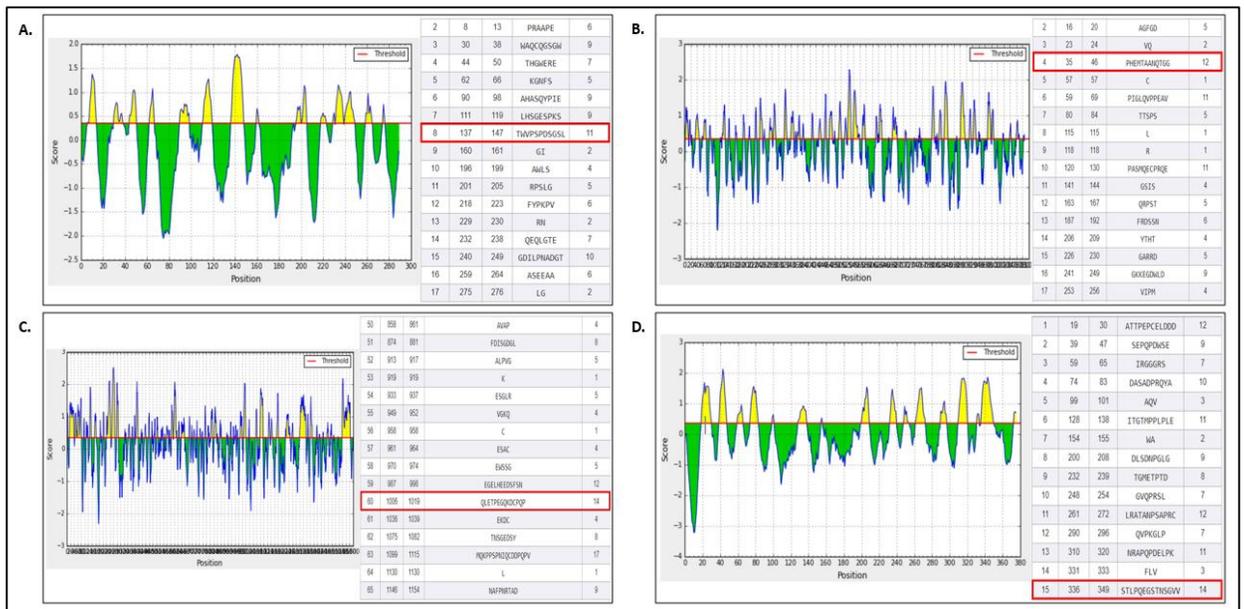


**Figura 4.** Predicción del péptido señal mediante SignalP 4.0 sobre el fragmento extracelular de cada proteína.  
A: proteína BDCA-1, B: proteína CD11c, C: proteína CD103 y D: proteína CD14

Una vez obtenidos los fragmentos extracelulares de las secuencias anteriormente mencionadas y libres del péptido señal, se procedió a identificar los epítopes B de interés, como lo muestra la figura 4.

En el caso de la proteína BDCA-1 la ubicación del epítipo B se da entre los aminoácidos 137 y 147 con una longitud de 11 aminoácidos; la secuencia es TWVPSPDSGSL. En cuanto a la proteína CD11c, el epítipo B tiene una longitud de 12 aminoácidos y está ubicado entre las posiciones 35 a la 46; su secuencia es PHEMTAANQTGG. Por otro lado, para la proteína CD103 su epítipo B se ubica entre las posiciones 1006 a la 1019, con una longitud de 14 aminoácidos; y su secuencia es QLETPEGQKDCPQP. Por último, respecto a la proteína CD14 se

localizó su epítipo B entre las posiciones 336 a la 339, con una longitud de 14 aminoácidos y la secuencia es STLPQEGSTNSGVV.



**Figura 5.** Predicción de los epítipes B mediante IEDB Analysis Resource sobre el fragmento extracelular libre del péptido señal de cada receptor. A: proteína BDCA-1, B: proteína CD11c, C: proteína CD103 y D: proteína CD14

Seguido a la predicción del epítipo B, se procedió a la predicción del epítipo T para cada proteína, como se muestra en la figura 5, se ubicaron estos epítipes T justo antes de los epítipes B anteriormente seleccionados.

<b>A.</b>	H2-IEd	1	121	135	FQVAFKGVALLNFQI	smm	58.33
	H2-IEd	1	122	136	QVAFKGVALLNFQNT	smm	60.89
	H2-IEd	1	123	137	VAFKGVALLNFQNTT	smm	70.55
	H2-IEd	1	124	138	AFKGVALLNFQNTTW	smm	70.16
<b>C.</b>	H2-IEd	1	990	1004	LHEEDFSNASIKVSS	smm	55.38
	H2-IEd	1	991	1005	HEEDFSNASIKVSY	smm	55.09
	H2-IEd	1	992	1006	EEDFSNASIKVSYQ	smm	55.62
	H2-IEd	1	993	1007	EDFSNASIKVSYQL	smm	61.18
<b>B.</b>	H2-IEd	1	19	33	GDSVQYANISWVVG	smm	63.03
	H2-IEd	1	20	34	DSVQYANISWVVGGA	smm	51.59
	H2-IEd	1	21	35	SVVQYANISWVVGAP	smm	53.19
	H2-IEd	1	22	36	VVQYANISWVVGAPH	smm	46.10
<b>D.</b>	H2-IEd	1	317	331	ELPKVDNILLDGNPF	smm	75.29
	H2-IEd	1	318	332	LPKVDNILLDGNPFL	smm	75.78
	H2-IEd	1	319	333	PKVDNILLDGNPFLV	smm	75.78
	H2-IEd	1	320	334	KVDNILLDGNPFLVP	smm	75.78

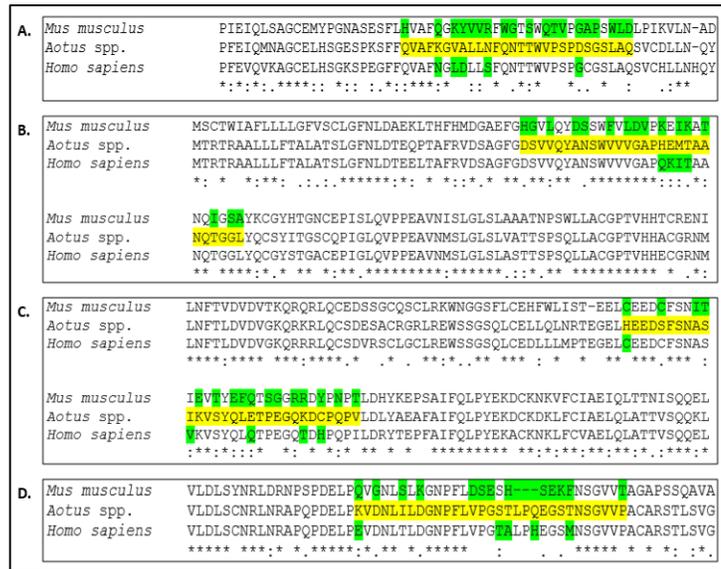
**Figura 6.** Predicción de los epítopes T mediante IEDB Analysis Resource sobre el fragmento extracelular libre del péptido señal de cada receptor. A: proteína BDCA-1, B: proteína CD11c, C: proteína CD103 y D: proteína CD14

Una vez diseñados el epítope B seguido del epítope T para las proteínas CD11c, CD103 y CD14, se adiciono en el extremo del epítope B un aminoácido a la secuencia establecida, con el fin de garantizar la síntesis completa de este epítope, mientras que para BDCA-1 se adicionaron dos aminoácidos en el extremo del epítope B de dicha proteína para completar el mínimo de aminoácidos utilizados en la síntesis química.

