

AAP6121

TESIS  
ED 2001  
97

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO.  
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN.  
ESCUELA DE EDUCACIÓN.  
ESPECIALIDAD CIENCIAS BIOLÓGICAS.



**TIPIFICACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PRODUCIDA POR  
SECUENCIAS PEPTÍDICAS DE *T. cruzi* CON CARACTERÍSTICAS  
PROTECTORAS Y/O PATOGENICAS.**

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Educación,  
Mención Ciencias Biológicas.

**Autor:** Maryam Díaz Pulido.  
**Tutor:** Dr. Luis Briceño.

Caracas, octubre de 2001.

En mi carácter de tutor del Trabajo Especial de Grado titulado: **TIPIFICACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PRODUCIDA POR SECUENCIAS PÉPTÍDICAS DE *T. cruzi* CON CARACTERÍSTICAS PROTECTORAS Y/O PATOGÉNICAS.** realizado por MARYAM DÍAZ PULIDO para optar al título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas, a los 15 días del mes de Octubre de 2001.



---

Dr. Luis Briceño Zoppi.

C.I. N° 5.216.870

A dos personitas que sueño sean grandes y felices:

Sebastián y a mi Bebé...

Al gran HOMBRE que me acompaña:

Álvaro...

A la base de mi vida:

Mariela, Amilcar y Adriana...

**A DIOS...**

Por estar siempre presente en mi vida a pesar de mi resistencia.

LUIS...

Por absolutamente TODO mil gracias!!!

YELITZA...

Por ayudarme a descubrir y asumir mi condición de madre!

WALTER...

Por tu humana y muy cercana compañía!

**A MIS PROFES...**

Que me hicieron descubrir que esto vale la pena.

MARIELA, AMILCAR y ADRIANA...

Sólo por ser mi viejita... y los mejores hermanos.

**GRACIAS!!!**

NILKA, FELIX, RICHARD y ALICIA...

Por el apoyo que recibí en el Laboratorio de Biología Molecular.

ADRIANA...

y a toda tu familia, los adoro!

ÁLVARO...

Por ser un hombre no tan sencillo.

A MIS COMPAÑEROS DE LA CARRERA...

No se imaginan todo lo que aprendí estando con ustedes.

LUISA...

Por el apoyo de una AMIGA!!

KRISTIAN Y GUILLERMO...Por el soporte técnico, gracias.

Y a Todas las personas que han participado en MI HISTORIA...

**ÍNDICE GENERAL.**

<b>Introducción.</b>	1
<b>Objetivos.</b>	15
<b>Materiales y Métodos.</b>	
<b>Materiales.</b>	16
<b>Métodos.</b>	23
<b>Resultados.</b>	31
<b>Discusión.</b>	52
<b>Conclusiones.</b>	60
<b>Bibliografía.</b>	61
<b>Anexos.</b>	65

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	4
<b>Figura 2.</b> Activación de las subpoblaciones de CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .	11
<b>Figura 3.</b> Receptores de membrana de las Células Dendríticas.	14
<b>Figura 4.</b> Protocolo del ensayo de Respuesta Primaria.	26
<b>Figura 5.</b> Protocolo del Experimento de Estimulación <i>in vitro</i> .	29
<b>Figura 6.</b> Protocolo del ensayo de Inmunocitoquímica.	31
<b>Figura 7.</b> Células dendríticas marcadas con CD80.	33
<b>Figura 8.</b> Células de bazo estimuladas con el AgA marcadas con CD80.	42
<b>Figura 9.</b> Células de bazo estimuladas con AgA marcadas con CD23.	44

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Tratamiento estadístico para el experimento de respuesta primaria.	34
<b>Tabla 2.</b> Marcadores en células de Bazo sin estimulación. Grupo control.	36
<b>Tabla 3.</b> Marcadores de superficie en células sometidas a estimulaciones sucesivas. Sensibilizadas con el AgA.	39
<b>Tabla 4.</b> Marcadores en células de Bazo estimuladas sucesivamente con el Péptido 152.	45
<b>Tabla 5.</b> Células purificadas de Bazo, provenientes de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> . Fase crónica.	49
<b>Tabla 6.</b> Comparación de los resultados de los tres tratamientos ensayados.	50

**ÍNDICE DE GRÁFICAS.**

<b>Gráfica 1.</b> Marcadores linfocitarios en células de Bazo sin estimulación sucesiva. Grupo control.	37
<b>Gráfica 2.</b> Marcadores de células activadas en cultivos celulares sin estimulación sucesiva. Grupo control.	37
<b>Gráfica 3.</b> Marcadores de linfocitos B activados en células de Bazo sin estimulación sucesiva. Grupo control.	38
<b>Gráfica 4.</b> Marcadores Linfocitarios en células estimuladas con AgA.	40
<b>Gráfica 5.</b> Marcadores de células activadas en cultivos celulares estimulados con AgA.	41
<b>Gráfica 6.</b> Marcadores de células B activadas en la preparación celular estimulada con el AgA.	43
<b>Gráfica 7.</b> Marcadores linfocitarios en células de Bazo estimuladas con el péptido 152.	46
<b>Gráfica 8.</b> Marcadores de células activadas en cultivos celulares estimulados con el péptido 152.	47
<b>Gráfica 9.</b> Marcadores de células B activadas en cultivos celulares estimulados con el péptido 152.	48
<b>Gráfica 10.</b> Comparación entre los tres tratamientos.	51
<b>Gráfica 11.</b> Estimulación con diferentes preparaciones de péptidos.	66

## INTRODUCCIÓN

### **Consideraciones generales.**

La enfermedad de Chagas o trypanosomiasis Americana es una zoonosis causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, descrito por primera vez en 1909, por Carlos Chagas, en Minas Gerais, Brasil (Chagas, 1909).

Además del parásito, la pobreza es uno de los factores asociados con esta enfermedad, hecho que la hace poco atractiva para las industrias farmacéuticas, a pesar que la misma representa un grave problema de salud pública en diferentes países de Centro y Sur América, donde la enfermedad es endémica. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, ésta es la enfermedad tropical más común en América Latina, donde existen alrededor de 90 millones de personas expuestas al riesgo, por habitar en zonas endémicas. Se calcula que 24.7 millones estén parasitadas por el *T.cruzi* (Hayes y col, 1990). Y alrededor de un 25% ( $6.2 \times 10^6$  personas) desarrollará algún tipo de trastornos cardíacos, con el consecuente riesgo de complicación y muerte.

En Venezuela, la infección por *T.cruzi* ha sido detectada en la mayoría de los estados, reportándose los mayores índices en los estados Portuguesa, Lara, Barinas, y Monagas (Añez y col, 1996). Es importante destacar que un

70% de la población Venezolana vive en zonas endémicas (M.S.A.S, año 6).

### **Agente etiológico.**

El *Trypanosoma cruzi*, es un parásito digenético que alterna, durante su ciclo de vida natural, entre dos grupos de huéspedes: uno intermediario, formado por numerosas especies de insectos de la subfamilia Triatominae, familia Reduvidae del orden hemíptero, de hábitos hematófagos (insecto vector), y otro definitivo que puede ser cualquier mamífero, incluyendo al hombre.

Las diferentes formas evolutivas que puede presentar el *T. cruzi*, van a depender del huésped parasitado: en el hombre y otros vertebrados pueden observarse formas tripomastigotas en la sangre y amastigotas en los tejidos; mientras que en el huésped invertebrado se observan las formas epimastigotas y tripomastigotes metacíclicos (Homez y col, 1989). Las formas epimastigote y amastigote, representan la forma replicativa, mientras que la forma tripomastigote es la infectiva.

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoo con un complejo ciclo de vida en el que cada estadio se desarrolla en un ambiente específico, con una morfología diferente y con características metabólicas distintas, todo lo cual se manifiesta en una composición antigénica cambiante según la forma que se considere (Kloetzel y col, 1975) (Santiago y col, 1981) (Snary y col, 1981).

Asimismo, diferentes cepas del parásito tienen un tropismo distinto por las células o tejidos del hospedero, pudiendo provocar trastornos distintos. La variabilidad de cepas también se manifiesta en diferencias antigénicas detectables por diversas metodologías (Andrade y col, 1981).

### **Ciclo de vida.**

El ciclo biológico de *T. cruzi*, comienza cuando un triatómino sano se alimenta de un mamífero infectado, e ingiere tripomastigotes circulantes junto con la sangre. En el tubo digestivo del vector, el parásito se redondea y se diferencia a epimastigote, el cual se reproduce activamente, por fisión binaria en el intestino medio del insecto. Los epimastigotes migran a la ampolla rectal donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infectantes. La transmisión del vector al hombre se facilita debido a que el vector defeca de forma refleja sobre la piel, inmediatamente después de alimentarse. Si se trata de un vector infectado, éste deposita las deyecciones cargadas de tripomastigotes metacíclicos. Los parásitos pueden penetrar por el mismo orificio de la picadura o directamente a través de las mucosas, invadiendo las células adyacentes. En el interior de éstas, los parásitos se redondean y se diferencian a amastigotes, forma bajo la cual se multiplica por fisión binaria simple. Después de varios ciclos de división, y previo a la ruptura de la célula, los amastigotes se diferencian a tripomastigote, los cuales pueden invadir nuevas

células o pasar al torrente sanguíneo, donde otro huésped invertebrado, puede adquirir el parásito, manteniéndose así el ciclo.

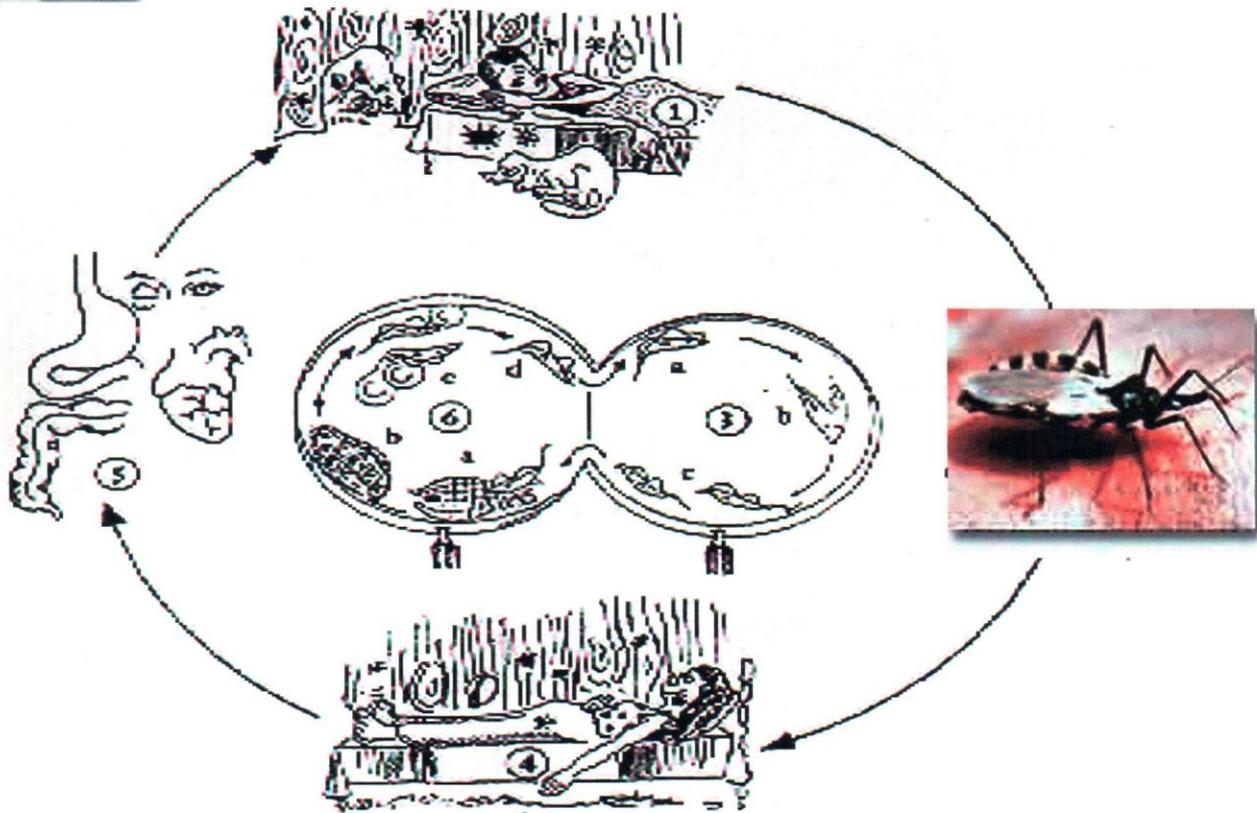


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

### **Vías de transmisión.**

La vía más importante de transmisión en áreas endémicas es la vectorial, que como ya se ha mencionado, ocurre a través de las deyecciones de diversas especies de triatóminos hematófagos y está asociada a dos circunstancias como son: 1) Las condiciones de la vivienda. Este factor es de gran importancia para el mantenimiento de la endemidad de esta patología. Las construcciones con techos de paja o palma, paredes de barro (bahareque) o de tablas mal ajustadas, cartones, etc., condicionan que el triatómino viva en las grietas de las paredes o en los techos (Homez y col, 1989). 2) Las migraciones de la población. Debido al movimiento de individuos sanos a las áreas endémicas o los individuos infectados a zonas no endémicas. Esta última opción, es particularmente relevante para la otra forma de transmisión.

La vía transfusional constituye la segunda forma más importante de transmisión del *T.cruzi* en Latinoamérica, estimándose una prevalencia del 7.4%, con una incidencia estimada en 850.000 casos nuevos por años (Hayes y col, 1990). Actualmente, la vía transplacentaria es uno de los mecanismos menos frecuentes de transmisión.

### **Formas clínicas.**

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad varían según la etapa de la infección. En la **fase aguda** puede observarse una sintomatología variada,

con signos pagtonómicos (Signo de mazza-romaña, Chagoma de inoculación), además de manifestaciones sistémicas comunes a otras enfermedades. Esta etapa ocurre con mayor frecuencia en niños, donde puede ser mortal, mientras que en el adulto puede pasar desapercibida o presentarse en forma moderada. En esta fase, los Trypanosomas pueden ser detectados en sangre, debido a que frecuentemente se producen altos niveles de parasitemia. Estos elevados niveles de parasitemia, son posteriormente controlados por la respuesta inmune. Sin embargo, esta respuesta no erradica completamente al parásito, manteniéndose una parasitemia subpatente durante toda la vida del hospedador.

Una vez superada la etapa aguda los individuos infectados pasan por un período sin sintomatología clínica, llamada **fase indeterminada o asintomática**. Esta fase es de evolución lenta, generalmente entre 10 y 20 años, entre el final de la fase aguda y el establecimiento de las lesiones cardíacas en la etapa crónica, en aquellos pacientes que van a desarrollar cardiomiopatía (25-30%) (Laranja y col, 1956). En apariencia, la sero reactividad para *T.cruzi* es lo único que diferencia clínicamente a un paciente en esta etapa de un individuo normal, tomando en cuenta la falta de evidencias de daño cardíaco y/o digestivo. Ahora bien, no todos los pacientes en esta fase desarrollan daño cardíaco. La mayor parte (aproximadamente 70%) convive

con el parásito durante toda su vida, sin presentar problemas cardíacos aparentes.

Al considerar la evolución de estos pacientes según Andrade y col, 1983 podremos definir dos posibilidades: 1) que permanezcan en la misma situación en forma de "curación" aparente o de enfermedad no progresiva el resto de su vida. 2) Desarrollo de patología, caracterizada por lesiones cardíacas, sobreviniendo la muerte, a causa de insuficiencia cardíaca o arritmias graves, o trastornos de conducción avanzados, por el daño miocárdico global. Este período se caracteriza por la lenta evolución y por el predominio del daño cardíaco, lo que origina la llamada miocardiopatía chagásica crónica.

Dos hipótesis se han presentado a fin de tratar de explicar el origen etiológico de la enfermedad. Hasta hace pocos años, se aceptaba como una realidad que la enfermedad de Chagas, es una patología autoinmune. Sin embargo, dado el poco soporte experimental que ha tenido esta teoría y desarrollo de nuevas técnicas que han demostrado la existencia del parásito, y a su vez correlacionado con el daño, la opción de daño por un proceso de hipersensibilidad tardía, ha cobrado más fuerza. No obstante, en los actuales momentos, el debate continúa.

Lo antes expuesto, reabre un conjunto de alternativas de estudio. Una de ellas, es la búsqueda de antígenos o epítopes que cambien la respuesta inmune patogénica o conseguir los necesarios para una inmunoterapia.

En este contexto, el laboratorio de Fisiopatología del Instituto de Biomedicina de la UCV, durante 24 años, ha estudiado comparativamente la respuesta inmune de los pacientes asintomáticos (asint) y los que desarrollan la Miocardiopatía chagásica (CDM).

A continuación presentamos algunas de las evidencias experimentales que los han llevado a postular la hipótesis del equilibrio dinámico (Figura 2), la cual sugiere que la diferencia entre estos grupos de pacientes obedece a cambios en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune.

