



Estudios de inmunomodulación xenogénica y sus posibles aplicaciones biomédicas

Magdiel Pérez Cruz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesis adscrita a la Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

Programa de Doctorado en Biomedicina

**Estudios de inmunomodulación xenogénica y sus posibles
aplicaciones biomédicas**

Magdiel Pérez Cruz

Barcelona, 2012

Tesis adscrita a la Facultat de Medicina, Universidad de Barcelona.

Programa de Doctorado en Biomedicina

Estudios de inmunomodulación xenogénica y sus posibles aplicaciones biomédicas

Memoria presentada por Magdiel Pérez Cruz para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Rafael Máñez y la Dra. Cristina Costa en el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge.

Rafael Máñez Mendiluce

Director

Cristina Costa Vallès

Directora

Magdiel Pérez Cruz

Doctorando

Barcelona 2012

La presente tesis doctoral: “Estudios de inmunomodulación xenogénica y sus posibles aplicaciones biomédicas” ha sido realizada en el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge. Este trabajo fue posible gracias a la financiación de una beca predoctoral por parte de la Fundació Institut d’Investigació Biomèdica de Bellvitge y los proyectos financiados por el Fondo de Investigación Sanitaria (PI05/0861 y PS09/02127).



A mi familia

Sueña y serás libre de espíritu, lucha y serás libre en la vida.

Ernesto Che Guevara

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores, la Dra. Cristina Costa y el Dr. Rafael Máñez, por haberme dado la posibilidad de hacer la tesis doctoral en su grupo de investigación y trabajar con ellos durante estos últimos años, dándome la posibilidad de comenzar mi carrera investigadora. Agradezco por todos sus consejos que han contribuido a consolidar los resultados del proyecto y con ello la presentación de la presente tesis doctoral.

También agradecer al Dr. Oriol Casanovas y María del Mar Martínez por su importante colaboración en la determinación del impacto de la inmunización xenogénica en la angiogénesis y tumorigénesis de ratones RIP-Tag2. Además, al Dr. Bovin, Nadya y Nailya por su importante contribución en el estudio glicómico realizado con nuestros modelos animales y darme la posibilidad de realizar una estancia en su laboratorio.

Por otra parte, agradecer además a Álvaro Gimeno, Pilar Pastor, Pedro Fuentes, Rosa Bonavia, Marielle Esteves y todas las demás personas de los servicios de estabulario de la Universidad de Barcelona (Campus de Bellvitge), del IDIBELL y del Hospital Vall d'Hebron por su amabilidad durante todo este tiempo y su disposición a colaborar cuando necesitaba muestras biológicas indispensable para mi trabajo.

Quiera agradecer evidentemente a todas las personas del Laboratorio de Oncología Molecular (LOM) con las que he compartido durante este tiempo. Gracias a Antonia, Esther, Laia Caja, Patricia y Eva por todas las veces que me habéis ayudado a resolver problemas técnicos y científicos. También a Marta, Pep, Javi, Clara, Raffaella y Judit por su amistad y transmitir cada día esa alegría tan espontánea. Gracias a Naiara, Eder, Anna Roig, Ana García, Nadia, Doro, Jessica, Laura, Joan Fernando, Miguel, Helena, Adriana, Maria Àngels, Rebeca, y todos los que puedo olvidar mencionar, por haberme animado o compartido buenos y entretenidos momentos ya sea tomando un café, firmando un cortometraje, cenando o disfrutando alguna fiesta. Quiero hacer constar un especial agradecimiento a Olga C. Jorge, Rosa Gil, Laia Bosch, Mireia Uribe y Roberta Sommaggio, también a Alfredo Caro, Conrad, Silvia Ramírez y Fermín Alcázar por haber sabido compartir los buenos y malos momentos en el laboratorio. Siempre han estado listos para ayudarme en todo, tanto profesional como personalmente y por haber compartido momentos de lucha importantes. Sin duda se convirtieron en muy buenos amigos y lo seguirán siendo independientemente de la distancia que nos separe. Y junto a ellos a Jordi y Stefano. Gracias a todos para haberme dado tanto ánimo y haber compartido todos esos momentos que quedan escritos en nuestras historias y que evidentemente serán muy difíciles de olvidar.

Los comienzos no fueron fáciles, pero durante estos casi 5 años además he tenido la oportunidad de conocer una ciudad maravillosa como lo es Barcelona, con su peculiar y exquisita gastronomía, su hermosa geografía y arraigada cultura. También he podido disfrutar de la trayectoria de uno de los mejores equipos de fútbol del mundo, el *Barça!!* Solo quería agregar en este sentido *Visca Catalunya!!*

No podría dejar de mencionar todos los amigos de bachillerato y Universidad con los que he pasado momentos inolvidables de mi vida. En especial a Yosvani Soca, Mariela León y toda la graduación del año 1997 del pre-universitario de ciencias exactas “Martínez de Humboldt 7” en La Habana; a Yosvani Medina, Dasiel Borroto, Alexis Plascencia, Yadir y Maray, Daniel Bello, y toda la graduación del año 2003 de la licenciatura de Biología y Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Estos han sido años muy importantes de mi vida y les agradezco a todos por ello.

También agradecer a todos los compañeros y amigos del Departamento de Alérgenos y la Planta de Ingredientes Activos del Centro Nacional de Biopreparados en La Habana donde di mis primeros pasos en el mundo profesional y de investigación, en especial a Olga C. y Damaris, Elisa, Keiko, Wendy, Barbara Fernández, Barbara Luis, Barbara Navarro, Yunia, Benito, Migdalis, Raul L., Maytee, Alexis Labrada, Minerva, Julio César Portuondo, Marco A. Álvarez, Julio C. Mayo, Yoel Perea, Niurka Seuret. Además a toda la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, en especial al Dr. Felipe Moreno, Dr. Ignacio del Castillo y la Dra. Manuela por confiar en mí y darme la posibilidad de hacer una estancia en su laboratorio, donde consolidé mis conocimientos de genética y también conocí buenos amigos como Luis, Adolfo, Alexander y todos los demás compañeros.

Agradezco a mis padres, por su apoyo incondicional en cada proyecto de mi vida. Su educación, respeto y cariño hacia mí, forjaron la persona que soy hoy. Agradecer también a mis queridos abuelos que se que desde lo más alto comparten este importante momento conmigo. También a mis hermanos y sobrinos y toda la familia por su cariño y apoyo moral.

Por último y no menos importante, a mi querida Céline, gracias por acompañarme siempre y estar a mi lado en cada uno de los pasos que doy. También gracias por ayudarme a buscar las fuerzas que me posibilitaron continuar en aquellos momentos más difíciles. Espero que sean muchos los años que luchemos juntos.

Reciban todos, mis más sinceros Agradecimientos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABREVIATURAS.....	13
INTRODUCCIÓN	21
1.- ANTICUERPOS	23
1.1-Producción de anticuerpos.....	27
1.2- Anticuerpos naturales	31
1.3- Xenoanticuerpos.....	32
2.- SEPSIS	35
2.1- Definición y epidemiología	35
2.2- Fisopatología	36
2.3- Iniciación de la respuesta inflamatoria.....	40
2.4- Endotoxina	43
2.5- Tolerancia a la endotoxina	46
2.6- Modelos experimentales de sepsis.....	51
3.- MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CON FINES TERAPÉUTICOS.....	54
3.1.- Aplicaciones de la inmunidad innata en el tratamiento del cáncer	54
3.2- Tratamiento anti-angiogénico.....	56
3.3- Modelo transgénico murino RIP-Tag2.....	60
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
1.- ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS XENOANTICUERPOS.....	73
1.1- Determinación de anticuerpos anti- α Gal en ratón α Gal KO.....	73
1.2- Inducción de anticuerpos xenogénicos en rata	74
1.3- Reactividad cruzada de los xenoanticuerpos IgM e IgG con microorganismos	76
1.4- Líneas celulares mamíferas y condiciones de cultivo y preservación.....	77
1.5- Reactividad de xenoanticuerpos IgM e IgG con células de rata y de otras especies.....	79
1.6- Reconocimiento de carbohidratos por xenoanticuerpos IgM e IgG.....	79
1.7- Competición de reactividades de xenoanticuerpos IgM e IgG frente a células mamíferas y bacterias con carbohidratos específicos	79
2.- MODELO DE SEPSIS POR LIGADURA Y PUNCIÓN DEL CIEGO EN RATA	80
2.1- Modelo de sepsis por CLP en rata Lewis.....	80
2.2- Recogida y análisis de muestras en el estudio de CLP en rata	83
3.- MODELO DE SEPSIS POR LIGADURA Y PUNCIÓN DEL CIEGO EN RATÓN α GAL KO	84
3.1- Estudio farmacodinámico de la molécula GAS914 en ratones α Gal KO.....	84
3.2- Modelo de sepsis por CLP en ratón α Gal KO.....	85
3.3- Efecto terapéutico de la molécula GAS914 por inhibición de los anticuerpos anti- α Gal.....	86
3.4- Recogida y análisis de muestras en el estudio de CLP en ratón α Gal KO.....	86
3.5- Especificidad de la molécula GAS914 frente a xenoanticuerpos anti- α Gal	87
4.- PAPEL DE LOS XENOANTICUERPOS EN EL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS EN RATÓN RIP-TAG2	87
4.1- Modelo de ratón RIP-Tag2 e inducción de anticuerpos xenogénicos.....	87
4.2- Recogida y análisis de muestras en el estudio de angiogénesis.....	89
4.3- Reactividad de los xenoanticuerpos IgM e IgG con células endoteliales y tumorales.....	90
4.4- Reconocimiento de proteínas por xenoanticuerpos IgM e IgG	90
5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92
RESULTADOS	95
1.- EFECTO DE LOS ANTICUERPOS ANTI- α GAL EN LA SEPSIS QUE SE PRODUCE EN RATONES α GAL KO TRAS REALIZAR CLP	97
1.1- Estudio farmacodinámico de GAS914 en ratones α Gal KO	97
1.2- Modelo de sepsis moderada por CLP en ratón α Gal KO.....	98
1.3- Impacto de la depleción de los anticuerpos anti- α Gal en la sepsis moderada en ratón α Gal KO.....	99
1.4- Especificidad de la molécula GAS914 frente a xenoanticuerpos anti- α Gal IgM e IgG en ratones α Gal KO mediante Glycoarray.....	100
2.- IMPACTO DE LA ESTIMULACIÓN XENOGÉNICA EN LA SEPSIS QUE SE PRODUCE EN LA RATA TRAS REALIZAR UNA CLP	101