Por último, teniendo en cuenta que los péptidos sintéticos provenientes de secuencias de *Aotus* spp. iban a ser inoculados en ratones, se realizó un alineamiento entre las secuencias de *Aotus* spp., *Mus musculus* y *Homo sapiens*, como lo muestra la figura 6; este proceso se realizó con el fin de evaluar la homología entre las proteínas de estudio de estas especies, lo cual garantizaría de un lado, que al momento de inocular los ratones se generaría una buena inmunogenicidad en respuesta a los péptidos inoculados (grado de homología menor al 50% entre *Aotus* spp. y *mus musculus*) y además que a futuro los Anticuerpos obtenidos frente a los péptidos de *Aotus* spp. puedan utilizarse en ensayos con muestras humanas (alta homología entre *Aotus* spp. y *Humano*).

El alineamiento entre las secuencias de interés demostró una homología entre *Aotus* spp. y *Mus musculus* menor del 50% para todas las proteínas. Para BDCA-1 la homología fue del 32.14%, en el caso de CD11c fue del 42.85%, en cuanto a CD103 fue de 46.66% y por último la homología entre las secuencias de CD14 fue del 42.85%.

En lo que respecta al alineamiento entre las secuencias de *Aotus* spp. y *Homo sapiens*; para todas las proteínas se obtuvo una homología mayor al 80%. En el caso de BDCA-1 fue de 82.14%, para CD11c de 85.71%, respecto a CD103 del 83.33% y por último, CD14 del 83.87% como se muestra en la figura 6.



**Figura 7.** Alineamiento entre la secuencia de interés de *Aotus* spp. versus las mismas ubicaciones en *Mus musculus* y *Homo sapiens*. A: proteína BDCA-1, B: proteína CD11c, C: proteína CD103 y D: proteína CD14.

Se comprobó que cada una de las secuencias de marcadores de membrana de las células presentadoras de antígeno de *Aotus* spp. diseñadas cumplieron con los criterios para proceder a su síntesis química; las secuencias completas se mencionan en la tabla 2.

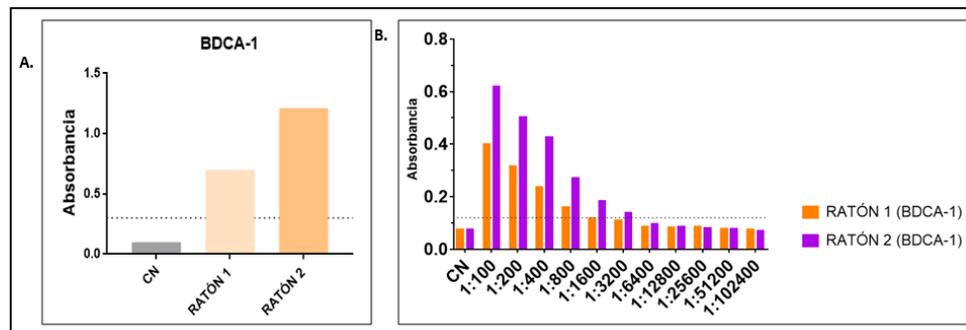
PROTEINA	LONGITUD TOTAL (aa)	LONGITUD DE LA SECUENCIA SINTIETIZADA	SECUENCIA SINTETIZADA
<b>BDCA-1</b>	308	28	122-QVAFKGVALLNFQNTTWVPSDPSGSLAQ-149
<b>CD11c</b>	1105	28	20-DSVYVQYANSWVVGAPHEMTAANQTGGL-47
<b>CD103</b>	1618	29	991-HEEDSFSNASIKVSYQLETPEGQKDCQPQ-1010
<b>CD14</b>	375	30	320-KVDNLILDGNPFLVPSTLPQEGSTNSGVVP-350

**Tabla 3.** Predicción “in silico” de las secuencias a sintetizar de los marcadores de membrana de las células presentadoras de antígeno de monos *Aotus spp.*

## 6. 2 Evaluación de la inmunogenicidad de los ratones

Los ratones fueron seleccionados de acuerdo a la respuesta inmune generada contra el péptido sintético, que se evaluó mediante la reactividad de los sueros post segunda inmunización; y se tituló dicha reactividad con los sueros post tercera inmunización.

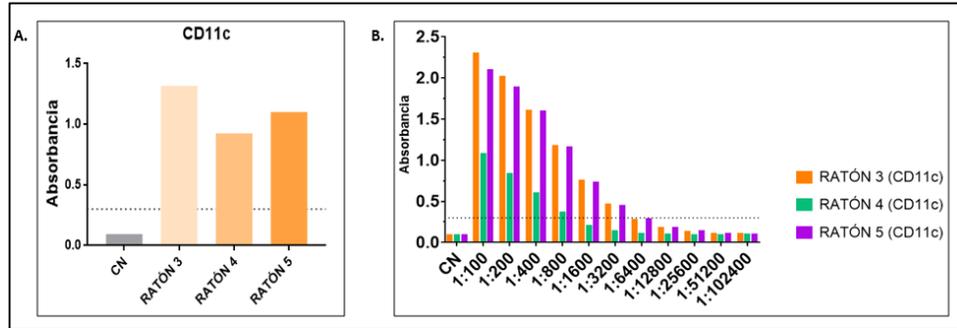
Los sueros post segunda inmunización con el péptido sintético de BDCA-1 mostraron reactividad positiva para los dos ratones, con una mayor reactividad el ratón número 2 (figura 7-A), con los sueros post tercera inmunización se validó que el ratón 2 fue el que mejor respuesta inmune generó, alcanzando títulos hasta la dilución 1:3200; como se muestra en la figura 7-B.



**Figura 8.** Reactividad por ELISA del suero de los ratones inmunizados con el péptido sintético de BDCA-1 (ratón 1 y 2). A: ELISA directa – suero post segunda inmunización y B: ELISA seriada – suero post tercera inmunización.

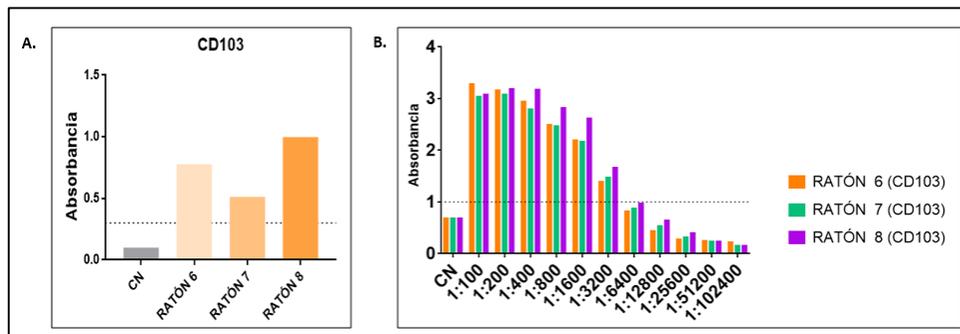
En cuanto a la respuesta generada frente a CD11c, los sueros post segunda inmunización mostraron reactividad positiva en los tres ratones, con una mayor reactividad el ratón número 3, como se muestra en la figura 8-A. Con los sueros

post tercera inmunización se validó que el ratón 3 generaba la más alta respuesta al péptido, alcanzando reactividad hasta la dilución 1:3200; como se ve en la figura 8-B.



**Figura 9.** Reactividad por ELISA del suero de los ratones inmunizados con el péptido sintético de CD11c (ratón 3,4 y 5). A: ELISA directa – suero post segunda inmunización y B: ELISA seriada – suero post tercera inmunización.