1. Los pacientes infectados dan respuesta proliferativa en presencia de antígenos de *T. cruzi*. No se pudo demostrar supresión total o anergia (Mosca y col, 1979; Mosca y col, 1980). No se observaron diferencias significativas en la respuesta proliferativa entre los pacientes asintomáticos y los CDM.

2. Sobre la base de los hallazgos antes mencionados, se realizó un estudio longitudinal para demostrar si existían diferencias linfoproliferativas temporales entre las respuestas de los pacientes y a su vez correlacionarlos con la presencia o no del parásito (Mosca et al, 1985). Los resultados obtenidos muestran la existencia de dos subgrupos en los pacientes asintomáticos como consecuencia de correlacionar los resultados del xenodiagnóstico con la intensidad de la respuesta proliferativa. En el subgrupo con el xenodiagnóstico positivo se observó una respuesta proliferativa menor que la observada en el grupo con xenodiagnóstico negativo. A diferencia de los asintomáticos, en los pacientes con CDM la respuesta proliferativa fue similar en ambos subgrupos, lo que condujo a la primera evidencia respecto a la existencia de diferencias en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune entre los diferentes grupos de pacientes.

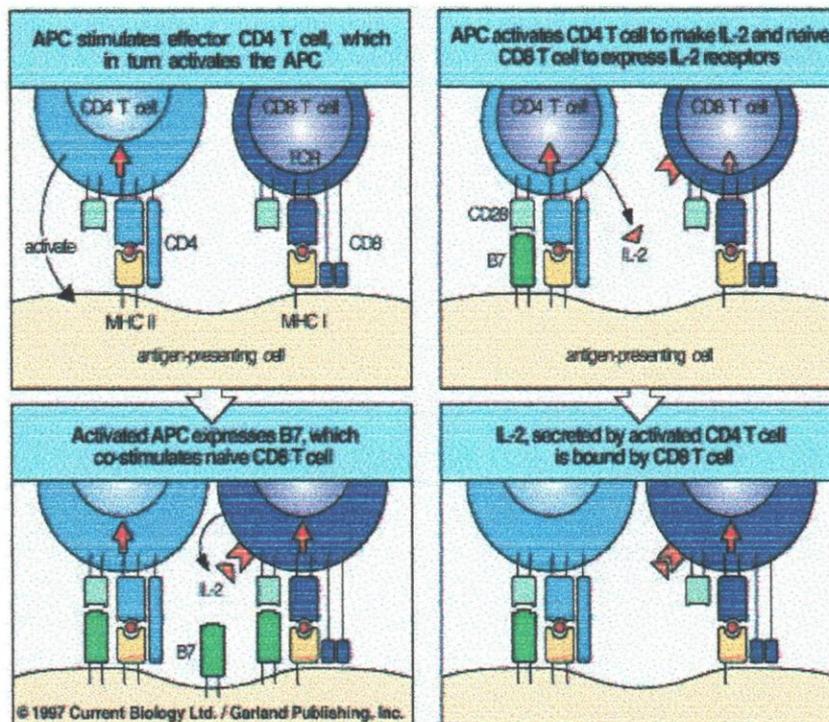
3. Se demostró que el mecanismo de regulación inespecífica, vía prostaglandinas, se encuentra ausente en los pacientes con CDM.

4. Respecto a la existencia de mecanismos de supresión, se evaluó la inducción de supresión específica por parte de los antígenos de *T. cruzi* (Mosca, W. y Briceño L., 1987). Se demostró un elevado porcentaje por parte de las células mononucleares de los pacientes infectados en comparación con los individuos sanos, dicha supresión resultó más elevada en los pacientes asintomáticos que en los CDM.

5. Respecto a los mediadores solubles y en particular con la cinética de producción de IL-2 (Mosca, W. Y Briceño L., 1987), se obtuvo que con mitógenos las células mononucleares de los pacientes infectados produjeron niveles menores que los controles sanos. La producción de IL-2 ante la presencia del antígeno específico, fue menor en los pacientes con CDM que en los pacientes asintomáticos.

6. Para determinar si existía relación fisiológica respecto a la producción de IL-2 disminuida, se aplicó un pulso de la interleucina en ensayos linfoproliferativos en presencia de antígenos de *T. cruzi* (Briceño y col, 1989). Se demostró que la adición de la interleucina produjo efectos contrarios entre los dos grupos estudiados, encontrándose que la respuesta de los pacientes con CDM se incrementó, en presencia de IL-2.

7. Como consecuencia de los estudios anteriores se evaluaron las respuestas linfoproliferativas entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, obteniéndose diferencias en los pacientes asintomáticos, sobre todo en la subpoblación de linfocitos CD4<sup>+</sup>, respecto a la observada en pacientes con CDM.



**Figura 2. Activación de las subpoblaciones CD4 y CD8.**

Todos estos experimentos en conjunto refuerzan la idea de diferencias entre los mecanismos de regulación de la respuesta inmune entre los pacientes asintomáticos y pacientes con CDM. Sin embargo para profundizar en la investigación, se pensó en evaluar la respuesta ante antígenos más específicos, ya que si existían diferencias entre los mecanismos de regulación, podrían también existir diferencias específicas entre las respuestas de los pacientes infectados (Asint. y CDM). Para obtener dichos antígenos se realizaron experiencias linfoproliferativas con bandas electroforéticas, provenientes de fracciones subcelulares de *T. cruzi* (técnica de T cell blot). Se observaron respuestas específicas en cada una de las formas clínicas (asint. y CDM). Un hecho relevante en este estudio fue que la mayor parte de las bandas, tenían características supresoras.

Al observar diferencias entre las respuestas de los pacientes infectados (Asint. y CDM), se decidió realizar experiencias con modelos experimentales para demostrar las funciones de algunas de las bandas obtenidas.

Teniendo en cuenta que algunas de las bandas presentaban un gran porcentaje de supresión en pacientes asint. y también varias que inducían una respuesta proliferativa diferente entre los dos grupos de pacientes estudiados, se tomaron éstos criterios para la escogencia de las bandas a evaluar.

Aquellas bandas que presentaron protección o patogenicidad, se les realizaron diferentes aproximaciones experimentales con el fin de purificarlas. Como resultado de ello, se semipurificaron algunas proteínas y se obtuvieron secuencias peptídicas de algunas de ellas. Con relevancia a este trabajo de tesis, destacamos dos secuencias peptídicas una con características protectoras (péptido 152) y otra patogénica (péptido 150), las cuales fueron obtenidas a partir de una misma banda de proteínas.

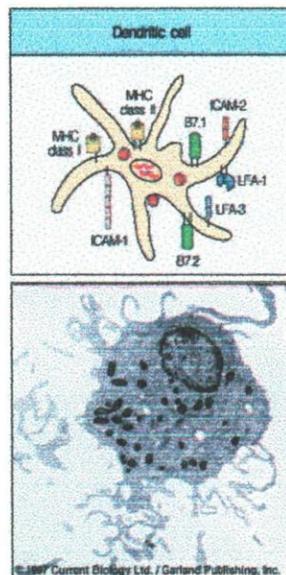
Ahora bien, si al final del proceso de investigación, se desea obtener una combinación de epítopes que confieran protección, es necesario previamente generar información básica de cómo se dan los procesos de respuesta. Por ejemplo, las características de la respuesta inmune inducida por estos péptidos con propiedades antagónicas, nos lleva a formular preguntas como estas: ¿Existen condiciones específicas para que los péptidos tengan las características protectoras o patogénicas?... ¿Cómo se desarrolla la respuesta inmune ante dichas secuencias peptídicas?. ¿ Al final del proceso de inducción, que subpoblaciones están respondiendo?. Estos planteamientos nos invitan a la búsqueda de respuestas y en este contexto se enmarca el presente trabajo de tesis.

El trabajo se concibió como una primera aproximación, para comenzar a responder estas preguntas y para evaluar los modelos experimentales que se van a emplear en el futuro mediato.

En este orden de ideas, decidimos evaluar la respuesta inmune primaria con un modelo experimental puesto a punto por la Dra. Fermín( Alvarado E. 2000 y otros ), en nuestro Instituto, pero con antígenos particulados. El modelo incluye una línea celular dendrítica compatible con los ratones donde se realizarían los estudios con los péptidos. La razón de emplear las células dendríticas, es que ellas son excelentes presentadoras de antígenos (O'Neill, 1997), son responsables de la estimulación de los linfocitos T "vírgenes" (Thery C, 2001) y muchas de ellas pueden estar participando en los procesos primarios de la respuesta inmune, en la infección natural, con el insecto vector.

Las células dendríticas son comúnmente las primeras células inmunológicas en encontrarse con los organismos externos. Estas células juegan un papel importante en la generación de inmunidad protectora ante parásitos intracelulares. Su papel en la infección experimental con *T. cruzi*, se desconoce. Sin embargo, su participación como célula presentadora de antígeno (CPA) es indiscutible.

La respuesta efectiva del tipo Th1 (en términos generales), sugerida como esencial para la generación de inmunidad ante el parásito; que promueve la producción de citóquinas tales como IL-12, y el  $\gamma$ -interferón, a sido también descrita para las células dendríticas.



**Figura 3. Receptores de membrana de las células dendríticas.**

El análisis de las subpoblaciones de memoria que participan en el proceso, nos dará una información importante de no solo cuales subpoblaciones están actuando, sino también, sobre quienes se pueden ejercer los procesos de inmunomodulación. El estudio fue concebido a través del uso de modelos experimentales de sensibilización, que funcionan en el laboratorio y con procesos de estimulación sucesiva in vitro, a fin de tratar de ubicar las subpoblaciones de interés.

Siguiendo este orden de ideas, se decidió plantearnos los objetivos que se enumeran a continuación.

## OBJETIVOS.

### **Objetivo General:**

Estudiar la respuesta inmune, inducida por células dendríticas estimuladas con secuencias peptídicas protectoras o patogénicas de *T. cruzi*, en modelos experimentales murinos.

### **Objetivos específicos:**

1. Evaluar las manifestaciones funcionales de las células dendríticas, en presencia de los antígenos a estudiar.
2. Estudiar la capacidad in vivo de las células dendríticas, que ha sido estimuladas con diferentes antígenos, para inducir una respuesta inmune primaria.
3. Evaluar in vitro la expansión preferencial de subpoblaciones de linfocitos T estimulados con las células dendríticas estimuladas.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### MATERIALES.

#### 1. Soluciones y Medios:

**Solución de Hayem:** Esta solución se utilizó para el conteo de las células proveniente del bazo y permite que los eritrocitos que hayan podido quedar en la muestra se lisen. La solución se preparó con Ácido acético glacial al 1%, en agua bidestilada, agregando posteriormente cristales de azul de metileno hasta que la solución tomara una coloración ligeramente azulada.

**Azul tripano:** Esta solución se utilizó para medir la viabilidad de las células. Se pesaron 0,4 gr de azul tripano y se diluyeron en 90 ml de PBS. La solución se hirvió para asegurar la dilución. Se completa el volumen a 100 ml. El pH de la solución se ajustó a 7.2 - 7.3.

**Solución para desgrasar láminas:** Las láminas que se utilizaron para colocar las muestras fueron desgrasadas para evitar la presencia de sustancias que pudieran hacer variar la muestra. La solución contiene 20% de ácido acético y 15% de metanol, en agua destilada.

**Suero fisiológico Buffer (PBS) pH 7.2:** El PBS se utilizó en los procedimientos que necesitaron un control del pH y para los diferentes lavados. La composición del medio: 0,002 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

0,010 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

0,145 M de NaCl.

**Solución para el revelado:** Esta solución se utilizó para revelar los ensayos de inmunocitoquímicas. Se utilizó un Kit de sustrato peroxidasa NovaRED de los laboratorios Vector.

**Solución de amplificación:** Es un complejo de avidina-biotina peroxidasa que permite amplificar la reacción. Se utilizó Kit ELITE de Laboratorios Vector.

**Medio para el trabajo con las células dendríticas:** Se utilizó el medio comercial Iscove's Modified Dulbeccos Medium (IMDM), el cual fue suplementado con 100 U/ml de penicilina; 0,1  $\mu$ g/ml de estreptomicina; 0,05 mM de  $\beta$ -mercapto etanol; 2mM de glutamina y 5% de suero fetal bovino (este suero se utilizó en los experimentos in vitro). En los experimentos in vivo, donde se les inoculaba las células dendríticas a los ratones, se utilizó suero de ratón para que no ocurriese ninguna reacción de rechazo. El suero de ratón fue previamente preparado basado en la sangre de ratones.

**Medio para el experimento de respuesta de memoria:** Se utilizó el medio RPMI suplementado con 0,05 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 ml de suero fetal bovino (10%), estas cantidades se agregan para preparar 50 ml de medio.

## 2. Animales.

**Ratones:** Se emplearon ratones isogénicos BALB/c, con 8 semanas de edad. Por razones de extrema compatibilidad que requerían las células dendríticas, un grupo fue adquirido en el bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), mientras que para las pruebas de memoria inmunológica fueron suministrados por el Bioterio del Instituto de Biomedicina.

### 3. Líneas celulares.

**Células dendríticas:** Se utilizó una línea de células dendríticas obtenidas a partir de bazo de ratones neonatos de la cepa BALB/c, inmortalizadas con un vector retroviral MIB $\gamma$ 2N11 (Sassano et al, 1994.)

### 4. Parásitos:

Se utilizó la cepa de *T. cruzi* Y, de referencia internacional. Se trabajó con la forma epimastigota (Homogenato) y la tripomastigota (desafío).

### 5. Antígenos:

**Homogenato de *T. cruzi*:** Para la preparación del mismo, se empleó un cultivo de la forma epimastigota, que alcanzó la fase estacionaria. En éstas condiciones, los parásitos fueron lavados tres veces con PBS. Luego de obtener el sedimento de células parasitarias, éstas se resuspendieron en 5 ml de PBS, la solución obtenida con los parásitos fue congelada-descongelada, en

tres oportunidades, a fin de permitir su ruptura. La concentración de parásitos fue de 62  $\mu\text{g/ml}$ .

**Péptido:** Tal como se explicó en la introducción, el péptido 152 con características protectoras, fue sintetizada, en el Instituto de Medicina experimental, UCV. El péptido 150, con características patogénicas, que fue colocado en el proyecto de tesis, fue imposible de incorporar, debido a problemas que presentó la casa que los producía.

**Adyuvante:** Se utilizó la bacteria *Bordetella pertusi*. La preparación empleada fue la misma que se usa como vacuna de la tosferina. Su uso como adyuvante, obedece a sus propiedades inductoras de inmunidad celular y no requiere experimentación para su uso en humanos.

Para los ensayos, se emplearon  $10^3$  bacterias/ ratón, por vía intraperitoneal.

## 6. Anticuerpos:

### Primarios.

Anti CD28: Anticuerpo monoclonal purificado de hamster, anti-ratón. Reconoce células T activadas. PharMingen Technical.

Anti CD23: Anticuerpo monoclonal purificado de rata, anti-ratón. Caracteriza las células B maduras. PharMingen Technical.

Anti CD11<sub>a</sub>: Anticuerpo monoclonal purificado de rata, anti-ratón. Reconoce células T y B activadas incluyendo macrófagos. PharMingen Technical.

Anti CD80: Anticuerpo monoclonal purificado de rata, anti-ratón. Reconoce células T y B activadas. PharMingen Technical.

Anti CD25: Anticuerpo monoclonal purificado de rata, anti-ratón. Este reconoce la molécula alfa del receptor para la IL-2. IMMUNOSELECT™.

Anti CD8: Anticuerpo monoclonal purificado de rata, anti-ratón. Este anticuerpo reconoce la subpoblación de linfocitos T CD8. CEDAR LANE. Laboratories Limited.

Anti CD4: Anticuerpo monoclonal purificado de rata, anti-ratón. Este anticuerpo reconoce la subpoblación de linfocitos T CD4. CEDAR LANE. Laboratories Limited.

#### **Secundarios:**

BRAR: Anticuerpo a partir de IgG de conejo con anti IgG de rata. Es un anticuerpo biotinado. Catálogo BA-4001. VECTOR.

BGAH: Anticuerpo a partir de IgG de cabra con anti IgG de hámster. Es un anticuerpo biotinado. Catálogo BA-9100. VECTOR.

**Nota:** La información de todos los anticuerpos fue obtenida de los Data Sheet suministrados por los laboratorios donde los producen. Los Data Sheet están anexados en el trabajo.

#### **7. Tratamiento de los resultados.**

**Contaje de células:** En el método de Inmunocitoquímica el conteo de las células se realizó por campos en los cuales se contaba las células marcadas (positivas) y células no marcadas (negativas) hasta llegar a un número de 100 células, donde el número de células positivas corresponde al porcentaje indicado.

**Índice de estimulación:** Este tratamiento se aplicó en el ensayo de respuesta primaria. El índice es el resultado de la división entre el promedio de las cuentas por minuto (cpm) de las células estimuladas con el antígeno A en células de ganglio y el promedio de las cpm del control negativo en las mismas células. Se realizó el mismo procedimiento con las células estimuladas con el péptido 152, y los dos grupos correspondientes a las células de bazo. El valor obtenido mediante este tratamiento matemático, nos dice cuantas veces se estimularon las células respecto al grupo control.