2.1- Establecimiento de un modelo de sepsis leve por CLP en rata Lewis.....	102
2.2- Impacto de la estimulación xenogénica con sangre de hámster en la sepsis de ratas Lewis.....	103
2.2.1- Patrón de xenoanticuerpos en la rata tras la inmunización con sangre de hámster.....	103
2.2.2- Supervivencia, bienestar y peso de ratas Lewis tras xenoinmunización con sangre de hámster y/o sepsis.....	105
2.2.3- Análisis hematológico y bioquímico de la xenoinmunización con sangre de hámster y/o sepsis en ratas Lewis.....	108
2.2.4- Análisis de citocinas en la xenoinmunización con sangre de hámster y/o sepsis en ratas Lewis.....	110
2.2.5- Estudio microbiológico de la sepsis en rata Lewis.....	111
2.3- Impacto de la inmunización xenogénica con sangre de cerdo en la sepsis de ratas Lewis.....	112
2.3.1- Patrón de xenoanticuerpos en la rata tras la inmunización con sangre de cerdo.....	114
2.3.2- Supervivencia y consecuencias de la xenoinmunización con sangre de cerdo y sepsis en ratas Lewis.....	114
2.3.3- Análisis microbiológico tras la xenoinmunización con sangre de cerdo y sepsis en ratas Lewis.....	115
3.-CARACTERÍSTICAS DE XENOANTICUERPOS PRESENTES EN LA RATA TRAS INMUNIZACIÓN XENOGÉNICA.....	115
3.1- Reactividad cruzada de xenoanticuerpos de rata Lewis anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG con microorganismos entéricos.....	116
3.2- Reactividad cruzada de xenoanticuerpos de rata Lewis anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG con células de otras especies.....	116
3.3- Reconocimiento de carbohidratos por xenoanticuerpos de rata anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG mediante Glycoarray.....	120
3.4- Inhibición de la reactividad cruzada de los xenoanticuerpos de rata IgG e IgM anti-hámster y anti-cerdo frente a enterobacterias y células de otras especies con diferentes carbohidratos.....	126
4.- IMPACTO DE LA INMUNIZACIÓN XENOGÉNICA INDUCIDOS EN LA ANGIOGÉNESIS Y TUMOROGÉNESIS DE RATONES RIP-TAG2.....	127
4.1- Inducción de anticuerpos xenogénicos en ratones RIP-Tag2.....	127
4.2- Perfil angiogénico y tumorogénesis en el modelo de ratón RIP-Tag2.....	129
4.3- Reconocimiento de proteínas por xenoanticuerpos IgG e IgM anti-humano.....	130
4.4- Análisis histológico del páncreas en ratones RIP-Tag2 tras la xenoinmunización.....	131
DISCUSIÓN.....	133
CONCLUSIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	155
ANEXOS.....	173
ANEXO 1. GLYCOARRAY (VERSIÓN 4.2) DEL CONSORTIUM FOR FUNCTIONAL GLYCOMIC.....	175
ANEXO 2. GLYCOARRAY DEL SHEMYAKIN & OVCHINNIKOV INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY.....	187
ANEXO 3. RESÚMENES Y CAPÍTULO DE LIBRO PUBLICADOS.....	199

RESUMEN

Los anticuerpos naturales, que han demostrado ser capaces de controlar la diseminación de virus y bacterias, así como mejorar la capacidad de respuesta del huésped contra microorganismos, también reaccionan de forma cruzada con antígenos de otras especies (xenoanticuerpos). Estos anticuerpos pueden tener potenciales efectos deletéreos para el huésped como los dirigidos contra galactosa α 1-3 galactosa (α Gal) que favorecen la sepsis por enterobacterias. Por otro lado, la xenoimmunización con células endoteliales, ha demostrado potenciales aplicaciones biomédicas como la capacidad de desarrollar un efecto anti-angiogénico y anti-tumoral.

En este estudio se investigó: a) el efecto de los anticuerpos anti- α Gal en la sepsis que se produce en ratones *knockout* para α Gal (α Gal KO) tras ligadura y punción de ciego (CLP); b) el impacto de la xenoimmunización en la sepsis que se produce en la rata tras realizar una CLP; c) las características de xenoanticuerpos presentes en la rata tras una xenoimmunización, especialmente la reacción cruzada de los mismos con otras especies y microorganismos; d) el impacto de la xenoimmunización en la angiogénesis y tumorigénesis de ratones RIP-Tag2.

Los ratones α Gal KO de nuestra colonia alcanzan espontáneamente elevados niveles de anticuerpos anti- α Gal que pueden ser inhibidos de manera específica con la molécula GAS914. En el modelo de sepsis por CLP en estos ratones, la inhibición de los anticuerpos anti- α Gal con GAS914 antes de la CLP conduce a una mayor supervivencia tras la sepsis. Sin embargo, la inhibición de los anticuerpos anti- α Gal con GAS914 a partir de las 12 h tras la CLP, no mejora la supervivencia de la sepsis.

La xenoimmunización de ratas con 3 inyecciones de sangre de hámster (SH) o cerdo (SC) a días alternos (d.a.) en la misma semana produce xenoanticuerpos naturales de predominio de IgM. Por el contrario, la inmunización de ratas con 3 inyecciones de sangre xenogénica a intervalos de 15 días (s.a.) genera xenoanticuerpos anti-hámster o anti-cerdo de predominio IgG.

La CLP en rata Lewis con aguja de 19G produce una sepsis poco grave, y caracterizada por un patrón de disminución de citocinas. La inmunización previa a la CLP con SH o SC a d.a. conduce a una disminución de la supervivencia de los animales, mientras que a s.a. no muestra diferencias respecto al control. La inmunización con S.H d.a puede inducir una disminución de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, que se asocia con una supervivencia de las ratas, o un aumento de las mismas, particularmente de leptina, que implica la mortalidad del animal.

Los xenoanticuerpos producidos en la rata por la inmunización con SH o SC reaccionan de forma cruzada con *Enterococcus faecalis* pero no con *Escherichia coli*, aislados en la sangre de ratas tras la CLP. Además, los xenoanticuerpos anti-hámster y anti-cerdo reaccionan de forma cruzada con células de hámster o de cerdo, cuando no se han utilizado en la inmunización, así como células humanas y de conejo. Anticuerpos contra melibiosa y ramnosa, parecen los responsables de la reacción cruzada de los xenoanticuerpos en rata con *E. faecalis*.

La xenoinmunización con sangre o células endoteliales humanas, pero no con SC, produce xenoanticuerpos IgM e IgG que reaccionan de forma cruzada con células endoteliales y tumorales de ratones RIP-Tag2, inhibiendo *in vivo* la angiogénesis tumoral en estos animales. Sin embargo, la xenoinmunización con SC en ratones también induce xenoanticuerpos IgG que reaccionan de forma cruzada con células humanas.