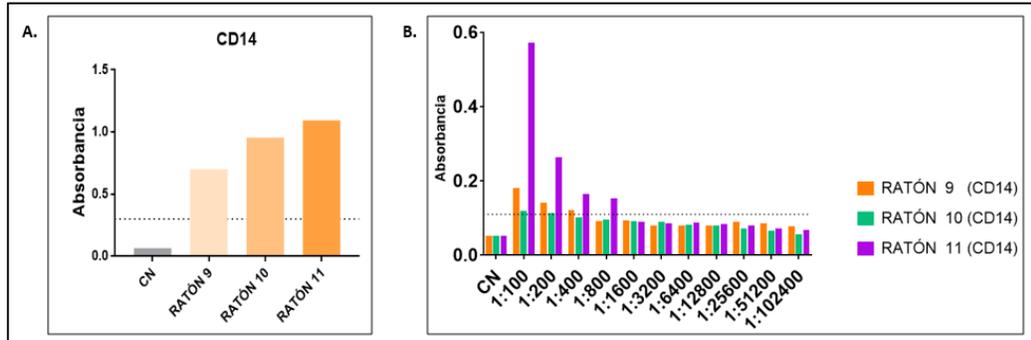
Con relación a la proteína CD103, los sueros post segunda inmunización mostraron reactividad positiva para los tres ratones, con una mayor reactividad el ratón número 8, como lo muestra la figura 9-A; con los sueros post tercera inmunización se validó que el ratón 8 generaba la más alta respuesta, alcanzando su titulación hasta la dilución 1:3200; como se evidencia en la figura 9-B.



**Figura 10.** Reactividad por ELISA del suero de los ratones inmunizados con el péptido sintético de CD103 (ratón 6,7 y 8). A: ELISA directa – suero post segunda inmunización y B: ELISA seriada – suero post tercera inmunización.

Por último, los sueros post segunda inmunización de los 3 ratones inoculados con el péptido correspondiente a CD14 mostraron reactividad positiva, siendo el ratón

11 el que expreso valores más altos, como se observa en la figura 10-A; con los sueros post tercera inmunización se validó que el ratón 11 alcanzo los títulos más altos, hasta la dilución 1:800, como lo soporta la figura 10-B.



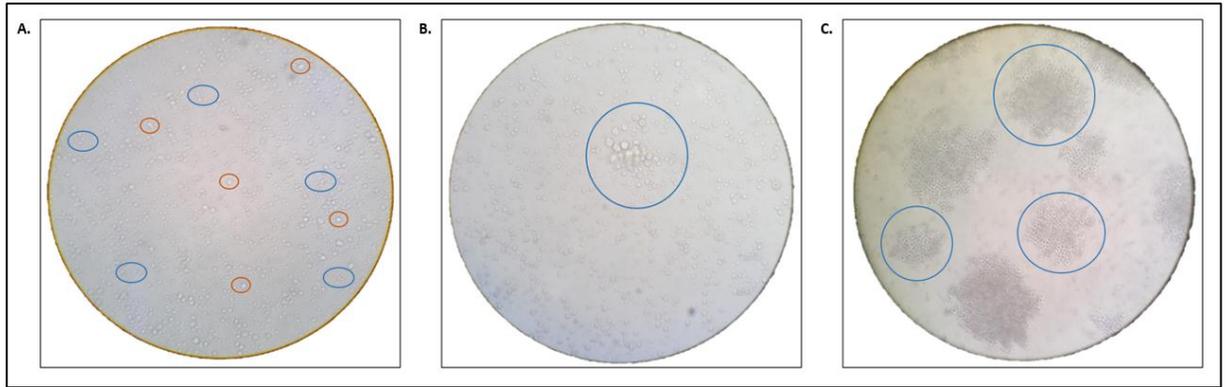
**Figura 11.** Reactividad por ELISA del suero de los ratones inmunizados con el péptido sintético de CD13 (ratón 9,10 y 11). A: ELISA directa – suero post segunda inmunización y B: ELISA seriada – suero post tercera inmunización.

### 6.3 Fusión celular

Una vez realizada la fusión celular entre células de mieloma PAI y los esplenocitos de los ratones seleccionados para cada proteína se realizaron observaciones al día cero, doce y dieciséis.

Al observar el cultivo de la fusión al día cero donde aún no había presencia de clonos, se observaron células de mayor tamaño, con membrana bien definida y refringente que correspondían a las células de mieloma PAI; y células de menor tamaño, con membrana bien definida y refringente que correspondían a los esplenocitos, como se observa en la figura 11-A. En cuanto a la observación del día doce, se evidencio la presencia de la fusión e hibridación celular observando grupos celulares en crecimiento, que se caracterizaban por su tamaño y por la proximidad entre ellas, lo que indicó la formación de clones, como se evidencia en la figura 11-B. Finalmente, al día dieciséis se confirmó la presencia de clonos productores de anticuerpo mediante la observación de grupos celulares grandes,

caracterizados por su homogeneidad de crecimiento y pérdida de refringencia progresiva por su alta celularidad, como se muestra en la figura 11-C.



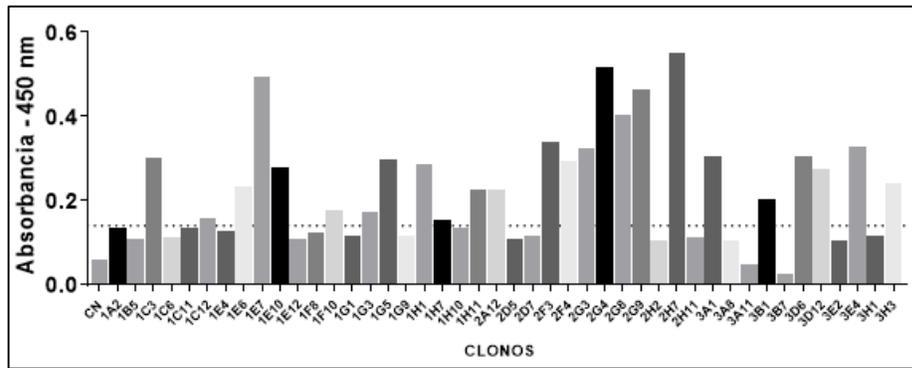
**Figura 12.** Fotografía del cultivo de fusión celular en objetivo de 40X en microscopio de contraste. A: cultivo al día cero; en círculo rojo células de mieloma PAI y en círculo azul esplenocitos. B: Cultivo al día quinto; en círculo azul grupo celular indicativo de formación de clon. C: Cultivo al día doce; en círculo azul clones definidos.

#### 6.4 Evaluación de inmunogenicidad de los clones

Una vez se observó la formación de clones para cada proteína, se procedió a darle un número de identificación a cada pozo con presencia de clones, respecto a su ubicación dentro de las cajas de cultivo.

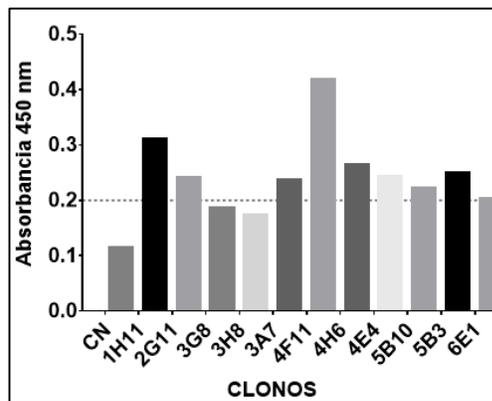
Dichos clones fueron probados sobre el péptido sintético para definir cuales realmente estaban produciendo anticuerpos que reconocieran las proteínas de interés.

En el caso de los clones probados para BDCA-1 se obtuvo un total de 34 pozos con presencia de clones, y se determinó que 25 sobrenadantes generaban reactividad positiva y reacción frente al péptido, como se muestra en la figura 12.



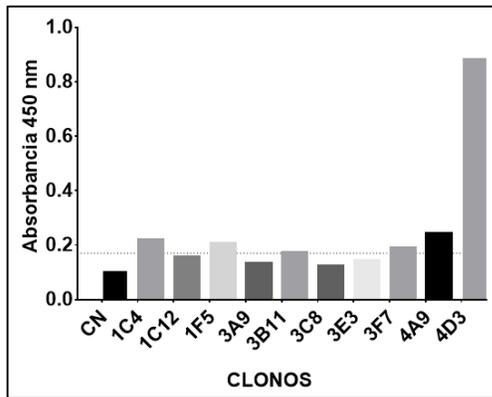
**Figura 13.** ELISA directa de los sobrenadantes de los pozos con clones positivos probados sobre el péptido sintético de BDCA-1.