**Tratamiento estadístico:** En el mismo ensayo, con la finalidad de observar algún nivel de estimulación se realizó un tratamiento estadístico. Se calculó la desviación estándar de los dos grupos de cada una de las células (bazo y ganglio), ésta nos permitió obtener un valor de referencia, el cual se calcula duplicando la desviación estándar y su valor es sumado al promedio de las cpm del grupo control. Los valores de cpm de las células estimuladas con los dos antígenos y de cada grupo celular (bazo y ganglio) que estén por encima de este valor indicarán un nivel de estimulación estadísticamente

diferente al del grupo control, mientras que los valores que estén por debajo indicarán que no ocurrió estimulación.

#### **8. Equipos utilizados:**

Centrífuga IEC. Centra GP8R

Microcentrífuga eppendorf. 5415C

Cosechador de células 1295-001 LKB Wallac.

Contador de centelleo líquido 1205 Betaplate™ Wallac

Citómetro de flujo Epics® Elite ESP (Coulter)

Cámara de flujo laminar NUAIRE™

Medidor de pH E520 Metrohm Herisau

Incubadora con control de temperatura y concentración de CO<sub>2</sub>

NUAIRE®

Microscopio de luz invertida Zeiss.

Microscopio NiKon. (para el conteo de las células)

Microscopio Leica DMLS. (para la fotografía de las láminas)

Tanque criogénico.

## MÉTODOS.

### 1. Análisis de proteínas:

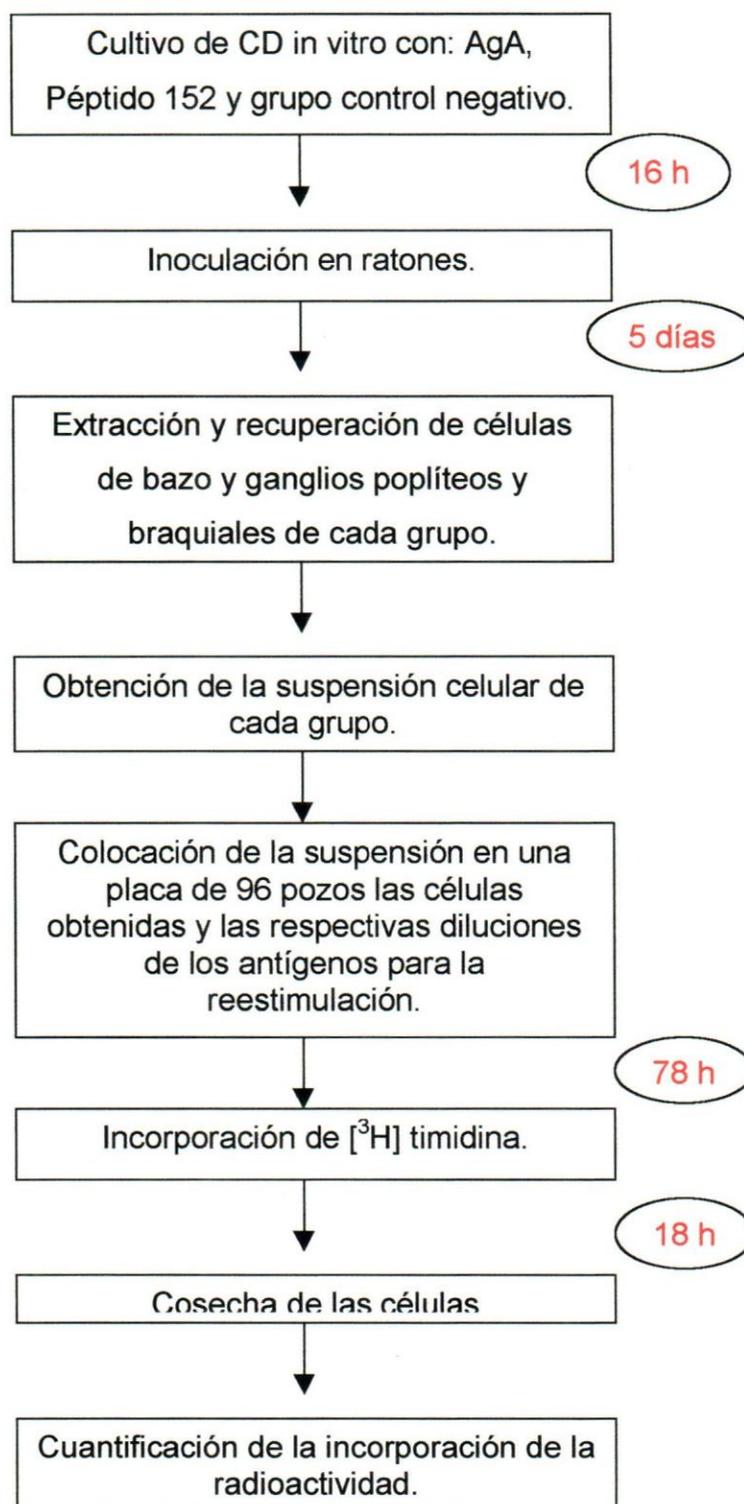
Para determinar la concentración de proteínas de las muestras, se utilizó el microensayo de Bradford, el cual está basado en una reacción de un colorante (G-250) que se une específicamente a la arginina y a residuos de aminoácidos aromáticos de las muestras, dando como resultados cambios en la intensidad del azul de comassie G-250. Se utilizó el kit para microensayo de proteínas de la marca Bio-Rad.

### 2. Experimento de estimulación "in vitro":

El ensayo se inicia con el cultivo de las células dendríticas. Para ello, las células son descongeladas. Posteriormente la suspensión celular se centrifugó a una velocidad de 250 x g, por 10 minutos, a una temperatura de 15°C. El sedimento se resuspendió en 1000µl de medio. Esta suspensión se agregó en una botella plástica de cultivo (flask) para iniciar su división. La incubación se realizó a 37°C, en un ambiente con CO<sub>2</sub>, durante dos días. Al finalizar este periodo se logró una población para cada flask de 2,5x10<sup>6</sup> células. Al siguiente día, las células fueron sensibilizadas de la siguiente manera, un flask con 100µg/ml de Antígeno completo (Homogenato) y otro flask con 75µg/ml de péptido 152, dejando un flask sin sensibilizar como grupo control. A partir de este momento se trabajó con el mismo medio pero suplementado con suero de

ratón al 1%. 16 horas después, los ratones fueron inoculados con 300.000 células por cada almohadilla plantar, en un volumen de 30  $\mu$ l. Los grupos de ratones fueron conformados por igual número de para cada tratamiento (5 ratones por grupo). A partir de este momento, se dejó transcurrir cinco días para dar tiempo a que se generara la respuesta primaria. Al término, se procedió a la extracción de los bazos y ganglios (poplíteos y braquiales) de cada grupo (el total de los ratones), fueron procesados logrando la purificación de las células. Las células de cada grupo fueron contadas, para ser distribuidas en placas de 96 pozos. En estas placas las células van a ser evaluadas en ensayos linfoproliferativos, a fin de determinar si se dio a lugar la activación por parte de las células dendríticas. La concentración por pozo fue de 500000 células. En seguida de ubicar las células en los pozos se realizó reestimulación para luego aplicar la timidina radioactiva. Después de 18 horas, se procedió al contaje de la proliferación con la ayuda del contador de centelleo líquido. Los resultados se presentarán como el número de cuentas por minuto que incorporaron las células respecto al control (índice de estimulación). Este procedimiento es conocido como **linfoblastogénesis**, y consiste en cuantificar de manera indirecta la división celular a través de la incorporación de la timidina tritiada en el ADN de las células.

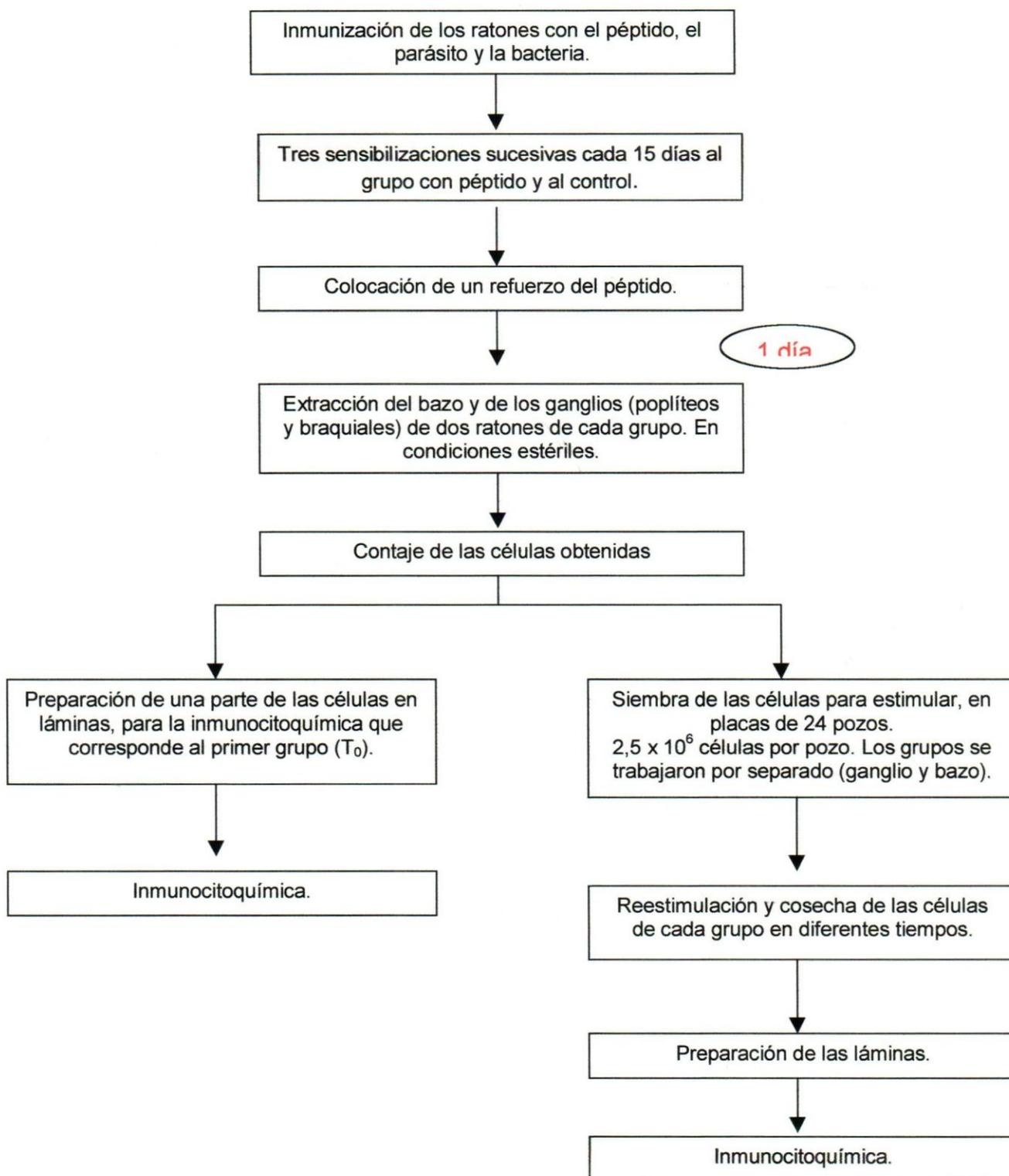
Las células restantes, se emplearon para los ensayos de estimulación sucesiva. Como esta técnica es similar a la empleada para los experimentos de memoria, esta será descrita en el punto siguiente.

**Figura 4. Protocolo del ensayo de respuesta primaria**

### 3. Experimento de Estimulación *in vitro*:

Previamente un grupo de 10 ratones fue inmunizado con el péptido 152 (50  $\mu\text{g}$  por ratón) utilizando la *Bordetella pertusi* como adyuvante se inyectaron a cada ratón, vía intraperitoneal. Otro grupo, de igual número, fue infectado con el parásito con 100 formas tripomastigotes. La cantidad de parásitos inyectada, fue lo suficientemente pequeña, para garantizar que todos alcancen la fase crónica. El tercer grupo (Control), fue sensibilizado con la bacteria (*Bordetella pertusi*). Tres dosis adicionales, suministradas cada 15 días y en las mismas condiciones, fueron aplicadas a los grupos 2 y 3. Finalizado el periodo de sensibilización, un día antes de la extracción de bazo y ganglio, los ratones recibieron un refuerzo, esto con la intención de incrementar el número de células específicas. Al día siguiente, se realizó la extracción del bazo y de los ganglios (poplíteos y braquiales) de dos ratones de cada grupo. El trabajo se realizó en condiciones estériles. Luego de la extracción de las células, éstas fueron contadas. Una porción se destinó para las pruebas de inmunocitoquímica (primer grupo) y las otras fueron sembradas en placas de 24 pozos. Se colocaron  $2,5 \times 10^6$  células por pozo. De las células de ganglio se colocaron 4 pozos, completándolos a un volumen de 2 ml. Las células de bazo, se colocaron en 10 pozos, completándolos igualmente a 2 ml. La finalidad de incubarlas en placas fue la de estimular y cosechar células en diferentes tiempos para observar si existía un enriquecimiento en alguna de las

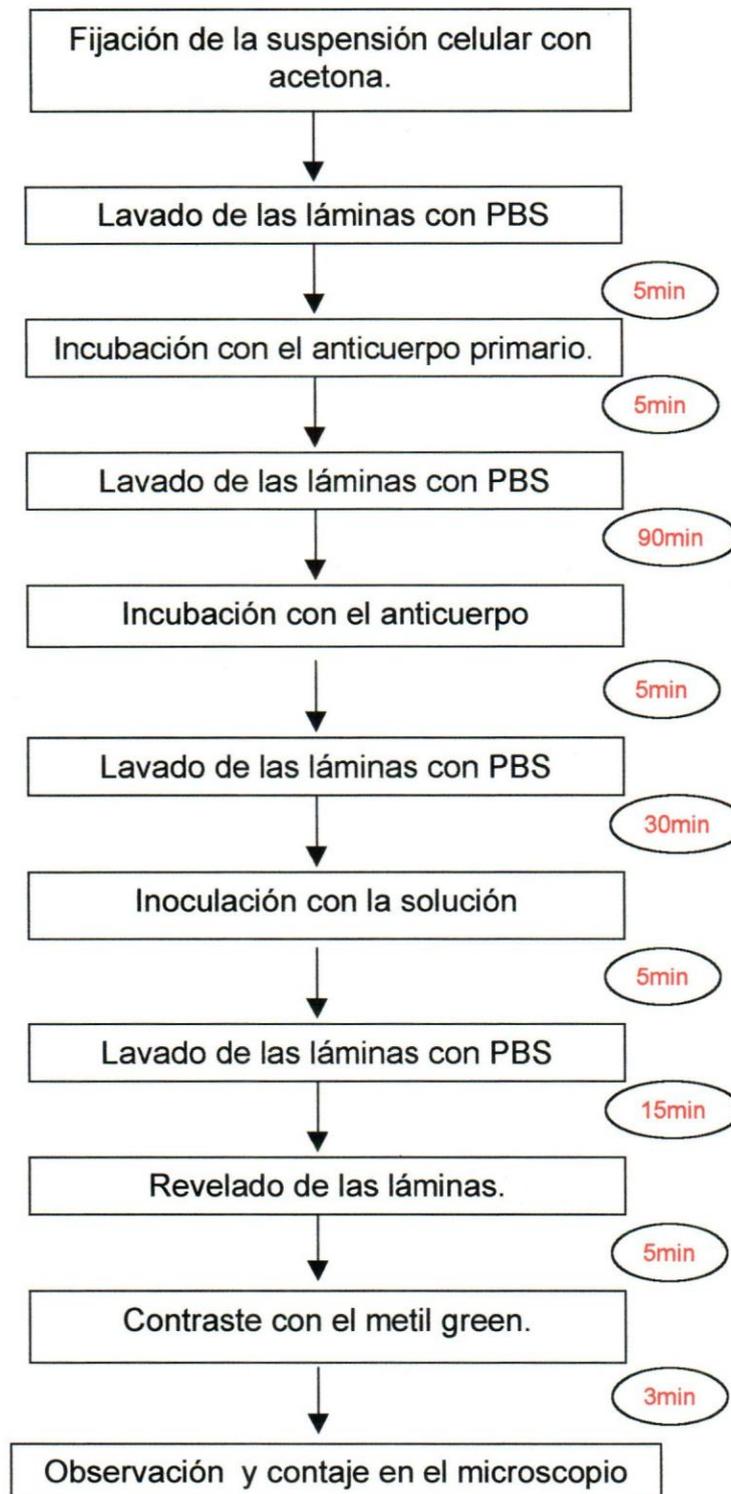
subpoblaciones a evaluar y evaluar sus características. En el momento de cosechar las células, se resuspendió cada pozo, trabajando los grupos por separado, y la suspensión se trasvasó a un tubo eppendorf y centrifugadas a 400 x g, durante 3 minutos. El sedimento, obtenido se resuspendió para luego hacer el contaje celular. Se utilizaron 200.000 células por láminas, preparando un total de 12 láminas para cada grupo en cada uno de los tiempos en que se cosecharon.