Se concluye que algunos xenoanticuerpos naturales contra carbohidratos pueden favorecer la sepsis causada por enterobacterias, por lo que su depleción podría ser una estrategia preventiva de la misma, mientras que los anticuerpos anti-carbohidrato producidos por xenoinmunización con hematíes tienen un efecto anti-angiogénico y podrían investigarse como inmunoterapia del cáncer.

ABREVIATURAS

A

ACCP	(del Inglés, <i>American College of Chest Physicians</i>)
Activin A:	Activina A
Agrin:	Agrina
ALP	Fosfatasa alcalina (siglas en inglés)
ALT	Alaninoaminotransferasa (siglas en inglés)
AST	Aspartato aminotransferasa (siglas en inglés)
ATCC:	(del Inglés, <i>American Type Culture Collection</i>)
ATS	Sociedad Americana Torácica (siglas en inglés)

B

B7-2/CD86:	(del Inglés, <i>Cluster of Differentiation 86</i>)
BCR	Receptor de células B (siglas en inglés)
beta-NGF:	Factor de crecimiento nervioso beta (siglas en inglés)
BSA:	Albumina de suero bobino (siglas en inglés)

C

Chemokine-1:	
CINC-1:	(del Inglés, <i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1</i>)
CINC-2 alpha:	(del Inglés, <i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 alpha</i>)
CINC-3:	(del Inglés, <i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-3</i>)
CLP:	Ligadura y punción del ciego (del inglés, <i>Cecal Ligation and Puncture</i>)
CNTF:	Factor neurotrófico ciliar
CTLA4	(del Inglés, <i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>)

D

DC:	Células Dendríticas (siglas en inglés)
DMEM:	(del Inglés, <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO:	Dimetil sulfóxido (siglas en inglés)
DTAF	Diclorotriazinil-aminofluoresceína

E

ECACC:	Colección Europea de Cultivo Celular (siglas en inglés)
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético (siglas en inglés)

ELISA:	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (del Inglés, <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EM:	Mitógeno endotelial (siglas en inglés)
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
EU:	Unidades de Endotoxina (siglas en inglés)

F

FAO:	Células de hepatoma de rata
Fas Ligand:	Fas ligando
FBS:	Suero fetal bovino (siglas en Inglés)
Fc	(del inglés, Fragment crystallizable)
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína (siglas en Inglés)
FL	Detector de fluorescencia
Fractalkine:	CX3CL1

G

GM-CSF:	Factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (siglas en Inglés)
---------	--

H

HMEC:	Células endoteliales de microvasculatura humana (siglas en inglés)
HSA	Albumina de suero humano (siglas en inglés)

I

ICAM-1:	Molécula de adhesión Inter-celular 1
IFN-gamma:	Interferon-gamma
IgG:	Inmunoglobulina isotipo G
IgM:	Inmunoglobulina isotipo M
IL:	Interleucina

K

KO:	(del Inglés, <i>Knockout</i>)
-----	--------------------------------

L

L35:	Linfocitos T porcinos de sangre periférica
Leptin:	Leptina

LEW-1A:	Células endoteliales de rata inmortalizadas con SV40
LIX:	(del inglés, <i>CXC chemokine</i>)
LPS:	Lipopolisacárido
L-Selectin:	L-selectina

M

MCP-1:	(del Inglés, <i>monocyte chemotactic protein-1</i>)
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIP-3alpha:	(del Inglés, <i>macrophage inflammatory protein-3-alpha</i>)
MMP:	Metaloproteasa de matrix
MMP-8:	Metaloproteinasa de matrix-8
MyD88:	(del Inglés, <i>Myeloid differentiation 88</i>)

O

OD:	Densidad óptica
-----	-----------------

P

p:	Porcino
PAEC:	Células endoteliales aorticas porcina (siglas en inglés)
PBS:	Tamponada fosfato salino (siglas en inglés)
PDGF-AA:	Factor de crecimiento derivado de plaqueta AA
PE:	Ficoeritrina
PGE ₂ :	Prostaglandina E2
Prolactin R:	Receptor de prolactina

R

RAGE:	(del inglés, <i>receptor of advanced glycation endproducts</i>)
RPMI	(del inglés, <i>Roswell Park Memorial Institut Medium</i>)

S

SCCM	Sociedad de Medicina de Cuidados Críticos (siglas en inglés)
SD	Desviación estándar de la media (siglas en inglés)
SDS:	dodecil-sulfato sódico (siglas en inglés)
SEM:	Error estándar de la media (siglas en inglés)

T

TCR	Receptor de células T (siglas en inglés)
Thymus Chemokine-1:	Citocina tímica-1
TIMP-1:	(del inglés, <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i>)
TNFR2	Receptor 2 del factor de necrosis tumoral (siglas en inglés)
TNF α :	Factor de necrosis tumoral alfa (siglas en inglés)
TXB ₂ :	Tromboxano B ₂

V

VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular (siglas en inglés)
-------	--

α 1,3-GT:	α 1,3-galactosiltransferasa
α Gal:	Gal α 1,3-Gal/Galactosa α 1,3-galactosa

Unidades de medida

%:	porcentaje
M:	Molar
h:	hora
l:	litro
m:	metro
ml:	mililitro
nm:	nanómetro
μ g:	microgramos
ng:	nanogramos
rpm:	revoluciones por minuto
s:	segundo
v/v:	volumen/volumen

INTRODUCCIÓN

1.- Anticuerpos

Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas, Ig) son glicoproteínas del tipo gamma globulina cuya producción constituye la función principal del sistema inmunitario humoral. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor en los linfocitos B, y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños. El anticuerpo típico está constituido por unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) de menor tamaño (Fig. 1), que forman monómeros con una unidad, dímeros con dos unidades o pentámeros con cinco unidades. Los anticuerpos son sintetizados por los linfocitos B, existiendo cinco clases diferentes de isotipos en mamíferos (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD) que desempeñan funciones diferentes, contribuyendo a dirigir la respuesta inmune adecuada para cada distinto tipo de elemento extraño (Fig. 2A). La IgG tiene además 4 isotipos que en humanos se identifican como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, mientras que en la rata y ratón son IgG1, IgG2a, IgG2b, e IgG3.

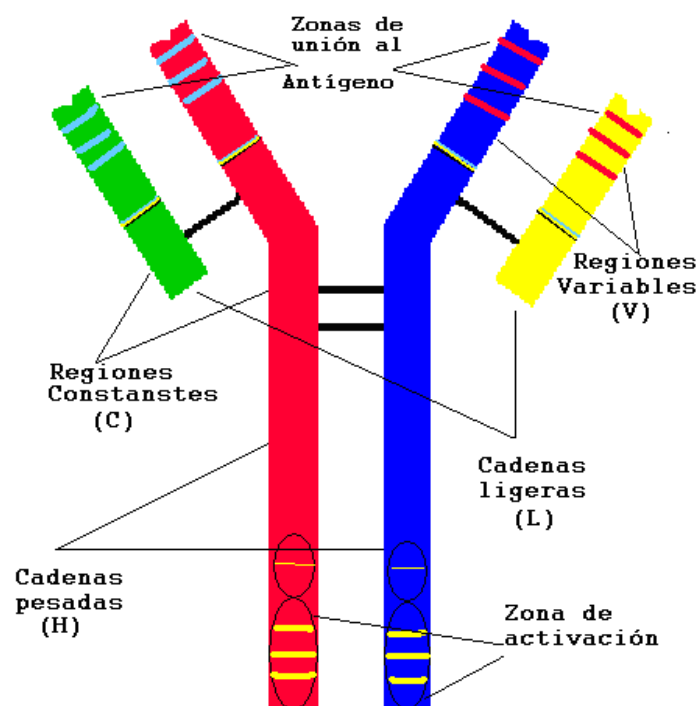


Figura 1. **Esquema de la estructura de un anticuerpo.** Las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) presentan dos regiones, o dominios, diferenciados: el dominio variable (V) y el dominio constante (C). El dominio variable es el responsable de reconocer al antígeno y unirse a él, ya que ahí se encuentra el paratopo. El dominio constante se une a las células del sistema inmune para activarlas. En las cadenas H aparece una zona denominada región bisagra. Esta región posee la característica de ser muy flexible, permitiendo adquirir distintos ángulos entre las regiones V y C, y entre los brazos de la

inmunoglobulina.

Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy semejante, una parte del ápice de la proteína es extremadamente variable, lo cual permite la existencia de millones de anticuerpos, cada uno ligeramente distinto. A esta parte de la proteína se la conoce como región variable (V) y cada una se une a un antígeno distinto. Los epítomos se unen con su anticuerpo en una interacción altamente específica, pudiendo neutralizar los elementos extraños directamente, mediante la activación del complemento, o permitiendo la acción de otras células sistema inmunitario (Fig 2B).