En cuanto a la proteína CD11c fueron probados 11 sobrenadantes de los pozos que contenían presencia de clones, de los cuales 8 fueron reactivos frente al péptido de origen sintético (Figura 13).



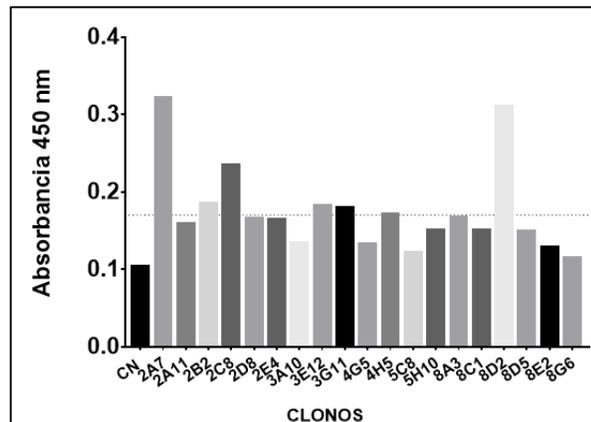
**Figura 14.** ELISA directa de los sobrenadantes de los pozos con clones positivos probados sobre el péptido sintético de CD11c.

Posteriormente, para CD103 fueron probados 10 sobrenadantes productores de anticuerpos, de los cuales 6 fueron reactivos frente al péptido correspondiente a dicha proteína (figura 14).



**Figura 15.** ELISA directa de los sobrenadantes de los pozos con clones positivos probados sobre el péptido sintético de CD103.

Por ultimo, fueron probados 19 sobrenadantes frente al péptido sintético de CD14, con un total de 7 de ellos reactivos (figura 15).



**Figura 16.** ELISA directa de los sobrenadantes de los pozos con clones positivos probados sobre el péptido sintético de CD14

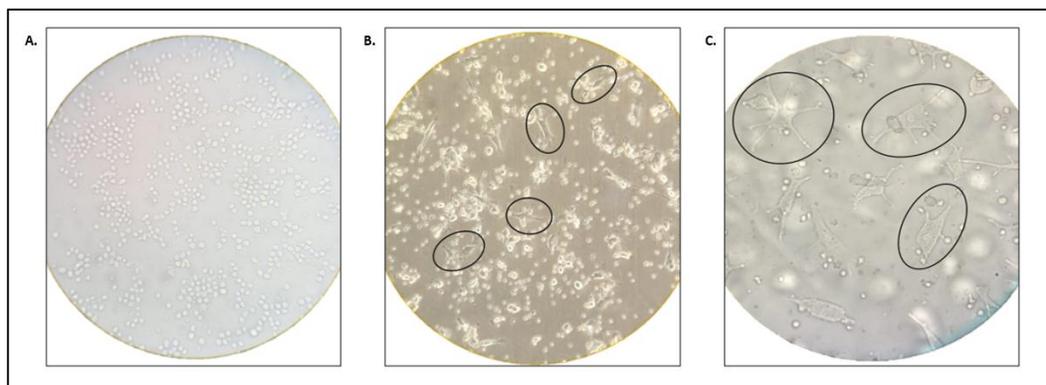
## 6.5 Cultivo de células dendríticas

Una vez pre-seleccionados los clones productores de anticuerpos contra el péptido sintético, fue necesario evaluar la afinidad de estos anticuerpos sobre la célula objetivo, por lo cual se realizó cultivo de células dendríticas para probar los

anticuerpos producidos contra BDCA-1, CD11c y CD103; y en el caso de los anticuerpos contra CD14 fueron probados sobre monocitos.

Las obtenciones de células dendríticas derivadas de monocito tuvieron 3 momentos importantes durante su cultivo; uno en el día cero, otro tras su primer estímulo, y por último con el estímulo final de maduración.

En el cultivo al día cero, se observaron células redondas, de membrana definida y refringentes que correspondían a monocitos, como lo muestra la figura 16-A. Luego, al día quinto, después de haber expuesto el cultivo a los primeros estímulos, se observaron al microscopio células con indicios de prolongaciones y aumento de tamaño relacionando dichas características morfológicas con células dendríticas, como se evidencia en la figura 16-B. Por último, completados los doce días del cultivo, y tras los estímulos de maduración, se observaron al microscopio células con numerosas proyecciones de membrana que se extendían de forma similar a las dendritas de las neuronas, características morfológicas típicas y principales de las células dendríticas, como se observa en la figura 16-C.



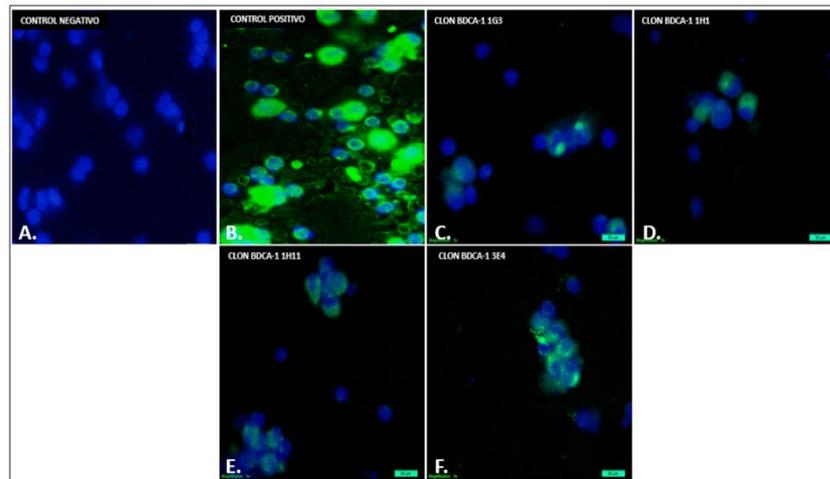
**Figura 17.** Cultivo de células dendríticas observadas al microscopio de contraste en objetivo de 40X.

A: cultivo día cero. B: cultivo al día quinto. C: cultivo día doce.

## 6.6 Evaluación de la afinidad de los clones frente a las células

Ya desprendidas y fijadas sobre láminas de inmunofluorescencia las células dendríticas y los monocitos obtenidos, fueron utilizadas para comprobar que los clones también reconocían su célula objetivo; este paso fue de alta exclusión ya que la disposición conformacional de cada proteína en la membrana de la célula no está bien definida; por lo cual a pesar de que varios clones fueron reactivos frente al péptido sintético, son pocos los que realmente se unieron a su célula diana.

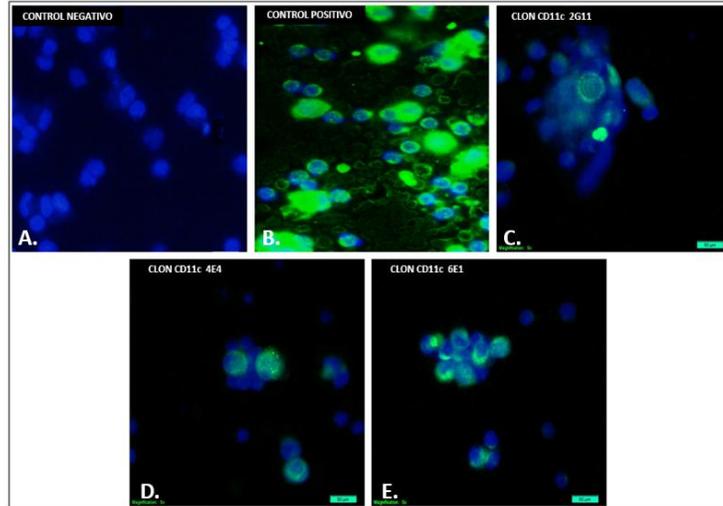
Respecto a los clones positivos frente al péptido sintético de BDCA-1, se evidenció que 4 de ellos reconocieron a las células dendríticas, siendo el clon 1G3 el que presentó la menor fluorescencia y el clon 3E4 la mayor fluorescencia, como lo muestra la figura 17.