**Figura 5. Protocolo Experimento de Estimulación *in vitro*.**

#### 4. Inmunocitoquímica

Esta técnica se basa en la inmunotinción por el sistema avidina-biotina-peroxidasa. Es un método indirecto el cual se basa en la utilización de anticuerpos primarios para detectar el antígeno presente, agregándole luego un segundo anticuerpo biotinado (reconoce el anticuerpo primario), éste se hace reaccionar con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, la alta afinidad de la avidina por la biotina favorece la unión, en presencia de peróxido de hidrógeno y de un donante de electrones (amino etil carbazol) obteniendo una célula coloreada que puede ser visualizada bajo un microscopio óptico. La realización de la técnica consistió en la incubación de un anticuerpo primario durante 90 minutos, se realizó un lavado con PBS con una duración de cinco minutos, este lavado se realizó luego de cada incubación. Después de los 90 minutos, se realizó la segunda incubación con los anticuerpos secundarios durante 30 minutos. En este tiempo se realizó la preparación de ELITE, el cual se incubó en 15 minutos. Al culminar el último lavado se preparó el revelador, el cual debe permanecer en las láminas tres minutos, se lavaron las láminas con agua de chorro. Las láminas fueron contrastadas con metil green para lograr diferenciar las células positivas de las negativas.

Esta Técnica, a diferencia del marcaje directo, inmunofluorescencia y marcaje indirecto sin el sistema avidina-Biotina, presente el mejor nivel de sensibilidad.

**Figura 6. Protocolo de la Inmunocitoquímica.**

## RESULTADOS.

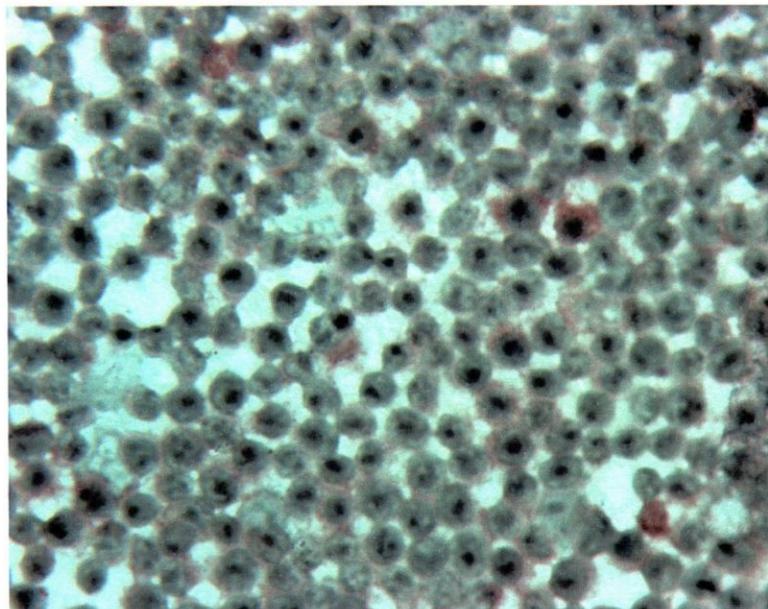
### Respuesta inmune Primaria.

#### Primera Fase:

Previo a realizar la transferencia activa de células dendríticas estimuladas con los antígenos, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica, a fin de constatar si hubo estimulación. Para ello, las células dendríticas estimuladas con el homogenato o con el péptido 152, fueron incubadas con diferentes anticuerpos específicos. Los resultados fueron comparados a los obtenidos con las células dendríticas sin estimular.

Lamentablemente uno de los anticuerpos más importantes para esta fase, el cual reconoce el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II), se dañó. No obstante, hubo anticuerpos que dieron diferencias notables, indicando que el péptido inducía algún tipo de estimulación. Los anticuerpos que se emplearon fueron: CD4, CD8, CD28, CD23, CD11<sub>a</sub>, CD25, CD80, Thy 1 y Pan B, los cuales pueden estar presentes en linfocitos T y B activados, linfocitos B maduros y macrófagos activados.

Los resultados más notables fueron con el anticuerpo que reconoce CD80, tal como se puede apreciar en la figura 7. Se puede observar un marcaje leve en la mayoría de las células marcadas, sin embargo pocas presentan un marcaje fuerte con presencia de células no marcadas.



**Figura 7. Células dendríticas marcadas con CD80.**

**Segunda fase:**

Una vez que se pudo (dentro de las circunstancias antes descritas), sugerir que el proceso de estimulación se estaba dando, se procedió como se describió en materiales y métodos. Las células fueron transferidas a ratones Balb/ c. Culinado el tiempo de estimulación, las células de bazo y ganglio fueron purificadas y sembradas en placas de 96 pozos, para las pruebas de linfoblastogénesis. Las células restantes, se emplearon para los ensayos de estimulación sucesiva.

Los resultados obtenidos en las pruebas de linfoblastogénesis, fueron negativos para todos los antígenos ensayados. El ensayo se repitió una vez más, con la diferencia que esta vez se empleó *B. pertusi*, como adyuvante. En esta oportunidad, se obtuvo respuesta linfoproliferativa, pero sólo en las muestras de bazo. Aun cuando los valores de estimulación fueron bajos, estos resultaron significativos, siendo más evidentes para el antígeno A.

**Tabla 1. Tratamiento estadístico para el experimento de respuesta primaria.**

	<b>Ganglio</b>	<b>Bazo</b>
<b>X controles</b>	2267,9	1545,75
<b>S controles</b>	518	160
<b>X + 2S</b>	3304	1865,75
<b>AgA</b>	3101,65	3616,7
<b>Pép 152</b>	2301,6	2425,63
<b>Is AgA</b>	1,4	2,34
<b>Is Pép 152</b>	1	1,6

Tal como se puede observar en la tabla 1, en esta oportunidad si se logró obtener respuesta linfoproliferativa positiva. Sin embargo, el nivel de estimulación fue notablemente inferior al esperado por nosotros. El nivel de

estimulación más elevada se alcanzó con las células de Bazo, particularmente las estimuladas con el antígeno A.

En el caso de las células de ganglio, no se alcanzaron niveles significativos de estimulación, hecho que explicaremos en la discusión.

Aunado a lo anterior, en las pruebas de estimulación sucesivas, empleando células de bazo, estimuladas con el antígeno completo, también fue posible conseguir su expansión, corroborando de esta manera que el sistema de inducción primaria de respuesta, funciona solo con el antígeno A, y no con el péptido 152.

Los resultados de inmunocitoquímica obtenidos a partir de la estimulación in vitro con el antígeno A, se pueden observar en la tabla 3. Para facilitar la presentación e interpretación de los datos que se presentarán a continuación, se organizaron según criterios funcionales.

De igual manera, cabe destacar que los resultados son el producto del marcaje individual de cada uno de los marcadores. El valor que se presenta en las tablas y gráficas, se corresponde con el número de células positivas/100 células contadas, en diferentes campos.

### Estimulación *in vitro*.

#### Experiencias de estimulación "*in vitro*", grupo control.

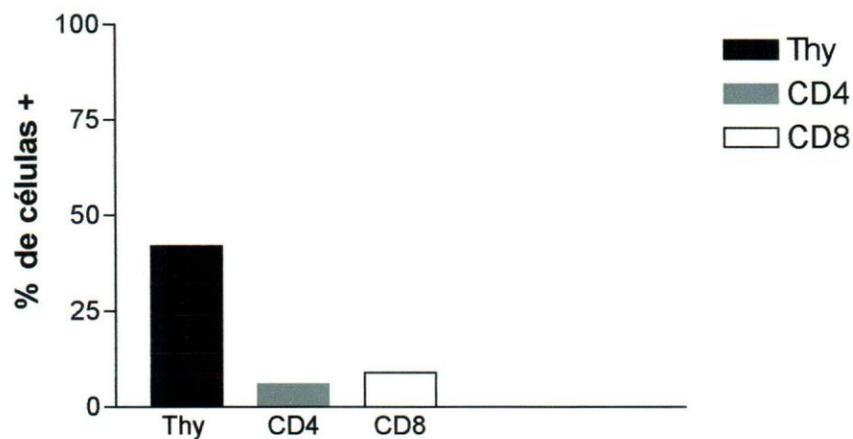
**Tabla 2. Marcadores en células de Bazo sin estimulación. Grupo control.**

Anticuerpo	1er gpo.
CD8	9
CD4	6
PanB	3
Thy	42
CD28	7
CD23	31
CD11a	16
CD80	6

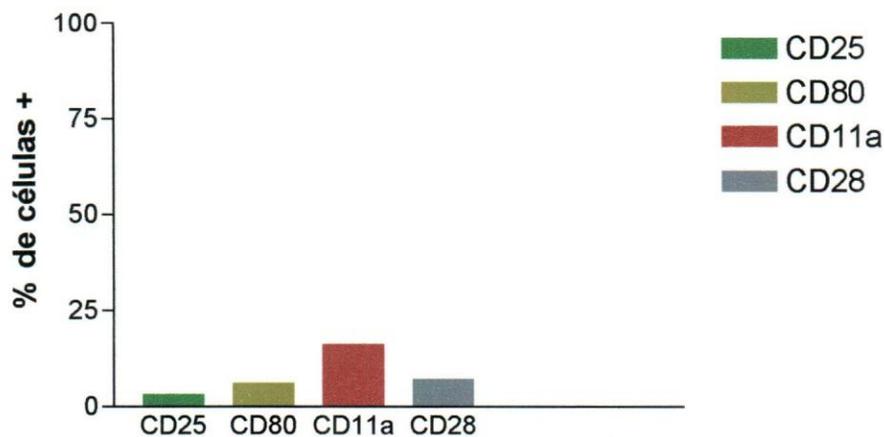
A continuación, les presentamos los resultados obtenidos con el grupo control, para los ensayos de estimulación "*in vitro*". Los resultados presentados corresponden sólo al tiempo inicial, debido a que no tiene sentido mantener células *in vitro* sin estimulación sucesiva.

Como se puede observar, el marcador de linfocitos T inmaduros, presenta un 42% que no se corresponde con ninguna de las subpoblaciones evaluadas. Los porcentajes de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron bajos, cuando se comparan con los grupos estudiados. Respecto a los marcadores de activación, se observa que tal como se esperaba, los niveles son bajos y el patrón es

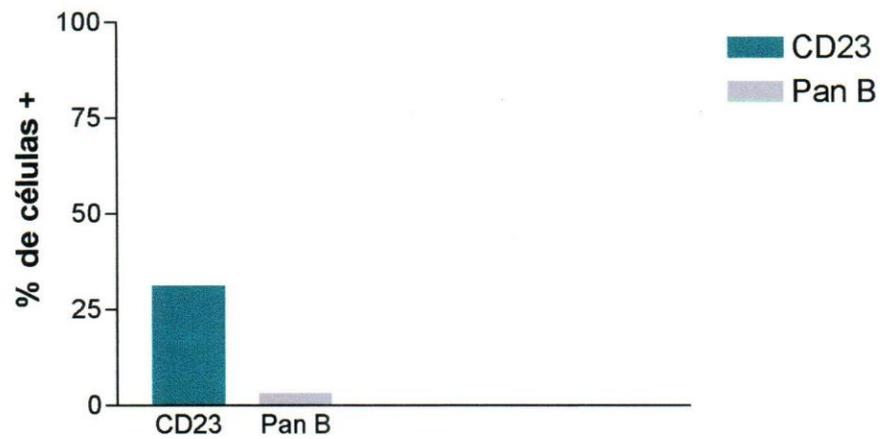
totalmente diferente respecto a los grupos sensibilizados, corroborando que el patrón presentado se corresponde con el proceso inducido por los antígenos. El único marcador que presentó niveles diferentes a los esperados, fue el CD23, donde se observa una población considerable de linfocitos B maduros.



**Gráfica 1. Marcadores linfocitarios en células de Bazo sin estimulación sucesiva. Grupo control.**



**Gráfica 2. Marcadores de células activadas en cultivos celulares sin estimulación sucesiva. Grupo control.**



**Gráfica 3. Marcadores de linfocitos B activados en células de Bazo sin estimulación sucesiva. Grupo control.**

### Experiencias de estimulación "*in vitro*", con el Antígeno A.

**Tabla 3. Marcadores de superficie en células sometidas a estimulaciones sucesivas. Sensibilizadas con el AgA.**

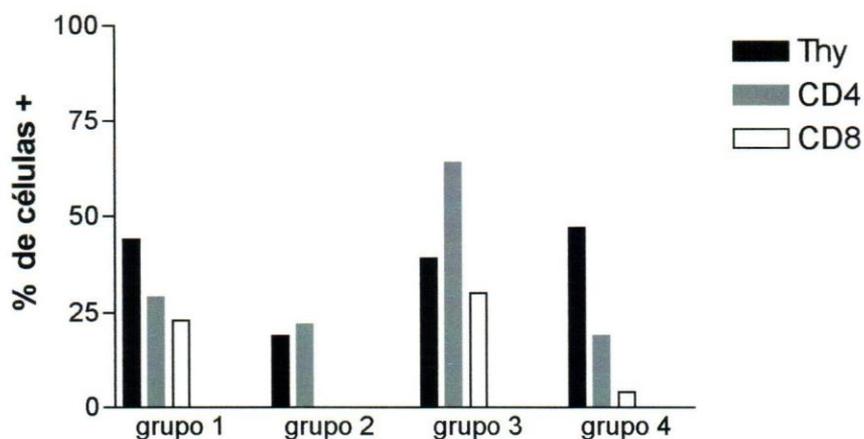
Anticuerpo	1er gpo	2do gpo	3er gpo	4to gpo
<b>CD4</b>	29	22	64	19
<b>CD8</b>	23	0	30	4
<b>CD25</b>	47	22		66
<b>CD28</b>	23	30	65	44
<b>CD23</b>	29	25	30	42
<b>CD80</b>	26	38	47	42
<b>Thy</b>	44	19	39	47
<b>Pan B</b>	27	4	17	3
<b>CD11<sub>a</sub></b>		39	46	0

Tal como se explicó en el capítulo de materiales y métodos, los resultados van desde el momento de inicio del experimento (purificación de las células de bazo y ganglio), a diferentes tiempos del proceso de estimulación, "*in vitro*". Los resultados obtenidos con los marcadores de linfocitos T, se pueden observar en la gráfica 4.

Los resultados muestran que coexisten las dos subpoblaciones de linfocitos T, con una clara tendencia en el predominio de linfocitos T, CD4<sup>+</sup>. Los linfocitos T, CD8<sup>+</sup>, presentan niveles relativamente constantes si se hace omisión del tiempo 2. En este punto, hubo un problema con los anticuerpos, los cuales no fueron preparados al momento de la inmunotinción, hecho que

disminuye la estabilidad de los mismos. Sin embargo, decidimos mostrarlos, como punto de referencia. Otro de los puntos controversiales, fue el último, donde con la excepción del Thy 1 y el CD23, todos los contajes disminuyeron. Este aspecto lo ampliaremos en la discusión.

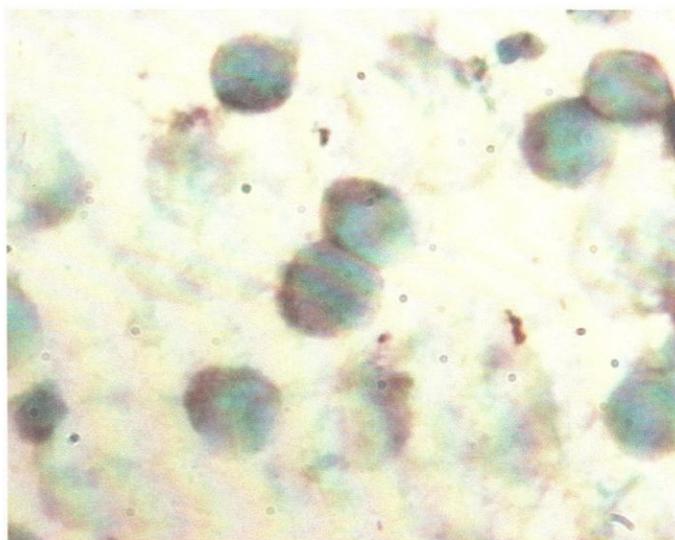
Por último, los resultados obtenidos con el marcador Thy 1, indican que en los cultivos *in vitro*, se mantuvo relativamente constante, con un leve incremento en la población de linfocitos T. Aún cuando este no es un buen marcador de toda la población de linfocitos T, los resultados sugieren que dicha población tuvo un comportamiento dentro de lo esperado.