La extensa población de anticuerpos y su diversidad se genera por combinaciones al azar de un juego de segmentos genéticos que codifican diferentes lugares de unión al antígeno (o *paratopos*), que posteriormente sufren mutaciones aleatorias en esta zona del gen del anticuerpo, lo cual origina una diversidad aún mayor. La recombinación somática de las inmunoglobulinas, conocida también como Recombinación V (D) J, consiste en la generación de una región variable de inmunoglobulina exclusiva. La región variable de cada inmunoglobulina pesada está codificada por varias partes, que se conocen como segmentos. Éstos son conocidos como segmento variable (V), diversidad (D) y de acoplamiento (J). Los segmentos V, D y J se encuentran en las cadenas pesadas. En las ligeras solo encontramos los segmentos V y J. Hay múltiples copias de todos estos segmentos organizadas en tándem en el genoma de los mamíferos. En la médula ósea cada linfocito B en desarrollo ensambla la región variable de su inmunoglobulina seleccionando y combinando al azar un segmento V con uno D y otro J (o bien uno V y otro J en la cadena ligera). Puesto que existen múltiples copias ligeramente distintas para cada secuencia genética de los segmentos, se producen diferentes combinaciones que mediante este proceso generan un elevado número de paratopos y también diferentes especificidades de antígeno. Tras la producción de una inmunoglobulina funcional por un linfocito B durante la recombinación V(D)J no podrá expresar ninguna región variable diferente.

Otro mecanismo que genera diversidad en los anticuerpos tiene lugar en los linfocitos B maduros. Tras la activación por el antígeno, los linfocitos B comienzan a proliferar rápidamente. En estas células en rápida división, los genes que codifican los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras sufren una gran tasa de mutación puntual mediante un proceso llamado hipermutación somática. Ésta produce aproximadamente el cambio de un nucleótido por gen variable y célula en cada división celular. Como consecuencia, cualquier célula hija de una línea de linfocitos B adquiere una ligera diferencia en la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de sus cadenas de anticuerpos. La hipermutación somática sirve para incrementar la diversidad del reservorio de anticuerpos e influye en la

afinidad de la unión entre el antígeno y el anticuerpo. Algunas mutaciones puntuales terminarán por producir anticuerpos que tienen interacciones más débiles (baja afinidad) con su antígeno que el anticuerpo original, mientras que otras generarán anticuerpos con una interacción más fuerte (alta afinidad). Los linfocitos B que expresan anticuerpos de elevada afinidad en su superficie recibirán una fuerte señal para sobrevivir durante las interacciones con otras células, mientras que las que expresan anticuerpos de baja afinidad morirán por apoptosis. Así pues, los linfocitos B que expresan anticuerpos con una afinidad más elevada por su antígeno competirán con ventaja contra aquellos de menor afinidad en su función y supervivencia. El proceso de generación de anticuerpos con afinidad aumentada progresivamente se llama maduración de la afinidad. La maduración de la afinidad tiene lugar en los linfocitos B maduros tras la recombinación V(D)J y requiere el soporte de los linfocitos T colaboradores.

La Conmutación de la clase de la inmunoglobulina es un proceso biológico que tiene lugar tras la activación de los linfocitos B, y permite la producción de diferentes clases de anticuerpos (IgA, IgE, o IgG). Estas clases están definidas por las regiones constantes (C) de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Inicialmente los linfocitos B vírgenes expresan solo IgM e IgD de superficie con regiones de unión al anticuerpo idénticas. Cada isotipo está adaptado para una función distinta y por tanto, tras la activación, se necesita un anticuerpo IgG, IgA o IgE para la eliminación eficaz del antígeno (Fig. 2A). La conmutación de clase permite a la dinastía de un solo linfocito B producir anticuerpos de diferentes isotipos. Solo la región constante de la cadena pesada del anticuerpo cambia durante la conmutación de clase. Las regiones variables, y por tanto la especificidad de antígeno, permanece invariable. De ese modo se producen anticuerpos con la función adecuada para cada amenaza del antígeno. La conmutación de clase se inicia por citoquinas, dependiendo el isotipo generado de que citoquinas estén presentes en el entorno del linfocito B.

A

Isotipo de anticuerpo	Funciones específicas del isotipo
IgG	<ul style="list-style-type: none"> • Neutralización de microorganismos y toxinas. • Oponization of antigens para fagocitosis por macrofagos y neutrófilos. • Activación de la vía clásica del complemento. • Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por células “natural killer”. • Inmunidad neonatal: Transfiere anticuerpos maternos atraves de la placenta. • Regulación de la activación de células B.
IgM	<ul style="list-style-type: none"> • Activación de la vía clásica del complemento.
IgA	<ul style="list-style-type: none"> • Inmunidad de mucosas: secreción de IgA en el lumen de gastrointestinal y tracto respiratorio, neutralización de microorganismos y toxinas.
IgE	<ul style="list-style-type: none"> • Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por eosinófilos. • Degranulación de mastocitos (reacciones de hipersensibilidad inmediatas).
IgD	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor de antígenos en los linfocitos B que no han sido expuestos a los antígenos.

B

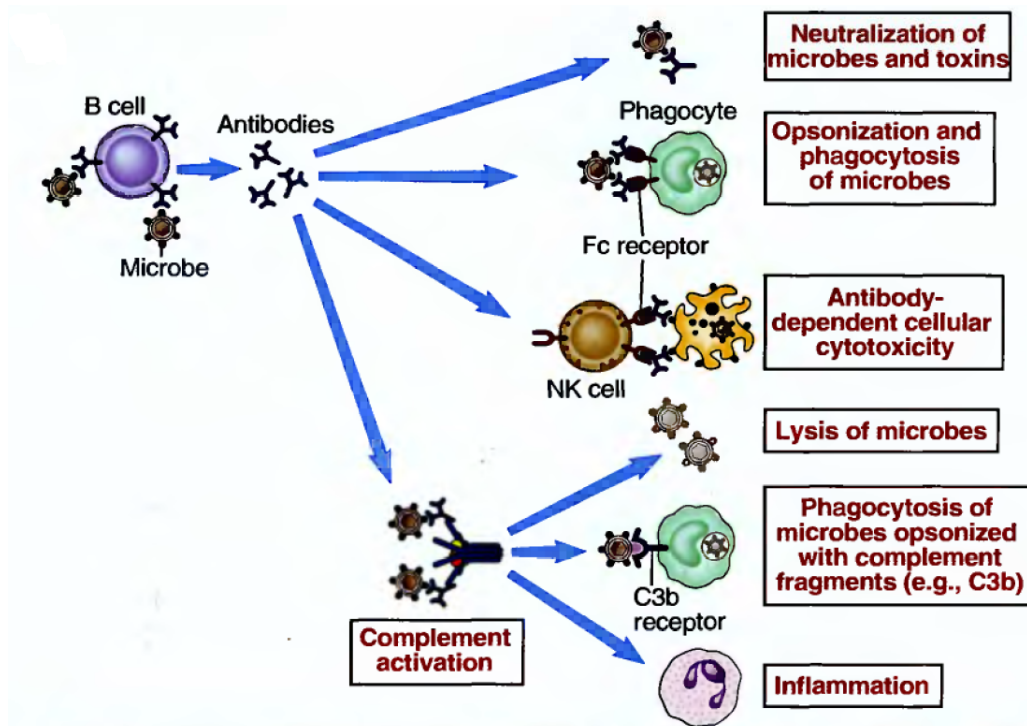


Figura 2. **Función efectora de los anticuerpos.** Los anticuerpos son producidos tras la activación de linfocitos B por antígenos y otras señales. Los anticuerpos de diferentes clases cadenas pesadas (isotipos) poseen diferentes funciones efectoras (A y B) (Abbas et al., 2004).

1.1-Producción de anticuerpos

En respuesta a la exposición a un antígeno los linfocitos B producen los anticuerpos. La diversidad de los tipos de antígeno ha llevado a que existan distintas formas de estimular los linfocitos B para producir Ig. Desde este punto de vista, se puede afirmar que la activación de las células B es más compleja que la de las células T. Los antígenos que inducen la producción de anticuerpos *in vivo* pueden dividirse en dos categorías: timo-dependientes (TD), que requiere la colaboración de las células T para la estimulación de las B y timo-independiente (TI), que no requiere la participación de estas células. En la Tabla 1 se resumen las propiedades de los antígenos y las características de las respuestas de anticuerpos que inducen.