**Figura 18.** Inmunofluorescencia de células dendríticas probadas con los clones para BDCA-1, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. En azul los núcleos de las células con DAPI y en verde los anticuerpos reconocidos por Anti ratón FITC. A: control negativo. B: control positivo. C: Clon 1G3. D: Clon 1H1. E: Clon 1H11. F: Clon 3E4.

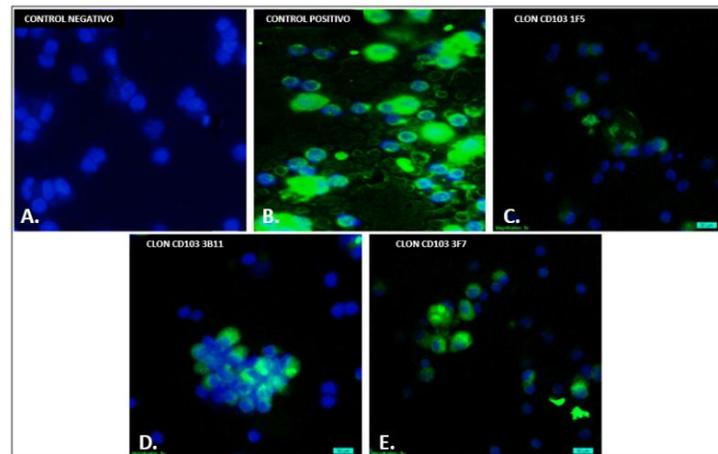
En cuanto a los clones positivos para CD11c, fueron 3 los que reconocieron satisfactoriamente las células dendríticas; siendo el clon 6E1 el que mayor

fluorescencia expreso y el clon 2G11 el de menor fluorescencia, como se observa en la figura 18.



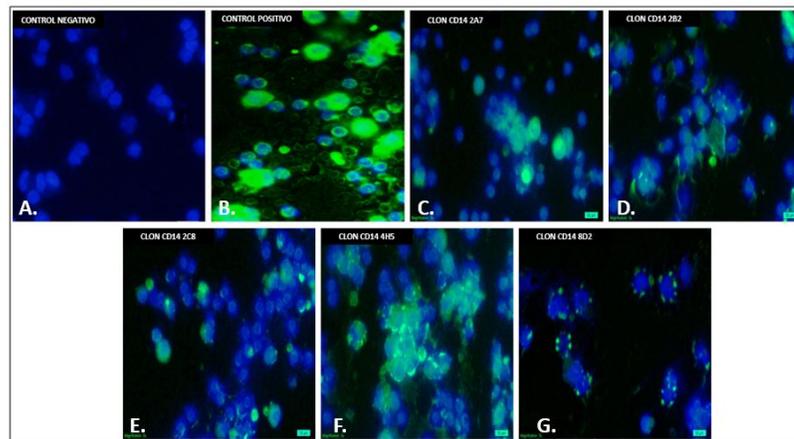
**Figura 19.** Inmunofluorescencia de células dendríticas probadas con los clonos para CD11c, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. En azul los núcleos de las células con DAPI y en verde los anticuerpos reconocidos por Anti ratón FITC. A: control negativo. B: control positivo. C: Clon 2G11. D: Clon 4E4. E: Clon 6E1.

Así mismo, con respecto a los clonos que generaron reactividad a la proteína CD103, fueron 3 los que generaron reconocimiento sobre las células dendríticas; donde en los 3 se observó una fluorescencia similar, como se observa en la figura 19.



**Figura 20.** Inmunofluorescencia de células dendríticas probadas con los clones para CD103, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. En azul los núcleos de las células con DAPI y en verde los anticuerpos reconocidos por Anti ratón FITC. A: control negativo. B: control positivo. C: Clon 1F5. D: Clon 3B11. E: Clon 3F7.

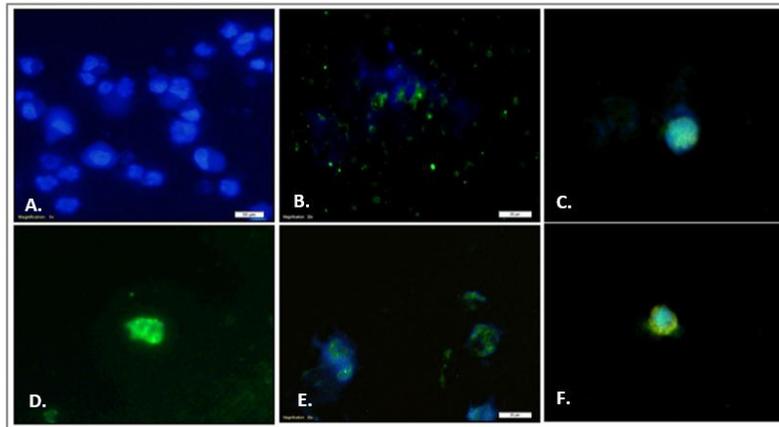
Por último, de los clones reactivos frente al péptido sintético de CD14, fueron 5 los que reconocieron satisfactoriamente a los monocitos, evidenciando una mayor fluorescencia en los clones 4H5 Y 2A7, como lo muestra la figura 20.



**Figura 21.** Inmunofluorescencia de células dendríticas probadas con los clones para CD14, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. En azul los núcleos de las células con DAPI y en verde los anticuerpos reconocidos por Anti ratón FITC. A: control negativo. B: control positivo. C: Clon 2A7. D: Clon 2B2. E: Clon 2C8. F: Clon 4H5. G: 8D2.

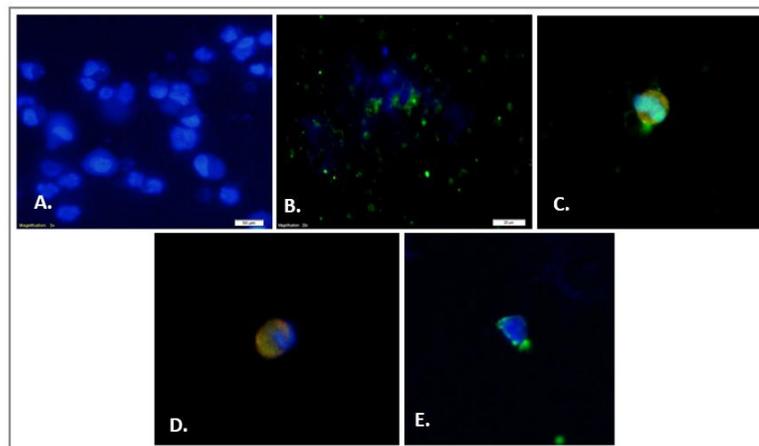
Después de evaluar los clones que presentaron reactividad frente al péptido y adicional a esto se unieron a su célula diana, se determinaron aquellos que superior a 3 semanas fueron estables en cultivo. Se probaron mediante inmunofluorescencia de monocitos de *Aotus spp.*

En cuanto al péptido sintético de BDCA-1 los clones que mostraron positividad en el reconocimiento de las células dendríticas fueron 4. El clon 3E4 presento menor fluorescencia, mientras que el clon 1G3 mostro la mayor fluorescencia, como lo muestra la figura 21.



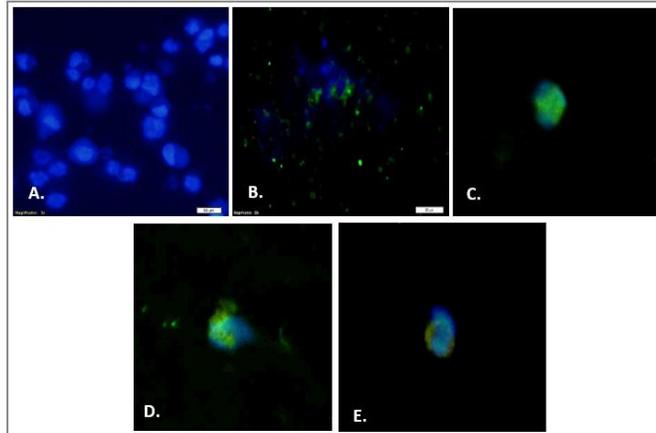
**Figura 22.** Inmunofluorescencia de monocitos de *Aotus spp* probados con los clones para BDCA-1, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. En azul los núcleos de las células con DAPI y en verde los anticuerpos reconocidos por Anti ratón FITC. A: control negativo. B: control positivo. C: Clon 1H11. D: Clon 1G3. E: Clon 3E4. F: Clon 1H1.