**Gráfica 4. Marcadores Linfocitarios en células estimuladas con AgA.**

El segundo grupo de receptores está conformado por marcadores de activación o que coadyuvan con la activación. Estos pueden estar presentes en linfocitos T como B y macrófagos: CD25, CD28, CD11<sub>a</sub> y CD80. En términos

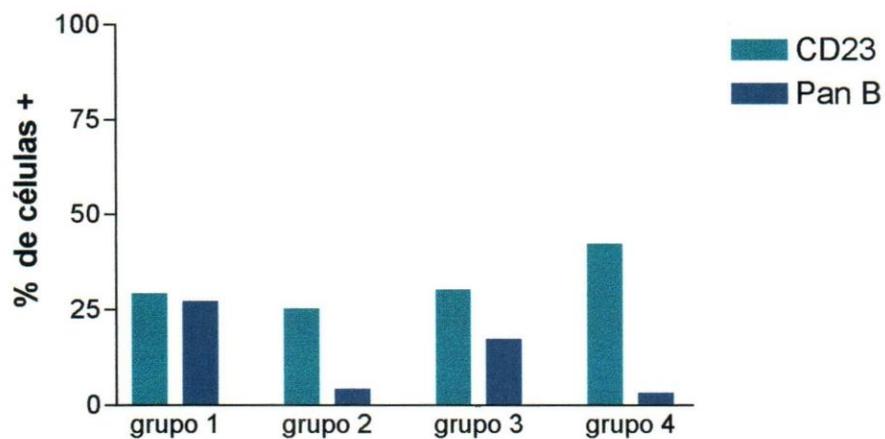
**Gráfica 5. Marcadores de células activadas en cultivos celulares  
estimulados con AgA.**



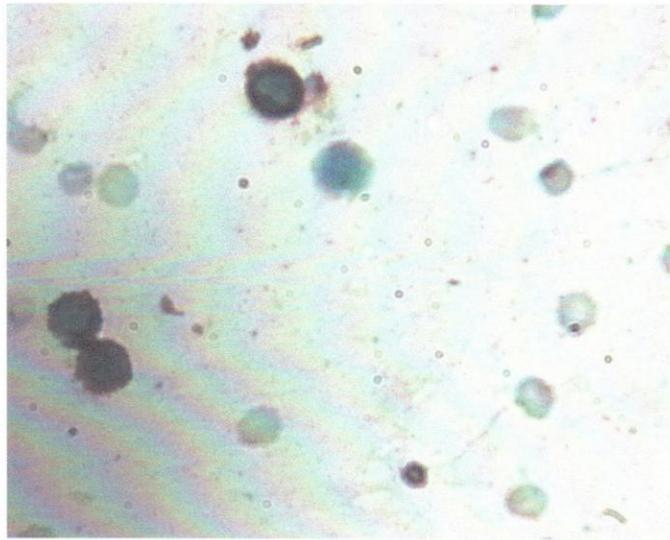
**Figura 8. Células de Bazo estimuladas con el AgA marcadas con  
CD80.**

Por último, se agruparon los marcadores que caracterizan linfocitos B activados que son CD23 y el Pan B (este es una mezcla entre IgM e IgG de ratón). En el caso del CD23, éste marca linfocitos B maduros. En el primer grupo de células el porcentaje de ambos fue semejante, para CD23 de 29% y para el Pan B de 27%. En el segundo grupo coinciden en la disminución, sin embargo la disminución fue más significativa en el Pan B, el cual bajó a 4% de células positivas. Se observó un aumento en el tercer grupo con relación a los

dos marcadores, en CD23 aumentó un 5% y en el Pan B aumentó un 13%. En el cuarto grupo hubo una diferencia en los marcadores, en el CD23 el porcentaje aumentó a 42% y en el Pan B disminuyó a 3%.



**Gráfica 6. Marcadores de células B activadas en la preparación celular estimulada con el AgA.**



**Figura 9. Células de bazo estimuladas con AgA marcadas con CD23. 100X**

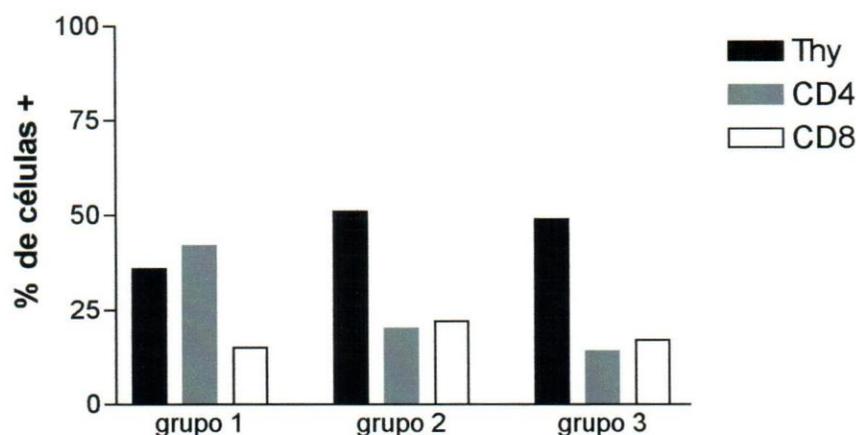
**Experiencias de estimulación “*in vitro*”, con el péptido 152:**

**Tabla 4. Marcadores en células de Bazo estimuladas sucesivamente con el Péptido 152.**

Anticuerpo	1er gpo.	2do gpo	3er gpo.
<b>CD8</b>	15	22	17
<b>CD4</b>	42	20	14
<b>CD25</b>	12	32	30
<b>PanB</b>	34	30	17
<b>Thy</b>	36	51	49
<b>CD28</b>	22	18	19
<b>CD23</b>	22	28	34
<b>CD11a</b>	21	17	25
<b>CD80</b>	37	7	19

Siguiendo el mismo esquema de presentación de los resultados, tenemos que los resultados generales para los marcadores de linfocitos T, nos muestran resultados sorprendentes. En el caso del marcador indiferenciado de linfocitos T, Thy 1 el porcentaje inicial fue de 36% de células positivas, y presenta de manera sostenida en todos los puntos, porcentajes de células positivas superiores a los observados para el antígeno A. De hecho, en el punto inicial se observa un porcentaje importante de células con el receptor para CD4<sup>+</sup>, que se compaginan con los observados para el receptor Thy 1. Sin embargo, cuando se realizan las estimulaciones *in vitro*, este fenotipo cae abruptamente. La subpoblación CD8<sup>+</sup>, no cambia significativamente su

representación y el marcador Thy 1 se mantiene elevado. En este contexto, pareciera que la subpoblación CD8<sup>+</sup>, no estuviera siendo estimulada a proliferar con el péptido 152.

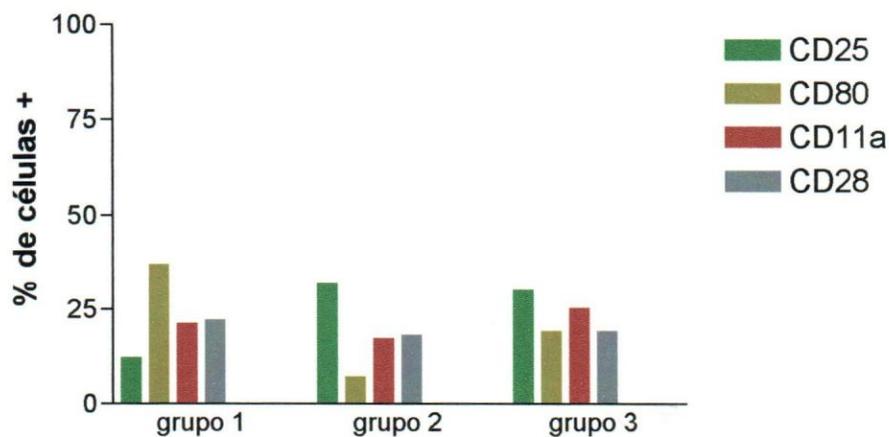


**Gráfica 7. Marcadores linfocitarios en células de Bazo estimuladas con el péptido 152.**

Al examinar los marcadores que corresponden al grupo que caracteriza células activadas tanto linfocitos B como T y macrófagos ( CD25, CD28, CD11<sub>a</sub> y CD80), se observó semejanza entre el porcentaje de CD28 y CD11<sub>a</sub>, los cuales fueron de 22% y 21% respectivamente. En el caso de CD25 el porcentaje de células positivas fue de 12% y el marcador de CD80 indicó un 37% de células marcadas positivamente. En el segundo grupo sólo se observó aumento del porcentaje en CD25 a 37%. Mientras que en los demás se observó una disminución de 18% de células positivas en CD28, en CD11<sub>a</sub> fue de 17% y

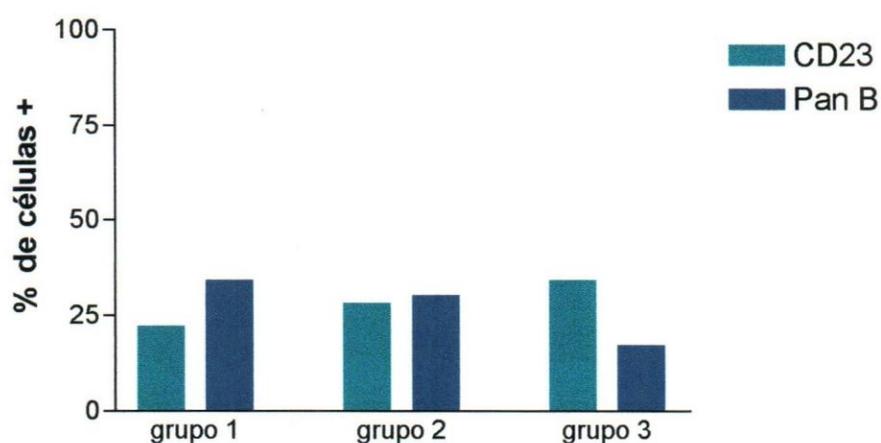
en el CD80 de 7%, en el que se observó mayor disminución. En la tercera estimulación los marcadores indicaron aumento y disminución. El anticuerpo que marca CD25 bajó a 30% de células positivas, mientras que en los demás el porcentaje aumentó a 19% en CD28, 25% en CD11<sub>a</sub> y 19% en CD80 siendo éste el más significativo.

En términos generales, llama la atención, el porcentaje de células positivas para el marcados de CD80, el cual a su vez coincide con lo observado en las células dendríticas. De alguna manera, este péptido tiene una actividad que promueve el incremento de este receptor en los diferentes inmunofenotipos.



**Gráfica 8. Marcadores de células activadas en cultivos celulares estimulados con el péptido 152.**

A diferencia de lo observado con el antígeno A, con el péptido 152, se observaron porcentajes de linfocitos B más elevados. En términos generales la tendencia se mantuvo. Al tiempo inicial se observaron valores relativamente similares a los observados para el antígeno A, un 22% de células positivas para el marcador de activación CD23 y un 34% el Pan B. Sin embargo, en términos relativos, la respuesta es superior, tal como explicaremos en la discusión. Para la primera cosecha *in vitro*, el CD23 indicó un 28% de células positivas mientras que el Pan B disminuyó a 30% de marcaje. En el marcador Pan B el porcentaje siguió disminuyendo en el tercer grupo hasta un 17% de células marcadas, a diferencia del Marcador de CD23 el cual continuó su aumento a 34%. La diferencia entre los tres grupos se puede observar mejor en la gráfica siguiente.



**Gráfica 9. Marcadores de células B activadas en cultivos celulares estimulados con el péptido 152.**

**Experiencias de estimulación “*in vitro*”, con el parásito:**

**Tabla 5. Células purificadas de Bazo, provenientes de ratones infectados con T. cruzi. Fase crónica.**

Anticuerpo	Primer gpo.
CD8	10
CD4	10
CD25	22
Pan B	17
Thy 1	58
CD28	14
CD23	53
CD11	29
CD80	10

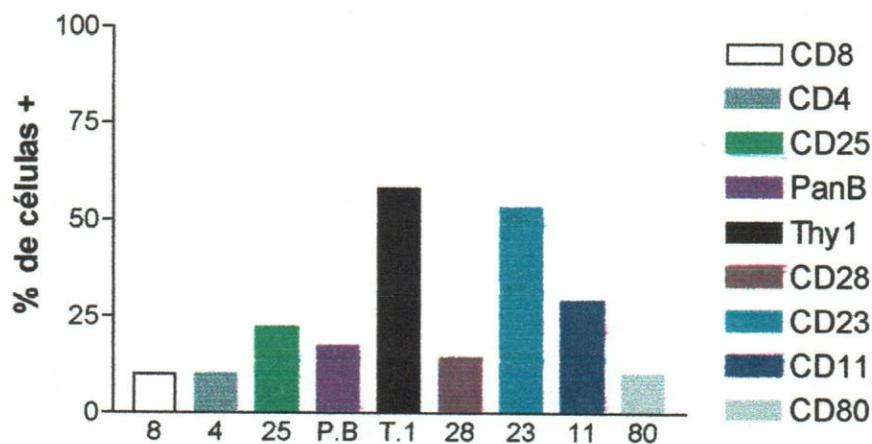
Este grupo experimental, fue diseñado como un “control” positivo de la prueba. Con los resultados obtenidos con ratones infectados en fase crónica, podríamos tener una referencia de cómo están las subpoblaciones, en las condiciones en que fue realizada la infección experimental.

En este contexto, tal como se puede apreciar en la Tabla 6, los resultados muestran que Los linfocitos T, se encuentran casi el doble de lo normal (Valor de referencia, 35%) y los linfocitos B, a la mitad de lo esperado (Valor de referencia, 38%). Las subpoblaciones e linfocitos T, CD4 y CD8 están como las del grupo control, pese a que el conteo de linfocitos T, es de 58%. Esto implicaría que existen aproximadamente un 40% de linfocitos T, doble

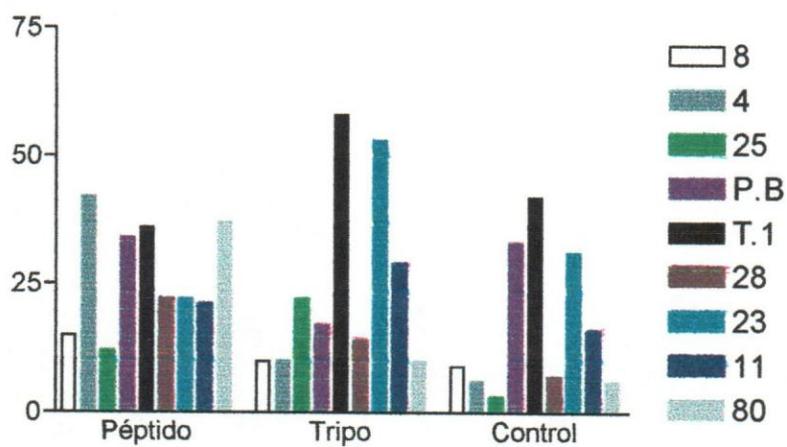
negativos. Otro de los hallazgos importantes, son los niveles alcanzados con el CD23 (53%), ya que este marca linfocitos B maduros y células dendríticas activadas. Aun cuando nuestro Pan B, este dejando de ver poblaciones de linfocitos B, el marcaje es muy grande y correlaciona con el tamaño del bazo a la hora de la extracción. De igual manera, el marcaje con CD25, es apreciable y concuerda con los resultados obtenidos con la inducción de respuesta primaria.

**Tabla 6. Comparación de los resultados de los tres tratamientos ensayados.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Péptido</b>	<b>tripo</b>	<b>Control</b>
<b>CD8</b>	15	10	9
<b>CD4</b>	42	10	6
<b>CD25</b>	12	22	3
<b>PanB</b>	34	17	33
<b>Thy</b>	36	58	42
<b>CD28</b>	22	14	7
<b>CD23</b>	22	53	31
<b>CD11a</b>	21	29	16
<b>CD80</b>	37	10	6



Gráfica 10. Células infectadas con *T. cruzi*.



Gráfica 10. Comparación entre los tres tratamientos ensayados.

## DISCUSIÓN.

La evaluación de preparaciones antigénicas y su papel en los procesos de protección, es complejo. Cuando se llega a obtener alguna preparación con tales características, se da cuenta que todavía existen muchas puertas por abrir. ¿Es posible mejorar sus propiedades?, ¿Qué mecanismos se están llevando a cabo en el modelo experimental? o ¿cuáles características se deben eliminar?.

Ante este tipo de problemas, resulta imperativo el desarrollo de modelos básicos de simulación. En este contexto, Como habíamos adelantado en la introducción, este trabajo especial de grado tenía de manera implícita, que comenzar a establecer un modelo experimental apropiado para comenzar a dar respuesta a algunas de las interrogantes antes mencionadas.

En este orden de ideas, quisimos evaluar el proceso de inducción de la respuesta inmune, con una línea de células dendríticas. Las células dendríticas, son excelentes presentadoras de antígenos y en términos generales, deben ser unas de las primeras células en tener contacto con el parásito, durante la infección natural, en piel y seguramente tiene un rol protagónico en enviar "las señales" antigénicas a los ganglios linfáticos.

Lamentablemente, algunos aspectos que pensábamos incluir para dar una visión más clara de los hallazgos reportados, no van ser posible presentar

para este trabajo especial de grado. Sin embargo, pese a los contratiempos presentados, los resultados fueron interesantes.