Tabla 1. **Propiedades de los antígenos timo-dependientes y timo-independientes.** (Mond et al., 1995)

Propiedades	Timo-dependiente	Timo-independiente
Naturaleza química	Proteínas	Antígenos poliméricos, especialmente polisacáridos; también glucosídicos, ácidos nucleicos
Respuesta de anticuerpos en Ratones atímicos Cultivos deplecionados de células T	No No	Sí Puede estar disminuida
Características de la respuesta de anticuerpos Cambio de isotipo Maduración de afinidad Respuesta secundaria (células B de memoria)	Sí Sí Sí	No (habitualmente) No No o escasa
Capacidad para inducir hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)	Sí	No

La respuesta contra antígenos proteicos requiere la colaboración de los linfocitos T, y se distingue de otras formas de activación de la células B porque que da lugar a Ig de dos isotipos (IgG e IgE), produce una hipermutación somática y genera potentes respuestas de memoria inmunológica. La necesidad de células T colaboradoras explica el porqué los antígenos proteicos no inducen respuestas de anticuerpos en animales con déficit de células T, como los ratones atímicos congénitos (desnudos, BALB/c-nu) o timectomizados neonatalmente. La Figura 3 muestra la interacción secuencial que tiene lugar en la estimulación de la células B por parte de las células T y que se puede dividir en cuatro fases: 1) las células B capturan el antígeno mediante las Ig presentes en la membrana celular; 2) el antígeno es internalizado y péptidos del antígeno son generados y transportados a la superficie

de la célula en asociación con moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); 3) células T que reconocen la combinación péptido-MHC se activan y expresan nuevos receptores como el ligando de CD40 (CD40L) y secretan citocinas; 4) la interacción de CD40 en la superficie de las células B con su receptor CD40L en las células T induce la proliferación de las células B y, en combinación con las citocinas producidas, el cambio del isotipo de Ig y secreción de las mismas. En humanos, las citocinas producidas incluyen IL-4, que aumenta la proliferación y promueve la producción de IgG4 e IgE, IFN- γ que induce la producción de IgG2a, e IL-5 y 6 que promueven la secreción de múltiples tipos de Ig.

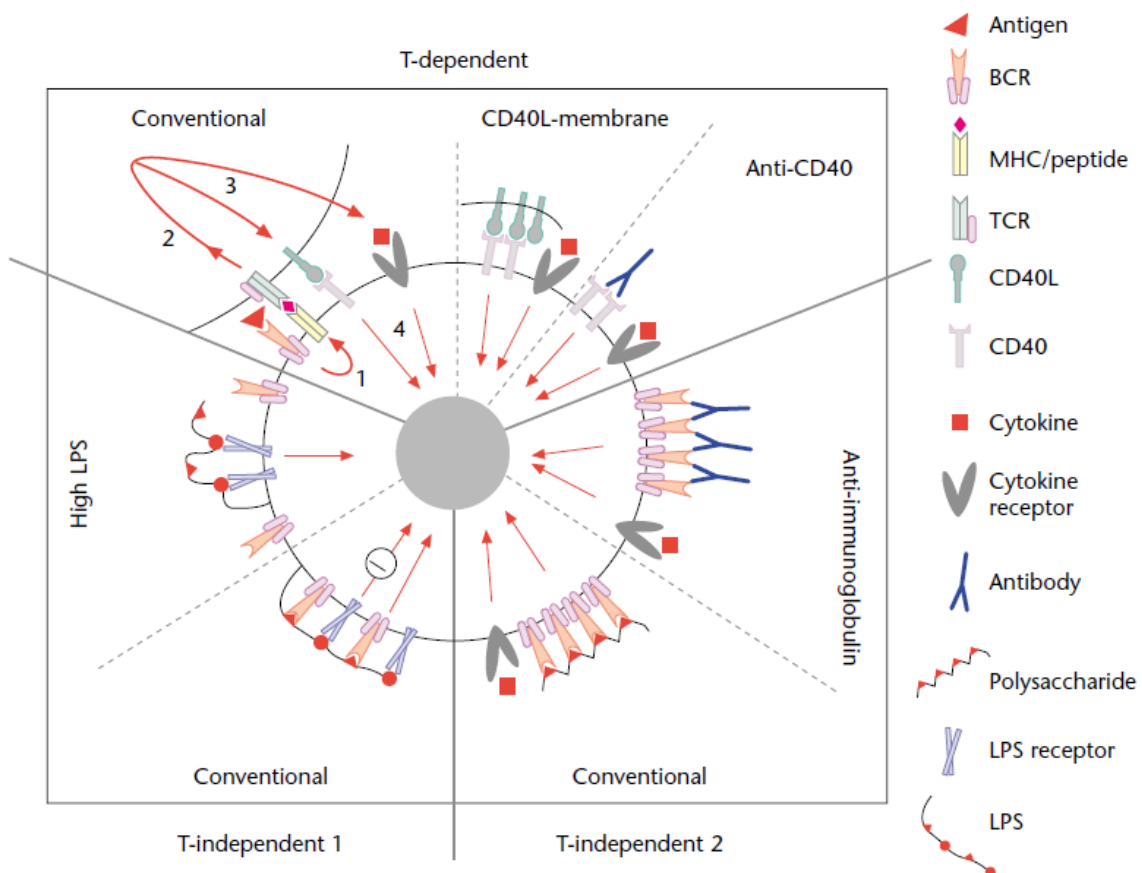


Figura 3. **Modos de activación de las células B:** Timo-dependiente y Timo-independiente 1 y 2 (Hodgkin, 2005).

Al contrario de lo que ocurre con los antígenos proteicos, otros antígenos como polisacáridos, glucolípidos y ácidos nucleicos no pueden ser procesados y presentados en asociación a moléculas MHC y por tanto, no pueden ser reconocidos por células T colaboradoras denominándose TI. Estos antígenos inducen la producción de anticuerpos específicos en animales con déficit de células T como los ratones atímicos. Tomando como

base los experimentos en ratones, se han clasificado los antígenos TI en dos grupos (Fig 3). El prototipo de antígeno TI-1 es la endotoxina o lipopolisacárido (LPS), que estimula las células B sin necesidad de ningún otro tipo celular. El LPS es el principal componente de las paredes celulares de las bacterias gram negativas. A concentraciones bajas, el LPS estimula la producción de anticuerpos específicos en roedores. A altas concentraciones es un activador policlonal de células B, estimulando el crecimiento y la diferenciación de prácticamente todas las células B sin unirse a la Ig de membrana. Se ha postulado que un componente de la molécula LPS se une a las células B y activa directamente a las células, es decir, el antígeno suministra al mismo tiempo la primera y segunda señales necesarias para la activación del linfocito B. El receptor de la célula B descrito para el LPS es un receptor de tipo Toll (*Toll like receptor*; TLR) y más concretamente el 4 (Hayashi et al., 2005; Ueda Y, et al., 2007).

Los polisacáridos y los otros antígenos TI mencionados se denominan antígenos TI-2 y, en este caso, la depleción completa de las células T no suprime la producción de anticuerpos contra estos antígenos. Todos estos antígenos se caracterizan por ser multivalentes pudiendo inducir el entrecruzamiento máximo con las Ig de membrana en células B específicas, lo que conduce a la activación, sin necesidad de colaboración análoga de la célula T colaboradora (Fig. 3). La activación de la célula B por antígenos TI-2 es una situación en la que la traducción de señales mediada por la Ig de membrana es crítica para las respuestas subsiguientes de las células. No está claro si las respuestas de las células B a los antígenos TI dependen de otras segundas señales. Experimentos con ratones sugieren que las respuestas de anticuerpos a los polisacáridos requieren la presencia de un pequeño número de macrófagos y/o de células T colaboradoras. Aunque la proliferación de las células B se puede aumentar en presencia de IL-4, y la adición de IL-2 y IL-5 promueve la secreción de Ig, la naturaleza y mecanismo(s) que regulan la producción de Ig por antígenos TI-2 continúa siendo desconocida.

Las respuestas de anticuerpos a los antígenos TI tienen lugar en determinadas localizaciones anatómicas en los tejidos linfoides. Los macrófagos localizados en las zonas marginales de los folículos linfoides del bazo son singularmente eficaces para atrapar polisacáridos que se han inyectado por vía intravenosa. Dichos antígenos pueden persistir durante períodos prolongados en la superficie de los macrófagos de la zona marginal donde son reconocidos por células B específicas, o bien pueden ser transferidos desde la zona marginal a los folículos adyacentes. Las zonas marginales sólo están presentes en el bazo. Esto explica probablemente por qué los individuos esplenectomizados no desarrollan

respuestas intensas de anticuerpos a los polisacáridos y son susceptibles a la infección por bacterias encapsuladas como el neumococo. En la Tabla 2 se resumen diferentes respuestas de anticuerpos producidos a partir de antígenos TI de bacterias en modelos *in vivo* murinos.