Respecto a los clones positivos frente a CD11c, fueron 3 los que reconocieron satisfactoriamente los monocitos. El clon 2G11 presentó la mayor fluorescencia, mientras que el clon 6E1 presentó la menor fluorescencia, como lo evidencia la figura 22.



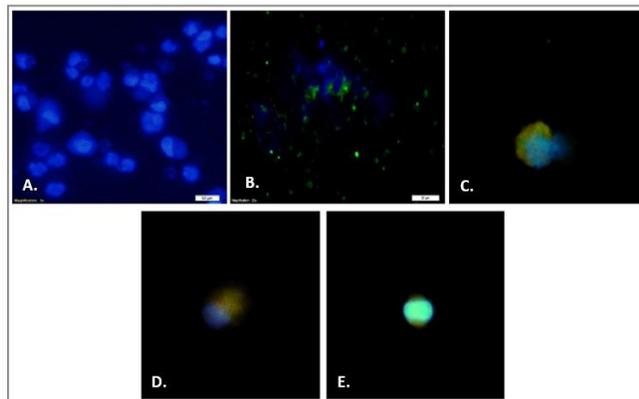
**Figura 23.** Inmunofluorescencia de monocitos de *Aotus spp* probados con los clones para CD11c, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. En azul los núcleos de las células con DAPI y en verde los anticuerpos reconocidos por Anti ratón FITC. A: control negativo. B: control positivo. C: Clon 2G11. D: Clon 6E1. E: Clon 4E4.

De la misma manera, los clones que presentaron reactividad frente a la proteína de CD14 fueron 3. De los clones que presentaron reconocimiento sobre las células monocíticas, el clon 2C8 presentó la mayor fluorescencia mientras que el clon 2A7 presentó la menor fluorescencia, como se observa en la figura 23.



**Figura 24.** Inmunofluorescencia de monocitos de *Aotus* spp probados con los clones para CD14, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. En azul los núcleos de las células con DAPI y en verde los anticuerpos reconocidos por Anti ratón FITC. A: control negativo. B: control positivo. C: Clon 8D2. D: Clon 2C8. E: Clon 2A7.

Por último, los clones que mejor reconocieron los monocitos frente al péptido CD103 fueron 3. La mayor fluorescencia la presentó el clon 3B11, mientras que el clon 1F5 presentó la menor fluorescencia, como lo evidencia la figura 24.



**Figura 25.** Inmunofluorescencia de monocitos de *Aotus* spp probadas con los clones para CD103, observadas en el microscopio de fluorescencia con magnificación 5X. En azul los núcleos de las células con DAPI y en verde los anticuerpos reconocidos por Anti ratón FITC. A: control negativo. B: control positivo. C: Clon 3F7. D: Clon 1F5. E: Clon 3B11.

## 7. DISCUSIÓN

Las células dendríticas cumplen un papel fundamental dentro de la respuesta inmune desencadenada por la presencia de un patógeno o alérgeno, ya que son células que cumplen un papel fundamental intermediando entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, mediante la captura y presentación de antígeno. Son consideradas las células que mejor desempeñan el papel de presentadoras de antígeno por diversas razones como su capacidad para presentar antígeno mediante CMH tipo 1 y 2, y así mismo reconocer antígenos tanto exógenos, como endógenos.

Por lo descrito anteriormente ha sido de gran utilidad caracterizar la actividad de estas células tras la estimulación con candidatos vacunales, y el mecanismo que mejor resultados evidencia para lograrlo es mediante anticuerpos monoclonales, ya que es una herramienta que supone mayor especificidad a pesar de su costo.

Cuando se requirió entender la manera en que las células dendríticas participan durante la respuesta inmune, y su papel dentro de la determinación de si el candidato a vacuna genera protección y memoria frente a *Plasmodium*, surgió la necesidad de producir anticuerpos monoclonales capaces de reconocer estas células para analizar la respuesta inmune desencadenada por los candidatos en monos *Aotus* spp., modelo animal aprobado por la OMS actualmente para dichos estudios.

La predicción de secuencias correspondientes a los marcadores de membrana de las células presentadoras de antígeno de monos *Aotus* spp., requirieron de aminoácidos adicionales a los de interés para asegurar que durante el proceso de síntesis química no se perdiera parte de la secuencia esperada y no disminuyera drásticamente el porcentaje de recuperación; método validado en el trabajo de Rivero y col.<sup>59</sup>; en el cual agregaron 2 o 3 aminoácidos para completar un mínimo de 28 aminoácidos.

Fue también importante disminuir el grado de error mediante el alineamiento de las secuencias de interés en las tres especies involucradas durante el estudio (*Aotus* spp., *Mus musculus* y *Homo sapiens*); Teniendo como punto de partida que la homología entre *Aotus* spp. y *Mus musculus* debía ser menor del 50%, y entre *Aotus* spp. y *Homo sapiens* mayor del 80%. Dichos porcentajes han sido utilizados en diversos estudios como el de Cubides<sup>60</sup>, donde las proteínas que predijo cumplían con este mismo criterio, a pesar de que el alineamiento correspondía a receptores de membrana de linfocitos T de monos *Aotus* spp.

A pesar, de que la predicción de los péptidos a sintetizar mediante herramientas bioinformáticas genera una mayor especificidad, y que dentro de su estructura fueron utilizados epitopes que suponen alta inmunogenicidad, fue necesario potencializar la acción del mismo mediante su acople a KLH, como el realizado por Dillman y col<sup>61</sup>, donde explican que el KLH es una excelente proteína vehículo actuando como determinante antigénico que garantiza mayor inmunogenicidad y la producción de anticuerpos de alto rendimiento actuando como sitio de unión en células T.

Por otro lado, se consideró importante inmunizar a tres ratones con cada uno de los péptidos de interés, al tener en cuenta la variabilidad de respuesta inmune que puede surgir aleatoriamente entre los ratones; hipótesis que se comprobó en el trabajo desarrollado por Amin-Blanco y col.<sup>62</sup>, donde se validó que efectivamente la reactividad frente al péptido variaba entre cada ratón del mismo grupo. Sin embargo, en trabajos como el desarrollado por Barnstable<sup>63</sup>, usaron solo un ratón para la proteína contra la que produjeron anticuerpos monoclonales.

En cuanto al diseño experimental del protocolo de inmunización, se tuvo en cuenta la ruta, dosis y esquema propuestos para la generación de anticuerpos monoclonales de alta afinidad como el realizado por Guerrero y Villarraga<sup>64</sup>, con algunas modificaciones teniendo en cuenta la efectividad del adyuvante utilizado.

Así mismo, la técnica ELISA se estableció como una herramienta sencilla y apropiada para lograr evaluar la reactividad de los sueros de los ratones debido a la alta especificidad y sensibilidad, comentado en el trabajo de Vanasco y col.<sup>65</sup>, quienes concluyen que es la técnica más apropiada para el monitoreo dentro de la producción de anticuerpos monoclonales.

Respecto a la fusión e hibridación, fue usada la línea celular de mieloma PAI, que ha demostrado excelentes resultados debido a su capacidad expansiva como lo mencionan en el trabajo de Dreyer y col.<sup>66</sup>, quienes aseguran que esta línea celular cuenta con una excelente estabilidad y homogeneidad en sus resultados. Respecto a los tiempos de obtención de los clonos productores de anticuerpo se han manejado diversos protocolos en diferentes estudios, como el realizado por Zhan y col<sup>67</sup>; esto ocurre ya que la respuesta e interacción entre los esplenocitos y las células de mieloma difiere notablemente por las relaciones en las que se fusionan, el medio de cultivo utilizado y otros factores influyentes.