### **Marcaje de células dendríticas:**

Esta fue la primera experiencia realizada y se diseñó con la intención de ir previendo si se podría ensayar con estas células experiencias de estimulación primaria con péptidos. En ensayos previos a esta tesis, ya se había ensayado su capacidad en inducir respuesta linfoproliferativa, en ratones Balb/c, infectados. Además de la expresión de receptores de activación, la sobre expresión del MHC II, es uno de los factores guía para este proceso. Pese a haber trabajado con el anticuerpo para este receptor, a la hora del ensayo, éste se deterioró, por lo que fue imposible para nosotros evaluarlo (por dificultades económicas). Sin embargo, al estimular las células "in vitro" con el Péptido, estas presentan marcaje con el CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2), receptor de activación, pero más notable fue la sobre expresión del receptor CD80 (B7-1). Este es un miembro de la familia de las Inmunoglobulinas, que participa en los procesos de coestimulación con los linfocitos T, mediante su interacción con el receptor CD28. Este lo enlaza con baja afinidad, pero con rápida avidéz (Anton y col, 1997), incrementando de esta manera la probabilidad de interacción del linfocito T, con la célula presentadora de antígeno, dentro del contexto del complejo mayor de Histocompatibilidad (MHC).

Como se observa en la figura 7, el marcaje es variable. La mayor parte de ellas presenta un marcaje suave, mientras que otras lo presentan fuerte. Este patrón es normal, tal como establece Théy y col 2001, al plantear la naturaleza heterogénea de las células dendríticas. A fin de comparar con lo que ocurría aunque de manera parcial en humanos, habíamos planeado realizar marcaje con líneas celulares humanas de macrófagos. Sin embargo, al final fue imposible realizarlo para esta presentación.

Con los resultados obtenidos, podíamos suponer que el péptido estaba siendo captado por las células dendríticas y que estaba induciendo su activación, por lo decidimos continuar con el esquema planeado que era el ensayo de respuesta primaria.

#### **Inducción de respuesta primaria:**

Tal como se explicó en los resultados, varios intentos se realizaron para poder obtener un limitado nivel de inducción de respuesta primaria. El grado de estimulación, depende muchas variables, tamaño del péptido, su estabilidad y grado de ruptura por proteasas, entre otros. En la figura 11 (incluida en los anexos), se observa los resultados obtenidos por Faulkner, donde se ve el porcentaje de estimulación alcanzado con diferentes preparaciones de péptidos.

La que se encuentra en el extremo derecho, que es la que menos indujo respuesta, es equivalente a la empleada por nosotros, en esta experiencia.

Tomando como referencia esta experiencia, nosotros tendríamos que emplear una concentración al menos 100 veces mayor, para obtener un nivel de respuesta linfoproliferativa importante. Sin embargo, para futuros estudios, pensamos acoplar el péptido a *B. Pertusi*, o algún otro transportador, a fin de garantizar que un porcentaje importante del péptido empleado llegue a la CPA..

Pese a ello, los niveles alcanzados en el segundo intento, cuando se empleó el adyuvante, se pudo inducir respuesta primaria. Esto lo podemos afirmar, ya que hubo respuesta linfoproliferativa positiva en células de bazo tanto para el antígeno A, como para el péptido, siendo más importante para el antígeno A. Sin embargo, considerando que el péptido contiene mucho menos determinantes antigénicos que los que presenta el antígeno A, podríamos decir que el proceso fue exitoso. En este mismo orden de magnitudes, es posible explicar por qué sólo tuvimos respuesta positiva con el antígeno A, en las estimulaciones sucesivas de las células de bazo. A su vez, el hecho que pudimos obtener estas células que se estimulan *in vitro*, corrobora que fue posible obtener la inducción de repuesta primaria. En ninguna de las circunstancias ensayadas pudimos observar respuesta con las células de ganglio. No sabemos explicar las razones por las cuales no se alcanzó a obtener respuesta positiva, quizás el hecho que las células dendríticas provengan de células de bazo, facilite o dirija más estas células (hominig receptors) a los órganos que tengan preferencia. De hecho, en las dos técnicas

ensayadas (linfoblastogénesis y estimulación in vitro), ambas dieron positivas sólo con las células de bazo.

Los resultados obtenidos con la estimulación in vitro, son muy interesantes. El patrón de respuesta es totalmente diferente al observado para los experimentos donde se evaluaron los inmunofenotipos de memoria.

En este, se observa un predominio de respuesta de linfocitos T, siendo la población más importante la  $CD4^+$ . Los niveles de  $CD8^+$ , fueron también superiores a los observados con las células de ratones infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*, donde la respuesta humoral, sobre la de linfocitos T, se impone.

Respecto a lo obtenido en los diferentes tiempos, durante el proceso de estimulación sucesiva, se puede observar que existe un predominio de la subpoblación  $CD4^+$ , y se está produciendo un incremento en el número de linfocitos B, maduros ( $CD23$ ). Es posible que esta subpoblación de linfocitos T, sea una cooperadora de linfocitos B ( $CD4^+4B4^+$ ). Estos experimentos serán realizados en el futuro.

También se puede apreciar que la mayoría de los receptores asociados con el proceso de activación, se van incrementando en el tiempo, lo que podría indicar que se han ido seleccionando las subpoblaciones respondedoras.

Experiencias futuras de transferencia de células, a ratones singénicos serán realizadas, a fin de evaluar que efecto tienen estas subpoblaciones en

cambiar la infección experimental. Afortunadamente, el cultivo parece estar estabilizado y las células fueron congeladas para su posterior estudio.

### **Evaluación de las subpoblaciones de memoria:**

Los resultados obtenidos en esta parte de la tesis, también resultaron importantes para comenzar a entender la respuesta inducida por el péptido 152.

En la gráfica 10 podemos observar de manera comparativa, los resultados obtenidos por los tres grupos, al tiempo de obtener las células purificadas del bazo. En ella, podemos apreciar que los patrones de respuesta son completamente diferentes, hecho que evidencia las diferencias en los procesos de estimulación en cada uno de los grupos estudiados. El grupo control, presenta unos niveles esperados de linfocitos T y B y la mayoría de los indicadores de activación se encuentran bajos. La única excepción fue con el marcador CD23, el cual se encuentra un poco elevado. No sabemos cuánto es el nivel normal, en el bazo. Lo único que podría argumentarse es el hecho que estos ratones fueron sensibilizados con *B. Pertusi*. Sin embargo, no se les aplicó ningún refuerzo previo antes de la extracción de las células.

Respecto al grupo infectado, existe un marcaje notable del receptor CD23, el cual no se observa en los otros grupos estudiados. Lo extraño es que no guarda concordancia con el marcador de linfocitos B. Una razón para esto, pudiese ser, tal como está reportado durante la infección con *T. cruzi*, que este

induce una disminución en los receptores de superficie, tanto T, como B. De hecho llama la atención, los bajos niveles de linfocitos T y de sus subpoblaciones. Tampoco podemos olvidar, tal como ha sido descrito en la introducción, la mayor parte de los antígenos de *T. cruzi*, inducen supresión.

Pese a ello, existe una subpoblación, que está siendo favorecida y estimulada. Los marcadores de estimulación, CD25 y CD11a, se encuentran elevados respecto a lo observado con los otros grupos estudiados. El CD11a (LFA-1), es una integrina presente en todos los leucocitos y que media las interacciones a través de la molécula ICAM. De manera similar al CD80, si se emplea este anticuerpo en reacciones mixtas de linfocitos, no se dan, por lo que se les indican como necesarias para el proceso de activación.

Respecto a la inducción con el péptido 152, se puede observar que existe un predominio de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, que correlaciona con los niveles de linfocitos T y otra vez de manera muy marcada, existe una fuerte expresión del receptor CD80. Esto corrobora a lo observado con las células dendríticas, por lo que podríamos afirmar que de alguna manera, este péptido induce fuertemente la expresión de este receptor, bien sea como antígeno, porque tiene propiedades inmunoregulatorias, o ambas. Estos aspectos deben evaluarse en el futuro. El papel de este receptor ha tomado recientemente una importancia relevante, en enfermedades tales como las cancerosas entre otras (Xiang y col., 2001).

A Fin de poder asignar a una subpoblación como responsable del proceso de inducción, se había diseñado un experimento de marcaje con dos anticuerpos y cada uno con diferentes colores. Estos se analizarían por citometría de flujo. Lamentablemente, el anticuerpo llegó tarde para la presentación, así que lo tendremos para la publicación.

Las experiencias obtenidas con el péptido 152, el cual induce una elevación de los marcadores de coestimulación y en particular del CD80, nos apoyan para seguir estudiando este proceso, que junto a lo que observemos con péptidos con características patogénicas, nos permitirán comprender mejor esta enfermedad.

## CONCLUSIONES.

- Las células dendríticas, presentaron un marcaje significativo con el anticuerpo CD80, y un poco menor con el CD25. Demostrando la captación del péptido.
- En el ensayo de Respuesta primaria, se observó respuesta proliferativa positiva en células de bazo tanto para el antígeno A, como para el péptido, siendo más importante para el antígeno A. En las células de ganglio un hubo respuesta.
- En la estimulación *in vitro* del ensayo de respuesta primaria, se logró una caracterización de las subpoblaciones, con el cultivo de células estimuladas con el antígeno A.
- En el experimento de memoria, la estimulación *in vitro*, donde se cultivaron las células someténdolas a 3 tratamientos (tripo, péptido 152 y control +). Los patrones de respuesta fueron diferentes, lo que evidencia la diferencias en los procesos de estimulación en cada uno de los grupos.
- En la inducción con el péptido 152, en este mismo ensayo, se observó un predominio de linfocitos CD4<sup>+</sup>, que correlaciona con los niveles de linfocitos T y de manera muy marcada, una fuerte expresión del receptor CD80. Lo que confirmó lo observado en las células dendríticas. Podemos decir que el péptido 152 induce fuertemente la expresión de este receptor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **ABBAS**, Abul y otros. (1995) Inmunología celular y molecular. Mc. Graw Hill – Interamericana de España. Segunda Edición. 517 págs. España.
2. **BODIAN**, D; **DAENKE**, S; **LINSLEY**, P. (1997). CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. J. Exp. Med. V 185, 3:393-403.
3. **BRICEÑO**, Luis. (S/F) Caracterización inmunológica y por Biología Molecular de un antígeno semipurificado de *Trypanosoma cruzi*. Universidad Central de Venezuela, trabajo de ascenso. 59 págs.
4. **CARDONI**, Rita. (1997) La respuesta inflamatoria en la infección aguda con *T. cruzi*. Medicina (Buenos Aires), 57:227 – 234.
5. **CARVALHO**, R. M., **MEIRELLES**, M.N., y otros. (1981). Isolation of de intracellular stage of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with mouse macrophages in vitro. Infect Immun., 33(2):546 – 554.
6. **COLIGAN** John, **KRUISBEIK**, David y otros. (1994) .Current protocols in immunology. John Wiley & Son, Inc. Volumen I. USA. Pág. 3.7.3
7. **COLIGAN** John; **KRUISBEIK**, David y otros. (1992). Current protocols in immunology. John Wiley & Son, Inc. Volumen I. USA..
8. **COLIGAN** John; **KRUISBEIK**, David y otros. (1994). Current protocols in immunology. John Wiley & Son, Inc. Volumen I. USA. Pág. 5.0.3

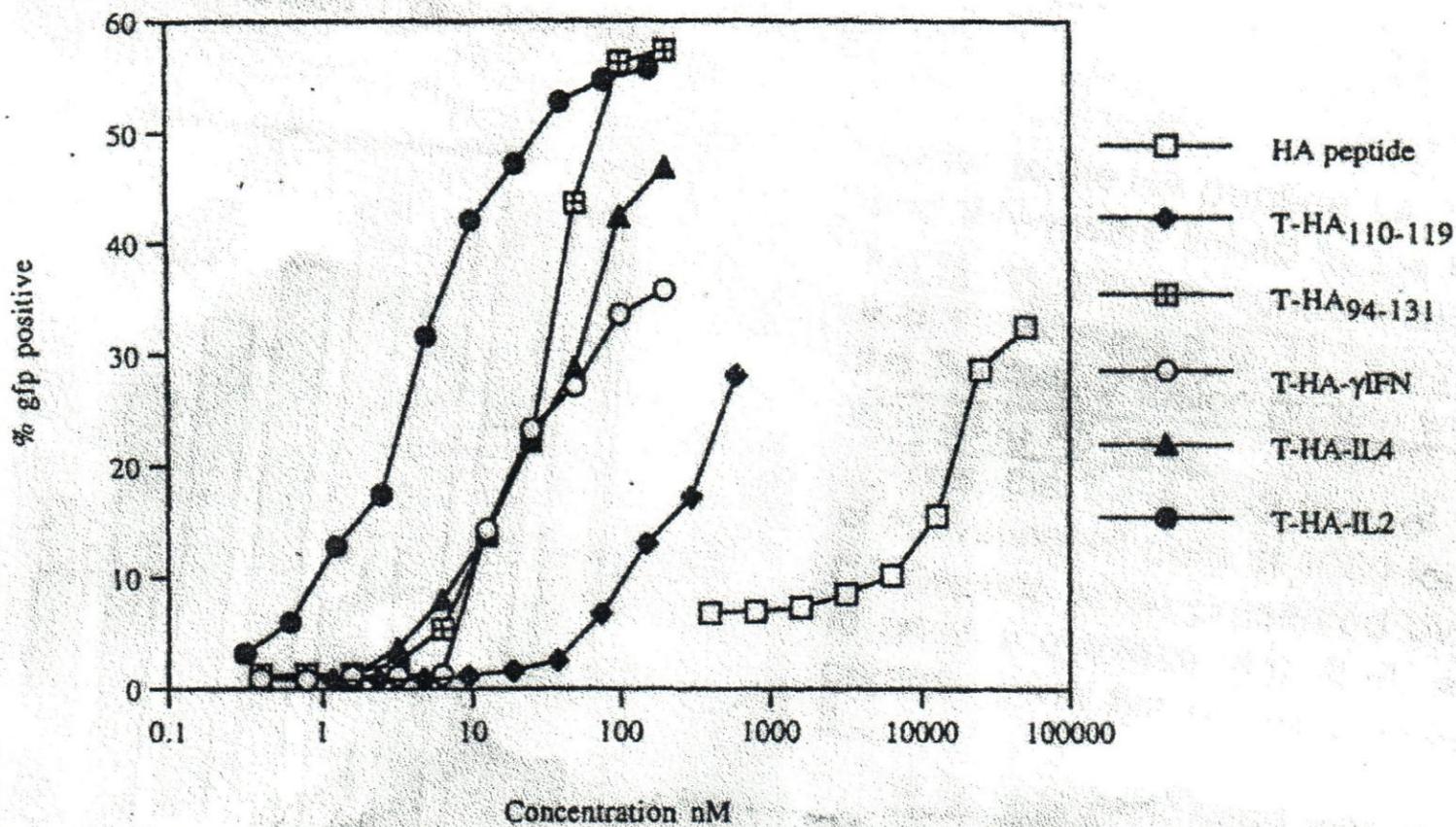
9. **FAULKNER, L., BUCHAN, G.** y otros. (2001). IL-2 linked to a peptide from influenza hemagglutinin enhances T cell activation by affecting the antigen-presentation function of bone marrow-derived dendritic cells. *International Immunology*, 13(6):713 – 721.
10. **HAMMAD H, CHARBONNIER AS, DUEZ C.** (2001). Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* 15;98(4):1135-41.
11. **HUDSON, Leslie.** (1989). *Practical Immunology*. Frank Hay third edition. Black well scientific publicitions. Cáp. 1. Pág 23.
12. **JANEWAY – TRAVERS.** (1997). *Immunobiology. The immune system in health and disease. Third Edition.* Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc. USA.
13. **JANEWAY Jr., Ch, TRAVERS P.,** y otros. (2000). *Inmunología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* Editorial Masson. Págs. 644.
14. **KIRK AD, TADAKI DK, CELNIKER A.** (2001). Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. *Transplantation* 15;72(3):377-84
15. **LY A, DUC HT, KALAMARIDES M.** (2001). Human glioma cells transformed by IGF-I triple helix technology show immune and apoptotic characteristics

determining cell selection for gene therapy of glioblastoma. *Mol Pathol*;54(4):230-9.

16. **MORTARA, R., PROCÓRIO D., y otros.** (1999). Features of host cell invasion by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94,1: 135 – 137.
17. **O' NEILL.** (1997). The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunology and cell biology*, 75: 223 – 230.
18. **PULENDRA Bali y otros.** (2001) Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *TRENDS in immunology*, 22: 41-47.
19. **SCHARFSTEIN, J., MORROT, A.** (1999). A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94,1: 51 - 63.
20. **STOCKWIN Luke H. y otros.** (2000). Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunology and Cell Biology*, 78: 91-102.
21. **TAPIA, F. y col.** (1994). Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. *Exp. Dermatology*, 3:17–22.
22. **THÈRY Clotilde y otro.** (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinion in immunology*, 13: 45-51.

23. **VARMA TK, TOLIVER-KINSKY TE, LIN CY.** (2001). Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice. *Infect Immun*; 69(9):5249-63.
24. **WROBLEWSKI JM, BIXBY DL.** (2001). Characterization of human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines for expression of MHC, co-stimulatory molecules and tumor-associated antigens. *Lung Cancer*;33 (2-3):181-94.
25. **XIANG R, PRIMUS FJ y otros.** (2001). A Dual-Function DNA Vaccine Encoding Carcinoembryonic Antigen and CD40 Ligand Trimer Induces T Cell-Mediated Protective Immunity Against Colon Cancer in Carcinoembryonic Antigen-Transgenic Mice. *J Immunol*; 167(8):4560-4565.
26. **YEWDELL Jonathan y otro.** (2001). Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Current Opinion in immunology*, 13: 13-18.