Tabla 2. Respuesta de anticuerpos T independiente frente a microorganismos.

Patógeno/antígeno	Modelo de ratón	Ig producida	Refs.
Polioma virus	TCR $\beta^{-/-}$ x $\delta^{-/-}$	IgM, IgG	Szomolanyi-Tsuda et al., 2001
	Transferencia células en SCID	IgM, IgG	Guay et al., 2009
	Transferencia CR2 $^{-/-}$ células B en SCID	IgM, IgG	Szomolanyi-Tsuda et al., 2006
VSV	TCR $\alpha^{-/-}$, TCR $\beta^{-/-}$	IgM, IgG2a	Maloy et al., 1998
Rotavirus	TCR $\alpha\beta^{-/-}$ x $\gamma\delta^{-/-}$	IgM, IgG, IgA	Franco et al., 1997
	TCR $\alpha\beta^{-/-}$	IgA	VanCott et al., 2001
LCMV, VSV, Pichinde virus	CD154 $^{-/-}$	IgM, IgG2a	Borrow et al., 1996
Virus de la Influenza	CD4 $^{-/-}$	IgM, IgG1, IgG2b, IgG3	Sha et al., 2000
	CD40 $^{-/-}$, MHCII $^{-/-}$	IgM, IgG	Lee et al., 2005
<i>Ehrlichia muris</i>	CD4 $^{-/-}$, CD8 $^{-/-}$, MHCII $^{-/-}$	IgM, IgG1, IgG2c, IgG2b, IgG3	Bitsaktsis et al., 2007
<i>Ehrlichia chafeensis</i>	CD4 $^{-/-}$	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3	Ganta et al., 2004
<i>Borrelia burgdorferi</i>	TCR $\beta^{-/-}$ TCR $\beta^{-/-}$ x $\delta^{-/-}$	IgM, IgG3	McKisic et al., 2000
<i>Bacillus anthracis</i>	TCR $\alpha^{-/-}$	IgG	Harvill et al., 2008
<i>Yersinia enterocolitina</i>	Balc-nu	IgG	Autenrieth et al., 1993
<i>Citrobacter rodentium</i>	CD4 $^{-/-}$	IgM, IgG1, IgG2c, IgG2b, IgG3, IgA	Bry et al., 2004
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	TCR $\alpha^{-/-}$	IgG, IgA	Baker et al., 2002
Melanina (<i>C. neoformans</i>)	Balc-nu	IgM, IgG1, IgG2b, IgG3	Nosanchuk et al., 1998
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Balc-nu	IgM, IgA	Adjei et al., 1999
Protoscolex (<i>E. Granulosus</i>)	CD4 $^{-/-}$	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3	Baz et al., 2008
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Balc-nu, TCR $\beta^{-/-}$, MHC I $^{-/-}$, MHCII $^{-/-}$	IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3	Dai et al., 2001

1.2- Anticuerpos naturales

Desde finales del siglo XIX y principios del XX se conoce la existencia en humanos, y en general en todas las especies animales, de anticuerpos circulantes IgM e IgG que reaccionan con una amplia variedad de antígenos, sin que exista evidencia de una exposición previa a ninguno de ellos. Estos anticuerpos preformados fueron originalmente denominados anticuerpos naturales para distinguirlos de los anticuerpos inducidos producidos por una estimulación específica. Las primeras observaciones sobre las propiedades funcionales de los anticuerpos naturales se encuentran en estudios sobre la transfusión de sangre y resistencia

bacteriana. En 1875 Landois observó que la sangre de otras especies no podía ser transfundida a los humanos ni a otras especies distintas a la del donante. Sus estudios inspiraron a Landsteiner a considerar la posibilidad de que el suero podía usarse para detectar diferencias genéticas entre individuos, lo que sirvió para dilucidar la existencia de los grupos sanguíneos. El estudio de los anticuerpos contra los grupos sanguíneos A y B fue el que permitió generar los conceptos que aún persisten hoy en día sobre la naturaleza de los anticuerpos naturales.

En 1903, mientras Landsteiner empezaba a reconocer la naturaleza de las hemaglutininas y hemolisinas de los grupos sanguíneos, Kolle también observó que cabras, asnos, caballos, conejos, y vacas tenían elementos en el suero capaces de aglutinar diversos tipos de cólera, independientemente de que el animal hubiera sido previamente infectado con el organismo o no. Cuatro años más tarde, Burgi observó que el suero humano, de conejo, perro, pollo, oveja, cabra, caballo, vaca y coballa podía aglutinar entre un 40 y 100% de bacterias. Este descubrimiento constituyó la base para considerar la existencia de anticuerpos naturales capaces de reconocer y neutralizar agentes infecciosos, siendo su origen la exposición previa a microorganismos ambientales y endógenos (González et al., 1988; Quan et al., 1997).

Los anticuerpos naturales se caracterizan por ser primariamente IgM, mostrar una baja afinidad por los antígenos y ser polireactivos (Logtenberg, 1990). Fundamentalmente reconocen antígenos glucídicos, particularmente aquellos presentes en la pared de las bacterias y otros agentes infecciosos. Así, los anticuerpos anti-A se postula que pueden originarse como consecuencia de la respuesta inmune contra el virus de la gripe, cuyos epítomos son suficientemente similares a la α -galactosamina del antígeno A como para permitir una reacción cruzada. En el caso de los anticuerpos anti-B se originarían como consecuencia de la estimulación por enterobacterias Gram – como la *Escherichia Coli*, que reaccionarían de forma cruzada con la α -galactosa del grupo B (van Oss, 2004).

Los anticuerpos naturales son producidos por una única subpoblación de linfocitos B TI, las células B-1a/B-1b (Mond et al., 1995). La estimulación de este subgrupo de células determina el reordenamiento y consiguiente uso de las regiones variables pesadas y ligeras de los genes de las Ig en su configuración germinal. Los anticuerpos codificados en esta configuración representan una respuesta inmune innata, primitiva y rápida, aunque inespecífica, contra los agentes infecciosos presentes en el ambiente. Permiten neutralizar la capacidad infectiva de bacterias y virus (Ochsenbein et al., 1999) y al mismo tiempo estimular la capacidad fagocítica de los macrófagos (Carroll et al., 1998). Sin embargo, una de las cuestiones que permanece por dilucidar es la relación de los anticuerpos naturales con los

inducidos tras la exposición al antígeno. Hasta que punto son distintos en especificidad, función y origen continúa siendo un tema de controversia, siendo las investigaciones sobre xenotrasplantes las que han permitido un estudio más detallado de la respuesta mediada por anticuerpos naturales.

1.3- Xenoanticuerpos

Los anticuerpos naturales incluyen un subgrupo de anticuerpos denominados xenogénicos o xenoanticuerpos que reaccionan, además de con agentes infecciosos, con antígenos expresados en células y tejidos de otras especies. Animales que crecen en ausencia de estímulos ambientales por microorganismos y antígenos alimenticios no desarrollan xenoanticuerpos hasta que la protección ambiental es eliminada y la flora endógena y ambiental se desarrolla (Hammer et al., 1992). El papel de los xenoanticuerpos en el xenotrasplante ha permitido examinar las características y cinética de la respuesta mediada por anticuerpos naturales. Tras la exposición a un xenoinjerto el título de xenoanticuerpos aumenta rápidamente. En el caso del xenotrasplante de órganos o tejidos de hámster a rata, esta alcanza en 2 o 3 días un título que es capaz de causar el rechazo del xenoinjerto (Hasan et al., 1992). Sin embargo, los antígenos reconocidos por los anticuerpos tras la exposición a los xenoantígenos no cambian en comparación a la que había antes de la misma, indicando que el rechazo está mediado por anticuerpos naturales.

Los estudios genéticos de la respuesta xenogénica a xenoantígenos en roedores evidenciaron que sólo un número reducido de genes de Ig participan en la misma y son TI (Cramer, 2000). Inicialmente la respuesta de xenoanticuerpos incluye fundamentalmente IgM, que alcanzan su máximo alrededor de una semana después de la exposición, para disminuir posteriormente coincidiendo con un aumento de las IgG si se evita el rechazo del xenoinjerto en los primeros días. El cambio de IgM a IgG incluye inicialmente el mantenimiento de los mismos genes de la región variable de las Ig, mientras que en fases más avanzadas también existen genes que presentan mutaciones somáticas en la región variable de las IgG, lo que indicaría una producción de xenoanticuerpos TD. Esta dinámica de producción de xenoanticuerpos explica los requerimientos de inmunosupresión para prevenir el rechazo de injertos de hámster en rata. Los inmunosupresores que actúan exclusivamente sobre los linfocitos T, como la ciclosporina o el tacrolimus, no pueden prevenir por sí solos el rechazo de los xenoinjertos de hámster (Hasan et al., 1992; Yin et al., 1998). Sin embargo,

la utilización de tratamientos como ciclofosfamida o leflunomida durante un periodo inicial de una a dos semanas, que es cuando tiene lugar la producción de anticuerpos TI, permite evitar el rechazo xenogénico de forma indefinida manteniendo posteriormente únicamente la inmunosupresión de los linfocitos T con ciclosporina o tacrolimus (Hasan et al., 1992; Yin et al., 1998).