Las células madre de las fusiones fueron estables durante casi un mes de cultivo produciendo anticuerpos monoclonales, indicando que estas células pudieron adquirir el gen de la inmunoglobulina dentro de su genoma. Las subclonaciones por dilución limiten se usaron con el fin de obtener el número de células por pozo deseada. El principio básico de la misma, es la preparación de diluciones a partir de una suspensión celular inicial, de tal manera que la probabilidad de que dos células se encuentren en el mismo pozo de una placa de microtitulación al distribuir la misma se haga despreciable. Por otro lado, la clonalidad del hibridoma se asegura con dos clonajes sucesivos; la probabilidad final de que existan mezclas de dos clones en un mismo pozo es prácticamente nula, tal como lo reporta Cubides<sup>60</sup> en su trabajo. Con estas subclonaciones se dio respuesta a la teoría monoclonal, la cual postula que cada linfocito tiene una especificidad de receptor única y, por lo tanto, estaba comprometido a producir solo un anticuerpo después de la estimulación apropiada, según lo mencionado por James W<sup>68</sup>, donde también explica que al igual que las células B, cada célula T tiene una reorganización única de sus genes receptores de antígeno, pero a diferencia de las células B, las células T no tienen mutación somática después de comprometerse con su especificidad inicial.

Igualmente, para este trabajo fue indispensable el cultivo de células dendríticas, las cuales se obtuvieron a partir de los monocitos de sangre periférica. Primero, se obtuvieron células dendríticas inmaduras con la ayuda de IL-4 y GM-CSF asegurando que los monocitos no se diferenciaron a macrófagos; estímulos anteriormente descritos en diferentes estudios como el reportado por Cuellar<sup>62</sup>.

Adicional a esto, fue necesario para su maduración el uso de sobrenadante de células P388, las cuales son productoras de IL1  $\beta$  y IL6. En estudios como el de Renee y col.<sup>69</sup> en donde compararon la producción de hibridomas utilizando

diferentes líneas celulares, donde también hicieron uso de P388 observando que aumenta el porcentaje de hibridomas sobrevivientes y mejora la eficacia de la clonación, lo que llevo a estos autores a afirmar que las citoquinas producidas por las células P388 son útiles dentro de la diferenciación celular y estimulación de diferentes tipos de cultivos celulares.

A medida que se evaluó la reactividad de los clones frente a péptidos sintéticos, células dendríticas de origen humano y células dendríticas de monos *Aotus* spp. fue disminuyendo la cantidad de clones positivos, donde al final de los ensayos se obtuvo en el caso de BDCA-1 que el 16% de los clones positivos frente al péptido sintético fueron también positivos sobre células dendríticas tanto humanas como de *Aotus* spp.; así mismo para CD11c con un 37%, CD103 un 50% y por ultimo para CD14 un 57%.

Lo anterior se relaciona y se apoya teniendo en cuenta que los anticuerpos monoclonales reconocen entre 4 y 6 aminoácidos, sin embargo, las secuencias sintetizadas tienen una longitud mínima de 28 aminoácidos y se requeriría de espectrometría de masas para identificar a que fragmento específico se unió el anticuerpo producido como la realizada por Lesmes<sup>70</sup>. Por lo tanto, cuando se enfrente el anticuerpo al péptido sintético se espera reactividad de un mayor número de clones debido a su disposición lineal y, por el contrario, disminuye notablemente la cantidad de positivos cuando se prueba con las células dendríticas y monocitos debido a la disposición conformacional de los péptidos sobre la membrana celular.

Se plantea como perspectiva del presente trabajo, continuar con la evaluación de la estabilidad y afinidad de los anticuerpos producidos, para posteriormente lograr caracterizar la actividad de las células dendríticas y su rol en la presentación de

antígeno evaluando la aplicabilidad de las microesferas como vehículo de los péptidos candidatos a vacuna, tanto monoméricos como poliméricos frente a *Plasmodium* spp.

## 8. CONCLUSIONES

- El análisis “in silico” de los marcadores de membrana de células presentadoras de antígeno de monos *Aotus* spp., de las proteínas BDCA-1, CD11c, CD103 y CD14, permitió predecir las regiones más inmunogénicas (Epítopes B).
- Una vez generados los hibridomas se obtuvieron clones positivos frente a los péptidos sintéticos y las células diana probados mediante ELISA e inmunofluorescencia.
- Se logró obtener células dendríticas humanas a partir de monocitos de sangre periférica de un donante voluntario tras una primera estimulación con IL-4 y GMCS-F; y una segunda estimulación con células P388D1 productoras de IL-6 e IL - 1  $\beta$ .
- Los anticuerpos monoclonales obtenidos reconocieron el péptido sintético y las células presentadoras de antígeno tanto de humano como de primates no humanos *Aotus* spp.
- Los anticuerpos monoclonales obtenidos podrán ser utilizados en ensayos funcionales para evaluar la cinética de la degradación de las microesferas con péptidos sintéticos dentro de las células dendríticas de *Aotus* spp.

## 9. REFERENCIAS

1. Mendis KN, David PH, Carter R. Human immune responses against sexual stages of malaria parasites: Considerations for malaria vaccines. *Int J Parasitol.* 1990;20(4):497–502.
2. Piper KP, Hayward RE, Cox MJ, Day KP. Malaria transmission and naturally acquired immunity to PfEMP-1. *Infect Immun.* 1999;67(12):6369–74.
3. Taylor-robinson AW. Vaccination against malaria: targets, strategies and potentiation of immunity to blood stage parasites. *Front Biosci.* 2000;(2):16–29.
4. Vega Robledo GB. La respuesta Inmune. *Medigraphic [Internet].* 2008;51(3):128–9. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un083j.pdf>
5. Castillo LV. Producción de anticuerpos monoclonales. *Univ Alcala.* 2015;1–12.
6. Amorim KNS, Chagas DCG, Sulczewski FB, Boscardin SB. Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection. *J Immunol Res.* 2016;2016:1–11.
7. Machado, N.P., Téllez, G.A. , Castaño J. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas Monoclonal. *Asoc Colomb infectología.* 2006;10(3):186–97.
8. de Almeida R, Nakamura CN, de Lima Fontes M, Deffune E, Felisbino SL, Kaneno R, et al. Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies. *MAbs.* 2018;10(1):46–54.
9. Karpas A, Dremucheva A, Czepulkowski BH. A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(4):1799–804.
10. Lagrán ZM De, Díaz-pérez SPJL. Adalimumab : la molécula y el proceso de obtención. 2008;3–9.
11. Naranjo M. Respuesta Alogénica Inducida Por Células Dendriticas

Plasmocitoides [Internet]. 2009. Available from:

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3834/mmng1de1.pdf?sequence=1>

12. Rojas W, Anaya JM, Gomez LM, Aristizabal B, Cano E. Inmunología de Rojas. 2017. 106 p.
13. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991–1045.
14. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: Role in Normal and Pathologic Immune Responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16(1):495–521.
15. Nakanishi K, Yoshimoto T, Okamura H, Tsutsui H. Interleukin -18 regulates both Th1 and Th 2 responses. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:14–6.
16. Makala LHC, Nishikawa Y, Suzuki N, Nagasawa H. Immunology: Antigen-Presenting Cells in the Gut. *J Biomed Sci.* 2004;11(2):130–41.
17. Rodríguez-Gómez, I. Gómez-Laguna, J. Amarilla, Sp. García-Nicolás O, Ramis, G. Pallarés, F.Carrasco L. Las Células Presentadoras De Antígeno Y Su Papel En El Síndrome Reproductivo Y Respiratorio Porcino. *Anales.* 2012;25(1):191–202.
18. Monserrat Sanz J, Martín M, Reyes E, Prieto Martín A. Células presentadoras de antígeno. *Med [Internet].* 2013;11(28):1720–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70548-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70548-1)
19. G. Gallastegui, B. Bernárdez, A. Regueira, C. Dávila, B. Leboreiro. Farmacia Hospitalaria Inmunología Anticuerpos [Internet]. 2017. 1077–1099 p. Available from: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP11.pdf>
20. Stagg AJ, Knight SC. Antigen-presenting Cells. *Encycl life Sci.* 2001;1–8.
21. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science (80- ).* 2010;327(5966):656–61.
22. Chen X, Jensen PE. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008;56(2):77–83.
23. Rodríguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol.*

2005;238(2):67–75.