**ANEXOS.**



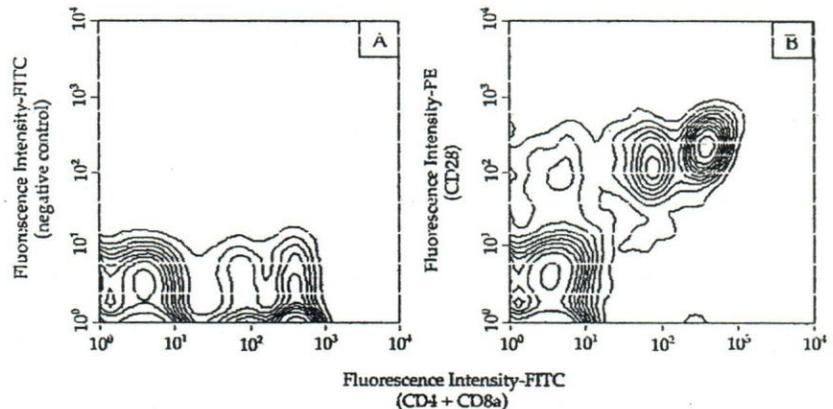
Gráfica 11. Estimulación con diferentes preparaciones de péptidos.

**PURIFIED HAMSTER ANTI-MOUSE CD28 MONOCLONAL ANTIBODY****PRODUCT INFORMATION**

Catalog Number: **557393** (Was: 01671A), **0.1 mg**; **553295** (Was: 01671D), **0.5 mg**  
 Clone: **37.51**  
 Immunogen: **C57BL/6 mouse T-cell lymphoma EL-4<sup>1</sup>**  
 Isotype: **Syrian Hamster IgG2,\* $\lambda$**   
 Storage Buffer: **Aqueous buffered solution containing 0.09% Sodium Azide.**

**SPECIFICITY**

The 37.51 antibody reacts with CD28, which is expressed on most thymocytes, at low density on nearly all CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> peripheral T cells, and at even lower density on NK cells.<sup>1,2</sup> The expression of CD28 is increased after activation of splenocytes and thymocytes.<sup>1</sup> *Cd28* transcripts are found in mast cells, and cell-surface expression of CD28 is induced upon maturation or activation of mast cells.<sup>3</sup> It has been reported that CD28 is not expressed on some populations of intraepithelial T lymphocytes.<sup>4,5</sup> CD28 is a costimulatory receptor; its ligands include CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2).<sup>6</sup> The 37.51 mAb augments proliferation and cytokine production by activated T and NK cells<sup>1,2,7,8,9,10,11</sup> and can provide a costimulatory signal for CTL induction.<sup>12,13</sup> There is considerable evidence that CD28 is a costimulatory receptor involved in many, but not all, T cell-dependent immune responses.<sup>3,11,14,15,16</sup>



**Two-color analysis of CD28 expression on splenic T lymphocytes.** BALB/c splenocytes were preincubated with Mouse Fc Block<sup>TM</sup> (anti-mouse CD16/CD32 mAb 2.4G2, Cat. no. 553141/553142, both panels), then stained simultaneously with FITC-conjugated RM4-5 (anti-mouse CD4, Cat. no. 553046/553047, both panels), FITC-conjugated 53-6.7 (anti-mouse CD8a, Cat. no. 553030/553031, both panels), and purified 37.51 (Panel B) monoclonal antibodies. Staining of CD28-positive cells was detected with biotinylated G192-3 antibody (anti-Syrian hamster IgG2, Cat. no. 554029, both panels), followed by Streptavidin-PE (Cat. no. 554061, both panels). Flow cytometry was performed on a FACScan<sup>TM</sup> (BDIS, San Jose, CA).

\*Although hamster immunoglobulin isotypes have not been well defined, PharMingen has grouped Armenian and Syrian hamster IgG monoclonal antibodies according to their reactivity with a panel of mouse anti-hamster IgG mAbs. Please refer to the Immunoglobulin/2nd Step Reagents section of our current catalog, or contact PharMingen's Technical Service Department, for a table of the hamster IgG groups.

**PREPARATION AND STORAGE**

The antibody was purified from tissue culture supernatant by affinity chromatography. The antibody solution should be stored undiluted at 4°C.

Please see Page 2.

BD Biosciences [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)

Clontech  
Discovery Labware

Immunocytometry Systems  
PharMingen

Transduction Laboratories

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale.

Asia Pacific  
Tel (65) 8610 633  
Fax (65) 8601 590

Brazil  
Tel (55) 11 5185 9833  
Fax (55) 11 5185 9834

Canada  
Tel 888.259.0187  
Fax 905.542.9391  
[canada@bd.com](mailto:canada@bd.com)

Europe  
BD Biosciences  
Tel (32) 53 720 211  
Fax (32) 53 720 450

Europe  
Life Sciences Research  
Tel (49) 6221 305 521  
Fax (49) 6221 305 531

Japan  
Tel (81) 3 5413 8251  
Fax (81) 3 5413 8155

Mexico  
Tel (525) 237 1200  
Fax (525) 237 1288

United States  
Tel 877.232.8995  
Fax 858.812.8888



BD Biosciences

## USAGE

This antibody has been tested by immunofluorescent staining ( $\leq 1 \mu\text{g}/\text{million cells}$ ) with flow cytometric analysis to assure specificity and reactivity. Other reported applications include immunoprecipitation,<sup>1</sup> *in vitro* costimulation of T and NK cells,<sup>1,2,7,8,9,10,11,12,13</sup> *in vitro* induction of thymocyte differentiation,<sup>16</sup> blocking of *in vitro* allogeneic mixed-leukocyte response<sup>17</sup> and MHC-unrestricted cytotoxicity,<sup>13</sup> and immunohistochemical staining of acetone-fixed frozen sections.<sup>18</sup> For flow cytometry of cell suspensions from peripheral lymphoid tissues, it is recommended that multicolor staining be performed to identify T lymphocytes and/or NK cells and that Mouse Fc Block™ (Cat. no. 553141/553142) be used. Since this antigen is expressed at low density on resting peripheral T lymphocytes, it may be desirable to amplify staining by using a biotinylated second-step antibody followed by a "bright" third-step reagent, such as Streptavidin-PE (Cat. no. 554061) or Streptavidin-Cy-Chrome™ (Cat. no. 554062). If Mouse Fc Block™ is used, it is important that the second-step anti-hamster IgG does not cross-react with the 2.4G2 mAb (rat IgG<sub>2h</sub>, κ); we recommend biotinylated anti-Syrian hamster IgG2 mAb G192-3 (Cat. no. 554029). Since applications vary, each investigator must determine dilutions appropriate for individual use.

**Caution:** Sodium azide is a reversible inhibitor of oxidative metabolism; therefore, antibody preparations containing this preservative agent must not be used in cell cultures nor injected into animals. Sodium azide may be removed by washing stained cells or plate-bound antibody or dialyzing soluble antibody in sodium azide-free buffer. Since endotoxin may also affect the results of functional studies, we recommend the NA/LE™ (No Azide/Low Endotoxin) antibody format for *in vitro* and *in vivo* use.

## REFERENCES

- Gross, J.A., E. Callas, and J.P. Allison. 1992. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J. Immunol.* 149: 380-388.
- Nandi, D., J.A. Gross, and J.P. Allison. 1994. CD28-mediated costimulation is necessary for optimal proliferation of murine NK cells. *J. Immunol.* 152: 3361-3369.
- Marietta, E.V., J.J. Weis, and J.H. Weis. 1997. CD28 expression by mouse mast cells is modulated by lipopolysaccharide and outer surface protein A lipoprotein from *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 159: 2840-2848.
- Gelfanov, V., Y.-G. Lai, V. Gelfanova, J.-Y. Dong, J.-P. Su, and N.-S. Liao. 1995. Differential requirement of CD28 costimulation for activation of murine CD8<sup>+</sup> intestinal intraepithelial lymphocyte subsets and lymph node cells. *J. Immunol.* 155: 76-82.
- Rakasz, E., M. Hagen, M. Sandor, and R.G. Lynch. 1997.  $\gamma\delta$  T cells of the murine vagina: T cell response *in vivo* in the absence of the expression of CD2 and CD28 molecules. *Int. Immunol.* 9: 161-167.
- June, C.H., J.A. Bluestone, L.M. Nadler, and C.B. Thompson. 1994. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* 15: 321-331.
- Harding, F.A., J.G. McArthur, J.A. Gross, D.H. Raulet, and J.P. Allison. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356: 607-609.
- Krummel, M.F., and J.P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 182: 459-465.
- Lepesant, H., M. Pierres, and P. Naquet. 1995. Deficient antigen presentation by thymic epithelial cells reveals differential induction of T cell clone effector functions by CD28-mediated costimulation. *Cell. Immunol.* 161: 279-287.
- Ong, C.J., A.S.-P. Lim, and H.-S. Teh. 1997. CD28-induced cytokine production and proliferation by thymocytes are differentially regulated by the p59<sup>lck</sup> tyrosine kinase. *J. Immunol.* 159: 2169-2176.
- Wells, A.D., H. Gudmundsdottir, and L.A. Turka. 1997. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. *J. Clin. Invest.* 100: 3173-3183.
- Haidjilov, F.A., and J.P. Allison. 1993. CD28-B7 interactions allow the induction of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *J. Exp. Med.* 177: 1791-1796.
- Nishio, M., J. Spielman, R.K. Lee, D.L. Nelson, and E.R. Podack. 1996. CD80 (B7.1) and CD54 (Intracellular Adhesion Molecule-1) induce target cell susceptibility to promiscuous cytotoxic T cell lysis. *J. Immunol.* 157: 4347-4353.
- Shahinian, A., K. Pfeffer, K.P. Lee, T.M. Kündig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P.S. Ohashi, C.B. Thompson, and T.W. Mak. 1993. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261: 609-612.
- Bluestone, J.A. 1995. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 2: 555-559.
- Cibotti, R., J.A. Punt, K.S. Dash, S.O. Sharrow, and A. Singer. 1997. Surface molecules that drive T cell development *in vitro* in the absence of thymic epithelium and in the absence of lineage-specific signals. *Immunity* 6: 245-255.
- Masten, B.J., J.L. Yates, A.M.P. Koga, and M.F. Lipscomb. 1997. Characterization of accessory molecules in murine lung dendritic cell function: Roles for CD80, CD86, CD54, and CD40L. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16: 335-342.
- PharMingen. Unpublished results.

**Conditions:** PharMingen will not be responsible for violations or patent infringements which may occur with the use of our products.

**Hazardous Ingredient:** Sodium Azide. Avoid exposure to skin and eyes, ingestion, and contact with heat, acids, and metals. Wash exposed skin with soap and water. Flush eyes with water. Dilute with running water before discharge into plumbing.

BD Biosciences [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)

Clontech  
Discovery Labware

Immunocytometry Systems  
PharMingen

Transduction Laboratories



BD Biosciences

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for Resale.

Asia Pacific Tel (65) 8610 633 Fax (65) 8601 590	Brazil Tel (55) 11 5185 9833 Fax (55) 11 5185 9834	Canada Tel 888.259.0187 Fax 905.542.9391 <a href="http://canada.bdb.com">canada.bdb.com</a>	Europe BD Biosciences Tel (32) 53 720 211 Fax (32) 53 720 450	Europe Life Science Research Tel (49) 6221 305 521 Fax (49) 6221 305 531	Japan Tel (81) 3 5413 8251 Fax (81) 3 5413 8155	Mexico Tel (525) 237 1200 Fax (525) 237 1288	United States Tel 877.232.8995 Fax 858.812.8888
--	--	--	--	---	---	--	---

557393/553295-01671A/D-7125  
Rev. 014 4/01

# PharMingen Technical Data Sheet

## PURIFIED RAT ANTI-MOUSE CD11a (Integrin $\alpha_L$ chain, LFA-1 $\alpha$ chain) MONOCLONAL ANTIBODY

### PRODUCT INFORMATION

Catalog Number: 553118 (Was: 01201D), 0.5 mg  
Clone: 2D7  
Immunogen: Not reported  
Isotype: Rat IgG<sub>2a</sub>,  $\kappa$   
Storage Buffer: Aqueous buffered solution containing 0.09% Sodium Azide.

### SPECIFICITY

The 2D7 antibody reacts with the 180-kDa  $\alpha_L$  chain of LFA-1 (CD11a/CD18,  $\alpha_L\beta_2$  integrin), a heterodimeric surface glycoprotein expressed on all leukocytes.<sup>1,2</sup> LFA-1 mediates a variety of heterotypic and homotypic intercellular adhesions through interaction with ICAM-1 (CD54) and ICAM-2 (CD102).<sup>2,3</sup> mAb 2D7 has been reported to block an *in vitro* allogeneic mixed-leukocyte reaction.<sup>4</sup> The 2D7 and M17/4 (Cat. no. 557453) antibodies are reported to recognize different epitopes of the CD11a molecule.<sup>5</sup>

### PREPARATION AND STORAGE

The antibody was purified from tissue culture supernatant by affinity chromatography. The antibody solution should be stored undiluted at 4°C.

### USAGE

This antibody has been tested by immunofluorescent staining ( $\leq 1 \mu\text{g}/\text{million cells}$ ) with flow cytometric analysis to assure specificity and reactivity. Other reported applications include *in vitro* blocking<sup>4</sup> and immunohistochemical staining (IHC) of acetone-fixed frozen sections.<sup>6</sup> For IHC, we recommend the use of purified M17/4 mAb in our special formulation for immunohistochemistry, Cat. no. 550528. Since applications vary, each investigator must determine dilutions appropriate for individual use.

**Caution:** Sodium azide is a reversible inhibitor of oxidative metabolism; therefore, antibody preparations containing this preservative agent must not be used in cell cultures nor injected into animals. Sodium azide may be removed by washing stained cells or plate-bound antibody or dialyzing soluble antibody in sodium azide-free buffer. Since endotoxin may also affect the results of functional studies, we recommend the NA/LE™ (No Azide/Low Endotoxin) antibody format for *in vitro* and *in vivo* use.

### REFERENCES

1. Okumura, K. 1990. Personal communication.
2. Larson, R.S., and T.A. Springer. 1990. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* 114: 181 - 217.
3. Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76: 301 - 314
4. Masten, B.J., J.L. Yates, A.M.P. Koga, and M.F. Lipscomb. 1997. Characterization of accessory molecules in murine lung dendritic cell function: roles for CD80, CD86, CD54, and CD40L. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16: 335 - 342.
5. Kootstra, C.J., D.M. van der Giezen, J.H.J.M. van Krieken, E. de Heer, and J.A. Bruijn. 1997. Effective treatment of experimental lupus nephritis by combined administration of anti-CD11a and anti-CD54 antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 108: 324 - 332.
6. PharMingen. Unpublished results.

**Conditions:** PharMingen will not be responsible for violations or patent infringements which may occur with the use of our products.

**Hazardous Ingredient: Sodium Azide.** Avoid exposure to skin and eyes, ingestion, and contact with heat, acids, and metals. Wash exposed skin with soap and water. Flush eyes with water. Dilute with running water before discharge into plumbing.

BD Biosciences [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)

Clontech  
Discovery Labware

Immunocytometry Systems  
PharMingen

Transduction Laboratories

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for Resale.

Asia Pacific  
Tel (65) 8610 633  
Fax (65) 8601 590

Brazil  
Tel (55) 11 5185 9833  
Fax (55) 11 5185 9834

Canada  
Tel 888.259.0187  
Fax 905.542.9391  
[canada@bd.com](mailto:canada@bd.com)

Europe  
BD Biosciences  
Tel (32) 53 720 211  
Fax (32) 53 720 450

Europe  
Life Science Research  
Tel (49) 6221 305 521  
Fax (49) 6221 305 531

Japan  
Tel (81) 3 5413 8251  
Fax (81) 3 5413 8155

Mexico  
Tel (525) 237 1200  
Fax (525) 237 1288

United States  
Tel 877.232.8995  
Fax 858.812.8888



BD Biosciences

553118-01201D-11DS  
Rev. 015 4/01

# PharMingen Technical Data Sheet

## PURIFIED MOUSE ANTI-MOUSE I-A<sup>d</sup> MONOCLONAL ANTIBODY

### PRODUCT INFORMATION

Catalog Number: 553545 (Was: 06031D), 0.5 mg  
Clone: AMS-32.1  
Immunogen: BALB/c mouse splenocytes<sup>1</sup>  
Isotype: Mouse (SJL) IgG<sub>2b</sub>, κ  
Storage Buffer: Aqueous buffered solution containing 0.09% Sodium Azide.

### SPECIFICITY

The AMS-32.1 antibody reacts with the I-A<sup>d</sup> MHC class II alloantigen.<sup>1,2</sup> It cross-reacts with cells from mice of the H-2<sup>f</sup>, H-2<sup>g7</sup>, H-2<sup>l</sup>, and H-2<sup>v</sup> haplotypes.<sup>1,3,4,5</sup> Reactivity with other haplotypes (e.g., k, p, q, r, s, u) has not been observed.<sup>1,3,4</sup>

### PREPARATION AND STORAGE

The antibody was purified from tissue culture supernatant by affinity chromatography. The antibody solution should be stored undiluted at 4°C.