En humanos y primates no humanos del viejo mundo, hasta el 1% de los anticuerpos naturales incluyen IgM e IgG que se dirigen contra el epítipo galactosa- α (1,3)-galactosa (α Gal), un carbohidrato que se expresa en glicoproteínas y glicolípidos de la mayoría de especies animales inferiores y primates del nuevo mundo (Galili et al., 1984; Ross et al., 1993). Humanos y primates no humanos del viejo mundo no expresan el enzima α 1,3-galactosiltransferasa, responsable de la generación de los residuos α Gal y producen anticuerpos anti- α Gal. De forma similar a lo que ocurre con otros xenoanticuerpos, la asociación de la exposición a agentes ambientales y la aparición de xenoanticuerpos anti- α Gal se ha demostrado en niños y primates no humanos recién nacidos (Minanov et al., 1997). Los anticuerpos anti- α Gal se considera que se producen como consecuencia de la estimulación antigénica continua por antígenos glucídicos presentes en enterobacterias de la flora intestinal normal (Galili et al., 1988). La eliminación sostenida de bacterias Gram negativas de la flora intestinal mediante tratamiento con antibióticos se ha asociado con una disminución de los anticuerpos anti- α Gal de tipo IgG (Máñez et al., 2001).

La existencia de anticuerpos naturales contra el epítipo α Gal fue durante muchos años la principal barrera para el xenotrasplante de injertos porcinos en humanos y primates no humanos del viejo mundo, ya que producían un rechazo hiperagudo de los xenoinjertos. En estos casos, el título de anticuerpos naturales anti- α Gal es suficiente para producir un rechazo inmediato de los xenoinjertos, no siendo necesario el aumento de anticuerpos naturales observado en la rata tras la exposición a injertos de hámster. La depleción continuada de los anticuerpos anti- α Gal mediante polímeros que expresan este epítipo (Katopodis et al., 2002) o la producción de cerdos “knockout” para el antígeno α Gal (Lai et al., 2002), ha evidenciado la presencia de otros anticuerpos que también pueden producir el rechazo xenogénico, razón por la que no ha sido posible la aplicación clínica de este tipo de trasplantes.

Estudios genéticos en ratones “knockout” para el gen α 1,3-galactosiltransferasa (α Gal KO), que producen anticuerpos anti- α Gal como los humanos o primates no humanos, y en humanos expuestos a hepatocitos y células endoteliales de cerdo, han demostrado que la respuesta a la inmunización xenogénica es similar a la descrita en ratas (Cramer, 2000).

La región variable de las Ig tanto en anticuerpos anti- α Gal IgM e IgG utiliza únicamente genes expresados en la configuración de línea germinal de los anticuerpos naturales. En consecuencia, la respuesta inicial a la inmunización xenogénica es mediada por anticuerpos naturales originariamente dirigidos a la protección contra microorganismos, probablemente como resultado de la presencia de antígenos glucídicos compartidos por ambos elementos (Cramer, 2000).

El papel fisiológico de los xenoanticuerpos, y más concretamente de los anticuerpos anti- α Gal, es desconocido, particularmente de las IgM. Los anticuerpos anti- α Gal IgG reaccionan con eritrocitos senescentes o dañados y con células tumorales, sugiriendo un potencial papel de estos anticuerpos en la eliminación de este tipo de células (Galili et al., 1986; Galili et al., 1989). Además, como se ha indicado, los anticuerpos anti- α Gal IgG reaccionan con enterobacterias de la flora endógena como *Escherichia Coli*, *Klebsiella* o *Salmonella* considerándose que forman parte de la inmunidad humoral contra estos organismos (Galili et al., 1988). El reconocimiento de enterobacterias por parte de los anticuerpos anti- α Gal IgG es significativamente mayor cuando estas se aíslan de la sangre en comparación con las de las heces (Hamadeh et al., 1992).

Curiosamente los anticuerpos anti- α Gal IgG pueden actuar de forma totalmente contrapuesta sobre bacterias Gram negativas aisladas en la sangre. Sobre algunas cepas de *Serratia marcescens* desempeñan la función que podríamos considerar esperada, activando el complemento y produciendo la lisis de la bacteria (Hamadeh et al., 1992). Sin embargo, sobre otras cepas de *Serratia marcescens* aisladas en la sangre los anticuerpos anti- α Gal IgG protegen a la bacteria haciéndola resistente a la activación del complemento (Hamadeh et al., 1992). Una similar acción protectora de los anticuerpos anti- α Gal también se ha descrito para la *Neisseria meningitidis* (Hamadeh et al., 1995). El efecto lítico o protector de los anticuerpos sobre las bacterias parece depender de la localización de carbohidratos de la estructura del LPS a los que se une. Si lo hace a los polisacáridos capsulares se produce una activación del complemento y la lisis de la bacteria, mientras que si lo hace a los del pili de la endotoxina se produce una inhibición del complemento.

Estos datos sugieren que no todas las respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos naturales, concretamente por xenoanticuerpos, son beneficiosas para el huésped. Así, los anticuerpos anti- α Gal pueden favorecer, en lugar de proteger, la aparición de infecciones graves como la sepsis por algunas cepas de enterobacterias al bloquear la activación del complemento. Se ha demostrado que la presencia de niveles elevados de anticuerpos

anti- α Gal IgM al inicio del tratamiento crónico con diálisis se correlaciona con unos niveles elevados de factor de necrosis tumoral (TNF)- α y se asocia con una mayor incidencia de peritonitis entérica, en pacientes tratados con diálisis peritoneal (Pérez-Fontán et al., 2006). La mortalidad durante los siguientes 5 años en pacientes tratados tanto con diálisis peritoneal como con hemodiálisis fue también significativamente superior en los pacientes que mostraron unos niveles iniciales elevados de anti- α Gal IgM, aunque no se pudo demostrar que la causa de la muerte fuera por complicaciones infecciosas.

2.- Sepsis

2.1- Definición y epidemiología

Según la conferencia de consenso de las principales sociedades científicas internacionales del paciente crítico (Levy et al., 2003), la sepsis se define como la infección que afecta al estado general del paciente, considerándose grave cuando provoca el mal funcionamiento de forma aguda de órganos vitales diferentes al que se encuentra infectado. La forma de sepsis más grave es el shock séptico que provoca una disminución mantenida de la tensión arterial que impide el correcto aporte de oxígeno a los tejidos. La sepsis se caracteriza por una respuesta multisistémica frente a la agresión de un microorganismo patógeno, constituida por redes de interacciones bioquímicas, celulares y de órgano-órgano. Un elemento central que une estas respuestas es la inflamación que mientras intenta defender al organismo puede causar daños a distancia.

La sepsis es un problema de salud pública (Angus et al., 2001; Martin et al., 2003; Vincent et al., 2006). La incidencia de sepsis grave varía según los estudios y la población estudiada. En España se ha reportado una incidencia de sepsis grave de 104 -140 casos por 100.000 habitantes y año, y una incidencia de shock séptico de 31 casos por 100.000 habitantes y año (Esteban et al., 2007). Esto supone que cada año hay en España alrededor de 50.000 casos de sepsis grave. En Estados Unidos la incidencia anual de sepsis grave se ha estimado en cerca de 300 casos/100.000 habitantes (Angus et al., 2001) y a nivel mundial se producen 18 millones de casos de sepsis cada año, lo que equivale a la suma de las poblaciones de Dinamarca, Finlandia, Irlanda y Noruega.

La mortalidad de la sepsis grave se encuentra entre el 28 y el 50% correspondiente al shock séptico, dependiendo del tipo de microorganismo causal, el lugar de la infección, edad, sexo, enfermedades concomitantes, gravedad de la enfermedad y genotipo del paciente

(Alberti et al., 2002; Brun-Buisson et al., 2004b; Martin et al., 2003; Esteban et al., 2007). Esto supone 17.000 fallecimientos anuales por sepsis en España y 1.400 muertes diarias por sepsis en todo el mundo. Estas cifras de incidencia y mortalidad de la sepsis grave superan las de otras enfermedades con un gran impacto social como el cáncer de mama o el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Baum, 2002; Piot et al., 2001). La incidencia de sepsis se prevé que aumente un 1,5% por año con el envejecimiento progresivo de la población y la mayor utilización de tratamientos invasivos (Angus et al., 2001; Martin et al., 2003; Weycker et al., 2003). La sepsis también reduce la calidad de vida de muchos de los pacientes que sobreviven (Martin et al., 2003; Heyland et al., 2000; Perl et al., 1995).