24. Berkowska MA, Driessen GJA, Bikos V, Grosserichter-wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, et al. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *blood J.* 2011;118(8):2150–9.
25. Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunobiología de Janeway.* 2009. 334–340 p.
26. Itano AA, McSorley SJ, Reinhardt RL, Ehst BD, Ingulli E, Rudensky AY, et al. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity.* 2003;19(1):47–57.
27. Romani BN, Gruner S, Brang D, Eckhart K, Lenz A, Trockenbacher B, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994;180:83–93.
28. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal Type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science (80- ).* 1999;284(5421):1835–7.
29. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, et al. Type I Interferon as a Powerful Adjuvant for Monocyte-Derived Dendritic Cell Development and Activity in Vitro and in Hu-Pbl-Scid Mice. *J Exp Med.* 2000;191(10):1777–88.
30. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med [Internet].* 1997;185(6):1101–11.  
Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9091583>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2196227>
31. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta

induction. *J Exp Med* [Internet]. 2001;194(12):1823–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748283> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2193584>

32. Figdor C, Van Kooyk Y, Adema G. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Immunol Ski Basic Clin Sci Ski Immune Responses*. 2002;2(February):77–84.
33. Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int*. 2017;2017:18–36.
34. Trombetta E, Mellman L. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:975–1028.
35. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, et al. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18(June 2014):767–811.
36. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):621–67.
37. Vernot JP. Mecanismos de procesamiento y presentación de antígeno en el sistema inmune. *Biomed*. 1990;10:54–8.
38. Rock KL, Shen L. Cross-presentation: Underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev*. 2005;207:166–83.
39. Inaba BK, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis C, et al. The Formation of Immunogenic Major Histocompatibility Complex Class II – Peptide Ligands in Lysosomal Compartments of Dendritic Cells Is Regulated by Inflammatory Stimuli. *J Exp Med*. 2000;191(6):927–36.
40. Delamarre L, Pack M, Chang H. Differential Lysosomal Proteolysis in Antigen-Presenting Cells Determines Antigen Fate. *Science* (80- ). 2014;1630(2005):1630–4.
41. Å FRC, Heath WR. The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:416–20.
42. Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev*

- Immunol. 2007;7:929–41.
43. Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system : Antigen-Presenting Molecules for T Cell Recognition of Lipids and Glycolipids. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:297–329.
  44. Wel NN Van Der, Sugita M, Fluitsma DM, Cao X, Schreibelt G, Brenner MB, et al. CD1 and Major Histocompatibility Complex II Molecules Follow a Different Course during Dendritic Cell Maturation. *Mol Biol Cell.* 2003;14(August):3378–88.
  45. Umaña J, Ramirez J, Espinal C, Sabogal E. Primates no humanos para investigación y mantenimiento de *Aotus lemurinus griseimembra*. *Bol sanit panam.* 1984;97(I):44–53.
  46. Gómez A. De monos y humanos : la búsqueda de una estrategia de vacunación antipalúdica basada en péptidos sintéticos. *Infect - Asoc Colomb infectología.* 2011;15(2):75–83.
  47. Liliana B, Bonelo A, Are M. *Aotus* monkeys : their great value for anti-malaria vaccines and drug testing. *Int J Parasitol.* 2002;32:1625–35.
  48. Geskin LJ. Monoclonal Antibodies. *Dermatol Clin [Internet].* 2015;33(4):777–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2015.05.015>
  49. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *Pharmacol.* 2017;6(June):576–88.
  50. Smith SA, Crowe JE. use of Human hybridoma technology to isolate human monoclonal antibodies. *Microbiol Spectr.* 2015;1–12.
  51. Alicia C, Martínez C De. Ética en investigación con animales: una actitud responsable y respetuosa del investigador con rigor y calidad científica. *Rev Latinoam Bioética.* 2008;
  52. Rodriguez E. ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioeth.* 2007;13(1):25–40.
  53. Colombia C de. Ley 84 de 1989 [Internet]. 1989. Available from: <https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=8242>
  54. Ministerio S. Resolución 8430 de 1993 [Internet]. 1993. Available from:

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RE/SOLUCION-8430-DE-1993.PDF>

55. Leary S, Underwood W, Lilly E, Anthony R, Cartner S, Corey D, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals : 2013 Edition. 2013.
56. UDCA U de ciencias ambientales y aplicadas-. Acuerdo 285 Función Sustantiva de la Investigación e Innovación. 2008.
57. Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(15):5131–5.
58. Roccatano D, Colombo G, Fioroni M, Mark AE. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol watermixtures stabilize secondary-structure formation in peptides : A molecular dynamics study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12179–84.
59. Rivero IA, González T. Síntesis en paralelo de decapeptidos en fase sólida y sus afinidades a cationes de interés biológico. *Rev Soc Quim Mex*. 2004;48:310–4.
60. Cubibes R. Producción de anticuerpos monoclonales que reconozcan proteínas de membrana en células de memoria en *Aotus spp*. 2019.
61. Dillman BRO, Shawler DL, Dillman JB, Royston I. Lymphoma With T101 Monoclonal Antibody. *Otago Univ*. 2019;
62. Amin-blanco N, Reyes-lópez F, Camacho-casanova F, Otero-alfaro O, Cuello-pérez M, Núñez-martínez D, et al. Obtención de un anticuerpo monoclonal murino que reconoce al polisacárido capsular Vi de *Salmonella Typhi*. *Vaccimonitor*. 2015;24(2):57–63.
63. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G. Production of Monoclonal Antibodies to Group A Erythrocytes , HLA and Other Human Cell Surface Tools for Genetic Analysis. *Cell Host Microbe*. 1978;14(May):9–20.
64. Guerrero Y, Villarraga J. Elaboración de un anticuerpo monoclonal contra *Leptospira interrogans* serovar pomono. *Univ la Salle*. 2010;
65. Vanasco NB, Lottersberger J. Development and validation of an ELISA for

the detection of leptospire-specific antibodies in rodents. *Vet Microbiol.* 2001;82:321–30.

66. Dreyer AM, Beauchamp J, Matile H, Pluschke G. An efficient system to generate monoclonal antibodies against membrane-associated proteins by immunisation with antigen-expressing mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 2010;10.
67. Taylor P, Zhan W, Wang Y, Fryer JL, Okubo K, Fukuda H. Production of Monoclonal Antibodies ( MAbs ) against White Spot Syndrome Virus ( WSSV ). *J Aquat Anim Health.* 2015;8–18.
68. Goding J. *Monoclonales antibodies: principles and practice.* 1993. 300–367 p.
69. Sugawara RJ, Cahoon BE, Karu AE. The Influence of Murine Macrophage-Conditioned Medium on Cloning Efficiency , Antibody Synthesis , and Growth Rate of Hybridomas. *J Immunol methods.* 1985;79:263–75.
70. Lesmes LP, Gallego GM, Carreño LF, Lozano JM. Actividad funcional de anticuerpos inducidos por péptido-miméticos derivados del antígeno MSP-2 del Plasmodium , como potenciales agentes inmunoterapéuticos en malaria causada por Plasmodium yoelii y Plasmodium berghei en ratones BALB / c. *Rev Colomb ciencias, química y Farm.* 2011;40(1):67–91.