### USAGE

This antibody has been tested by immunofluorescent staining ( $\leq 1 \mu\text{g}/\text{million cells}$ ) with flow cytometric analysis to assure specificity and reactivity. Other reported applications include blocking, in the presence of anti-mouse I-E<sup>k</sup> mAb 14-4-4S (Cat. no. 06020S), of primary mixed-lymphocyte reaction.<sup>6</sup> For immunohistochemical staining, we recommend the use of biotinylated AMS-32.1 mAb in our special formulation for immunohistochemistry, Cat. no. 550554. Since applications vary, each investigator must determine dilutions appropriate for individual use.

Caution: Sodium azide is a reversible inhibitor of oxidative metabolism; therefore, antibody preparations containing this preservative agent must not be used in cell cultures nor injected into animals. Sodium azide may be removed by washing stained cells or plate-bound antibody or dialyzing soluble antibody in sodium azide-free buffer. Since endotoxin may also affect the results of functional studies, we recommend the NA/LE™ (No Azide/Low Endotoxin) antibody format for *in vitro* and *in vivo* use.

### REFERENCES

1. Loken, M.R., and A.M. Stall. 1982. Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology. *J. Immunol. Methods* 50: R85 - R112.
2. Wall, K.A., M.I. Lorber, M.R. Loken, S. McClatchey, and F.W. Fitch. 1983. Inhibition of proliferation of Mls- and Ia-reactive cloned T cells by a monoclonal antibody against a determinant shared by I-A and I-E. *J. Immunol.* 131: 1056 - 1064.
3. Stall, A.M. Personal communication.
4. PharMingen. Unpublished results.
5. Ridgway, W.M., H. Ito, M. Fassò, C. Yu, and C.G. Fathman. 1998. Analysis of the role of variation of major histocompatibility complex class II expression on nonobese diabetic (NOD) peripheral T cell response. *J. Exp. Med.* 188: 2267 - 2275.
6. Hiramane, C., T. Nakagawa, and K. Hojo. 1995. Murine nursing thymic epithelial cell lines capable of inducing thymocyte apoptosis express the self-superantigen Mls-1<sup>a</sup>. *Cell. Immunol.* 160: 157 - 162.

Conditions: PharMingen will not be responsible for violations or patent infringements which may occur with the use of our products.

Hazardous Ingredient: Sodium Azide. Avoid exposure to skin and eyes, ingestion, and contact with heat, acids, and metals. Wash exposed skin with soap and water. Flush eyes with water. Dilute with running water before discharge into plumbing.

BD Biosciences [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)

Clontech  
Discovery Labware

Immunocytometry Systems  
PharMingen

Transduction Laboratories



BD Biosciences

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for Resale.

Asia Pacific	Brazil	Canada	Europe	Europe	Japan	Mexico	United States
Tel (65) 8610 633	Tel (55) 11 5185 9833	Tel 888-259-0187	BD Biosciences	Life Science Research	Tel (81) 3 5413 8251	Tel (525) 237 1200	Tel 877.232.8995
Fax (65) 8601 590	Fax (55) 11 5185 9834	Fax 905.542.9391	Tel (32) 53 720 211	Tel (49) 6221 305 521	Fax (81) 3 5413 8155	Fax (525) 237 1288	Fax 858.812.8888
		<a href="mailto:canada@bd.com">canada@bd.com</a>	Tel (32) 53 720 450	Fax (49) 6221 305 531			

553545-06031D-TDS  
Rev. 011 3/01

## Product Profile

# IMMUNOSELECT™

**Product:** Anti-CD25  
**Cat. No.:** 9874SB  
**Lot No.:** AJVB02  
**Size:** 100 µg  
**Storage Conditions:** 2° - 8°C (Avoid Freezing)

*This product is distributed for research use only. It has not been approved for diagnostic or drug purposes nor for administration to humans or animals.*

### Description

Anti-CD25 is a monoclonal Rat anti-Mouse Interleukin-2 receptor antibody(1). CD25 or IL-2R is expressed on activated T cells, B cells and NK cells(2). High affinity IL-2R are composed of an  $\alpha$  chain (55 kDa) and a  $\beta$  chain (75 kDa)(3). AMT-13 appears to recognize the  $\alpha$  chain(1).

### Applications

Anti-CD25 can be used in combination with a fluorochrome labelled anti-rat Ig conjugate for indirect immunofluorescence analysis by flow cytometry or immunofluorescence microscopy. It can be used for single color or simultaneous two or three color analysis. Anti-CD25 can be used to deplete T cells by complement mediated lysis. It can be used to enrich or deplete CD25 positive cells by panning or flow cytometric cell sorting.

<b>Clone</b>	AMT-13	
<b>Isotype</b>	Rat IgG <sub>2a</sub>	
<b>Product Form</b>	Concentration:	0.25 mg/ml Anti-CD25
	Buffer:	Phosphate buffered saline, pH 7.2
	Additives:	2mM EDTA
		0.1% NaN <sub>3</sub>
		1.0% BSA

**Warning:** Sodium Azide is considered hazardous

### Storage and Handling

Store at 2° - 8°C. Avoid freezing. A protein containing solution (e.g. 1% -5% BSA) should be used to dilute antibodies. The undiluted product is stable for one year when stored as directed. The inside of this vial has a conical bottom. Do not tilt the vial when pipetting. If necessary, shake or spin the vial briefly to concentrate contents into the bottom.

### Working Dilution

This vial contains 100 µg or 200 µg (depending on Cat. No.) or approximately 100 or 200 tests, respectively, when using 1 µg (4 µl) of Anti-CD25 which will optimally label 1x10<sup>5</sup> cells. We recommend that each individual determine the optimum titer for their specific application. A stabilizing protein such as BSA (1%-5%) should be included in the buffer when diluting conjugates.

### Quality Control

To insure consistent and high quality reagents, each lot of product is tested by flow cytometry for conformance to rigid specifications of signal/noise and nonspecific staining.

Quality Control Assays  
Conducted By:

*Marilyn Aronius*  
Form 19874

Quality Control Data  
Examined and Approved:

*Maria E. DeGrueter*

The LTI Technical Services Department welcomes all questions concerning the use of this product. Please call the number for your area listed below.

## GIBCO BRL

## RESEARCH PRODUCTS DIVISION LIFE TECHNOLOGIES, INC.

**Corporate Headquarters**  
8400 Helgerman Court  
Gaithersburg, MD 20877 U.S.A.  
(301) 840-8000

**U.S.A. Orders**  
P.O. Box 68  
Grand Island, NY 14072-0068 U.S.A.  
Facsimile: (800) 331-2286  
To order/Tech-Line™: (800) 828-6686

Tech-Line™ is a service mark of Life Technologies, Inc.  
Form No. 18055

**International Orders**  
P.O. Box 6009  
Gaithersburg, MD 20877 U.S.A.  
Telex: 64210 BRL GARG UW  
Facsimile: (301) 258-8238  
To order/Tech-Line™: (301) 840-8000

9000 Gent Belgium  
To order/Tech-Line™: 091/277031

GIBCO BRL Canada  
Burlington, Ontario, Canada L7P 1A1  
To order/Tech-Line™: (416) 335-2255

95051 Cergy Pontoise Cedex France  
To order/Tech-Line™: (1) 34-64-54-40

Uxbridge UB8 2YG Middlesex Great Britain  
To order: (0895) 36355  
U.K. Tech-Line™: 0800 83 83 80

Tsuen Wan, New Territories Hong Kong  
To order/Tech-Line™: 0-4144157

Chuo-Ku, Tokyo 103 Japan  
To order/Tech-Line™: 03-663-8241

4824 AD Breda The Netherlands  
To order/Tech-Line™: 076 41 99 44

Penrose, Auckland 6 New Zealand  
To order/Tech-Line™: 09 593024

Paisley PA3 4EF Scotland  
To order: 041 889 6100  
U.K. Tech-Line™: 0800 83 83 80

CH 4018 Basel Switzerland  
To order/Tech-Line™: 061 35 40 66

1000 Berlin 62 West Germany  
To order/Tech-Line™: 030/8532088

7514 Eggenstein West Germany  
To order/Tech-Line™: 0721/78040



**PURIFIED RAT ANTI-MOUSE CD23 (FcεRII) MONOCLONAL ANTIBODY****PRODUCT INFORMATION**

Catalog Number:	553136 (Was: 01231D), 0.5 mg
Clone:	B3B4
Immunogen:	Complex of IgE with Fcε receptor isolated from the mouse B hybridoma line O1.2B2 <sup>1</sup>
Isotype:	Rat (LOU/M) IgG <sub>2a</sub> , κ
Storage Buffer:	Aqueous buffered solution containing 0.09% Sodium Azide.

**SPECIFICITY**

The B3B4 antibody reacts with CD23, the low-affinity IgE Fc receptor (FcεRII) expressed on mature resting conventional B lymphocytes, but not on B-1 cells (CD5<sup>+</sup> B cells) or T lymphocytes.<sup>1,2,3</sup> It does not react with high-affinity IgE receptors, as demonstrated on mouse mast cell lines.<sup>1</sup> The regulation of CD23 surface expression on activated B cells appears to be complex, depending upon the mode of activation and the presence of cytokines.<sup>3,4,5,6</sup> IgE synthesis is negatively regulated by CD23,<sup>7,8</sup> and CD23 expression is upregulated on splenocytes in the presence of IgE.<sup>9</sup> CD23 is also upregulated on follicular dendritic cells in the lymph nodes of immunized mice,<sup>10</sup> and a subset of splenic dendritic cells expresses CD23.<sup>11</sup> The B3B4 antibody abrogates antigen-specific IgE-dependent modulation of immune responses in normal mice.<sup>12</sup> This monoclonal antibody also blocks IgE binding<sup>1</sup> and eosinophil infiltration in the lung of immunized mice.<sup>13</sup> Different *in vivo* results have been obtained when using the intact B3B4 antibody or the F(ab')<sub>2</sub> fragments.<sup>14</sup> B3B4 mAb does not cross-react with rat or human IgE Fc Receptor.<sup>1</sup>

**PREPARATION AND STORAGE**

The antibody was purified from tissue culture supernatant by affinity chromatography. The antibody solution should be stored undiluted at 4°C.

**USAGE**

This antibody has been tested by immunofluorescent staining (≤ 1 μg/million cells) with flow cytometric analysis to assure specificity and reactivity. Other reported applications include immunoaffinity chromatography,<sup>2</sup> *in vitro* and *in vivo* functional blocking,<sup>12,13,14</sup> immunohistochemical staining of acetone-fixed frozen sections,<sup>10</sup> and immunoelectron microscopy.<sup>10</sup> Since applications vary, each investigator must determine dilutions appropriate for individual use.

**Caution:** Sodium azide is a reversible inhibitor of oxidative metabolism; therefore, antibody preparations containing this preservative agent must not be used in cell cultures nor injected into animals. Sodium azide may be removed by washing stained cells or plate-bound antibody or dialyzing soluble antibody in sodium azide-free buffer. Since endotoxin may also affect the results of functional studies, we recommend the NA/LE™ (No Azide/Low Endotoxin) antibody format for *in vitro* and *in vivo* use.

**REFERENCES**

1. Rao, M., W.T. Lee, and D.H. Conrad. 1987. Characterization of a monoclonal antibody directed against the murine B lymphocyte receptor for IgE. *J. Immunol.* 138: 1845 - 1851.
2. Waldschmidt, T.J., D.H. Conrad, and R.G. Lynch. 1988. The expression of B cell surface receptors. I. The ontogeny and distribution of the murine B cell IgE Fc receptor. *J. Immunol.* 140: 2148 - 2154.
3. Waldschmidt, T., K. Snapp, T. Foy, L. Tygrett, and C. Carpenter. 1992. B-cell subsets defined by the FcεR. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 651: 84 - 98.
4. Conrad, D.H., T.J. Waldschmidt, W.T. Lee, M. Rao, A.D. Keegan, R.J. Noelle, R.G. Lynch, and M.R. Kehry. 1987. Effect of B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) on Fcε and Fcγ receptor expression on murine B lymphocytes and B cell lines. *J. Immunol.* 139: 2290 - 2296.

Please see Page 2.

BD Biosciences [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)

Clontech  
Discovery Labware

Immunocytometry Systems  
PharMingen

Transduction Laboratories



BD Biosciences

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for Resale.

Asia Pacific Tel (65) 8610 633 Fax (65) 8601 590	Brazil Tel (55) 11 5185 9833 Fax (55) 11 5185 9834	Canada Tel 888.259.0187 Fax 905.542.9391 <a href="mailto:canada@bd.com">canada@bd.com</a>	Europe BD Biosciences Tel (32) 53 720 211 Fax (32) 53 720 450	Europe Life Science Research Tel (49) 6221 305 521 Fax (49) 6221 305 531	Japan Tel (81) 3 5413 8251 Fax (81) 3 5413 8155	Mexico Tel (525) 237 1200 Fax (525) 237 1288	United States Tel 877.232.8995 Tel 858.812.8888 Fax 858.812.8888
--	--	--	--	---	---	--	---

## REFERENCES (Continued)

5. Waldschmidt, T.J., D.H. Conrad, and R.G. Lynch. 1989. Expression of B cell surface receptors. II. IL-4 can accelerate the developmental expression of the murine B cell IgE Fc receptor. *J. Immunol.* 143: 2820 - 2827.
6. Rabin, E., C. Ying-Zi, and H.H. Wortis. 1992. Loss of CD23 is a consequence of B-cell activation. Implications for the analysis of B-cell lineages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 651: 130 - 142.
7. Yu, P., M. Kosco-Vilbois, M. Richards, G. Köhler, and M.C. Lamers. 1994. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* 369: 753 - 756.
8. Stief, A., G. Texido, G. Sansig, H. Eibel, G. Le Gros, and H. van der Putten. 1994. Mice deficient in CD23 reveal its modulatory role in IgE production but no role in T and B cell development. *J. Immunol.* 152: 3378 - 3390.
9. Kisselgof, A.B., and H.C. Oettgen. 1998. The expression of murine B cell CD23, *in vivo*, is regulated by its ligand, IgE. *Int. Immunol.* 10: 1377 - 1384.
10. Maeda, K., G.F. Burton, D.A. Padgett, D.H. Conrad, T.F. Huff, A. Masuda, A.K. Szakal, and J.G. Tew. 1992. Murine follicular dendritic cells and low affinity Fc receptors for IgE (FcεRII). *J. Immunol.* 148: 2340 - 2347.
11. Pulendran, B., J. Lingappa, M.K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C.R. Mallszewski, and E. Maraskovsky. 1997. Developmental pathways of dendritic cells *in vivo*. Distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J. Immunol.* 159: 2222 - 2231.
12. Oshiba, A., E. Hamelmann, A. Haczku, K. Takeda, D.H. Conrad, H. Kikutani, and E.W. Gelfand. 1997. Modulation of antigen-induced B and T cell responses by antigen-specific IgE antibodies. *J. Immunol.* 159: 4056 - 4063.
13. Coyle, A.J., K. Wagner, C. Bertrand, S. Tsuyuki, J. Bewes, and C. Heusser. 1996. Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J. Exp. Med.* 183: 1303 - 1310.
14. Dasic, G., P. Juillard, P. Graber, S. Herren, T. Angell, R. Knowles, J.-Y. Bonnefoy, M.H. Kosco-Vilbois, and Y. Chvatchko. 1999. Critical role of CD23 in allergen-induced bronchoconstriction in a murine model of allergic asthma. *Eur. J. Immunol.* 29: 2957 - 2967.

Conditions: PharMingen will not be responsible for violations or patent infringements which may occur with the use of our products.

**Hazardous Ingredient: Sodium Azide.** Avoid exposure to skin and eyes, ingestion, and contact with heat, acids, and metals. Wash exposed skin with soap and water. Flush eyes with water. Dilute with running water before discharge into plumbing.

BD Biosciences [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)

Clontech  
Discovery Labware

Immunocytometry Systems  
PharMingen

Transduction Laboratories

*For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for Resale.*

<b>Asia Pacific</b>	<b>Brazil</b>	<b>Canada</b>	<b>Europe</b>	<b>Europe</b>	<b>Japan</b>	<b>Mexico</b>	<b>United States</b>
Tel (65) 8610 633	Tel (55) 11 5185 9833	Tel 888.259.0187	BD Biosciences	Life Science Research	Tel (81) 3 5413 8251	Tel (525) 237 1200	Tel 877.232.8995
Fax (65) 8601 590	Fax (55) 11 5185 9834	Fax 905.542.9391	Tel (32) 53 720 211	Tel (49) 6221 305 521	Fax (81) 3 5413 8155	Fax (525) 237 1288	Fax 858.812.8888
		<a href="mailto:canada@bd.com">canada@bd.com</a>	Fax (32) 53 720 450	Fax (49) 6221 305 531			



BD Biosciences

553136-012310-TDS  
Rev. 008 4/01