La sepsis grave conlleva una importante carga económica. En un estudio del 2001 el gasto anual estimado por sepsis grave en los Estados Unidos fue superior a los 16.000 millones de dólares (Angus et al., 2001). En España, otro estudio también del 2001 estimó el gasto anual por sepsis grave en 345 millones de euros (Davies et al., 2001), y otro estudio más reciente estimó el gasto anual por sepsis grave en la Comunidad de Madrid en 70 millones de euros (Iñigo et al., 2006). Por tanto, es probable que en la actualidad el gasto en España por el tratamiento de la sepsis grave se acerque los 600 millones de euros anuales.

2.2- Fisopatología

El Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple (MOD) inducido por la sepsis severa no es secundario a la acción directa de las bacterias. Es consecuencia de la acción de los mediadores de inflamación producidos por el propio paciente. Actualmente se acepta que la MOD de la sepsis severa es la manifestación de una lesión endotelial generalizada, que se observa en el contexto de una respuesta excesiva y descontrolada de los mediadores de inflamación y antiinflamatorios, que son liberados normalmente frente a la agresión de microorganismos (Fig. 4) (Carrillo et al., 2002; Balk, 2000). La liberación de endotoxinas o exotoxinas por parte de las bacterias induce la activación del complemento y elementos celulares como los macrófagos y linfocitos, que sintetizan y liberan citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias que provocan cambios a nivel endotelial, lo que modifica el equilibrio pro-coagulante/anti-coagulante y causa un mal funcionamiento de la microcirculación con disfunción orgánica.

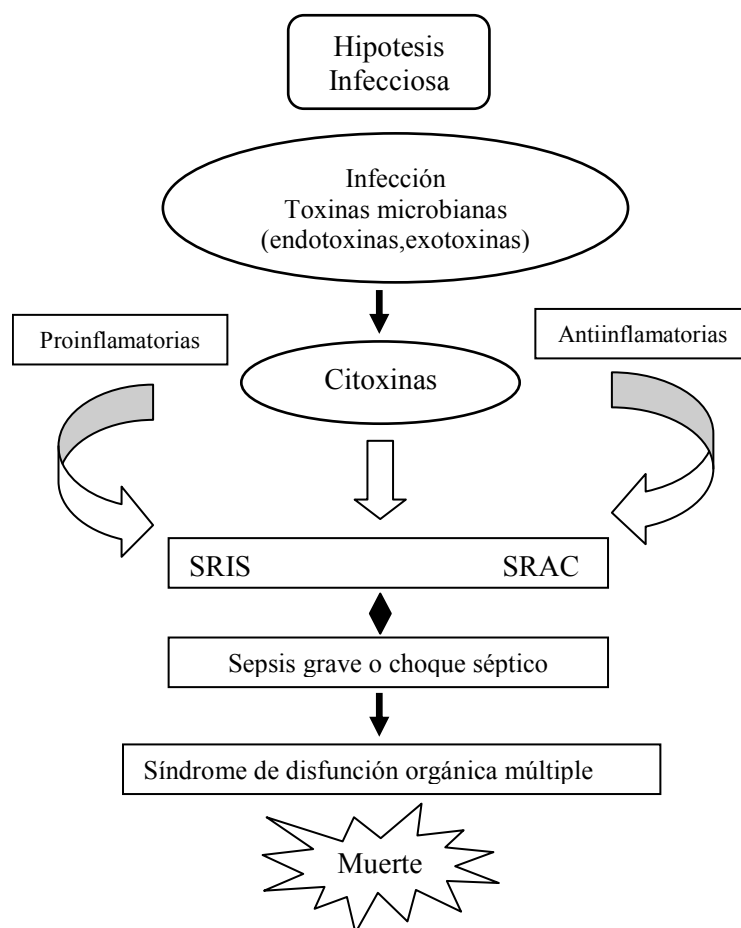


Figura 4. **Relación entre el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora en sepsis grave** (Misas et al., 2005).

En los años 1990, la sepsis fue considerada como una exacerbada producción de mediadores pro-inflamatorios [TNF- α , interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, interferón gamma (IFN- γ)] que se denominó “tormenta de citocinas”, y diversos tratamientos antiinflamatorios fueron diseñados para neutralizar estos mediadores (Remick, 2003). Sin embargo, estos tratamientos fracasaron y evidenciaron que, aunque algunos pacientes mueren durante la fase de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) inicial de la sepsis, la mayoría lo hacen posteriormente y se asociaba con un estado de inmunosupresión (Boomer et al., 2011). Así, el plasma de pacientes con sepsis tienen la capacidad de inhibir funciones del leucocito, y pueden ser considerados como un medio inmunosupresor (Cavaillon, 2002). También pacientes con sepsis mostraron un estado inmune alterado, según la evaluación tanto *in vivo* con anergia a antígenos por pruebas cutáneas (Meakins et al., 1977; Christou, 1985), como pruebas *in vitro* como la proliferación de linfocitos (Miller y Baker, 1979). Esta alteración de la respuesta inmunitaria podría explicar la elevada susceptibilidad de los pacientes con sepsis ingresados en cuidados intensivos a otras infecciones nosocomiales.

Palabras como anergia (Dawson et al., 1982), inmunodepresión (Angele y Faist, 2002) e inmunoparálisis (Volk et al., 2000) han sido empleadas para definir el estado inmune de los pacientes con sepsis.

Los macrófagos y linfocitos T se consideran capitales en la orquestación de la respuesta inflamatoria, particularmente los linfocitos T CD4⁺ colaboradores de tipo 1 y 2 (TC1 y TC2), que producen perfiles distintos de citocinas. En la sepsis la respuesta inmunitaria inicial inflamatoria es mediada por linfocitos TC1 y evoluciona a TC2 que produce una profunda inmunosupresión. En este punto se producen linfocinas como IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13 (Rittirsch et al., 2008), y mediadores como el receptor soluble del TNF (sTNFR) (Girardin et al., 1992), el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) (Fischer et al., 1992), y el factor de crecimiento y transformación (TGF)- β (Marie et al., 1996). Además, la sepsis se asocia con un aumento de los niveles de apoptosis en linfocitos y células dendríticas, lo que contribuye también a la inmunosupresión (Hotchkiss et al., 2006). Sin embargo, no todas las células inmunológicas reciben las mismas señales apoptóticas durante la sepsis. Así, la apoptosis está aumentada en linfocitos y células dendríticas, sin cambios en monocitos, o disminuida en los neutrófilos (Hotchkiss, 2003). Esto determina que junto a la inmunosupresión que pone al paciente en riesgo de infecciones nosocomiales, la menor apoptosis de los neutrófilos también puede aumentar el daño que tiene lugar durante la respuesta inflamatoria.

La supresión del SIRS inicial de la sepsis se considera fundamental para minimizar el daño y maximizar la capacidad de defensa del huésped (Kim et al., 2007). Esto llevó a definir, hace ya algunos años, el concepto de síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria (SRAC) (Bone et al., 1997). Inicialmente su autor consideró que el SRAC podía predominar en un paciente determinado, mientras que en otros lo hacía el SIRS. Posteriormente otros autores postularon que el SRAC sigue al SIRS en un proceso de dos fases diferenciadas. Actualmente se considera que ambos eventos son concomitantes siendo el SRAC una respuesta normal para limitar el proceso inflamatorio sistémico (Cavaillon, 2001; Munford y Pugin, 2001; Kim et al., 2007). Algunos autores proponen que el SRAC no es un fenómeno generalizado que amortigua todas las funciones inmunes, sino una adaptación que varía dependiendo de los compartimentos involucrados (ejemplo: sangre, tejidos), si el tipo de lesión es primaria o secundaria, la naturaleza de la función estudiada, los mediadores producidos, y que se caracteriza por una reprogramación de los leucocitos (Tabla 3) (Adib-Conquy et al., 2009). En consecuencia, la evolución conceptual de la sepsis ha sido dinámica, tal como la apreciación actual de la patogénesis de la misma, constituyendo un

proceso complejo de activación celular y humoral que resulta en la activación de neutrófilos, monocitos, y células endoteliales microvasculares; de mecanismos neuroendocrinos; y del complemento, coagulación, y sistemas fibrinolíticos (Vincent y Abraham, 2006; Cinel y Opal, 2009).

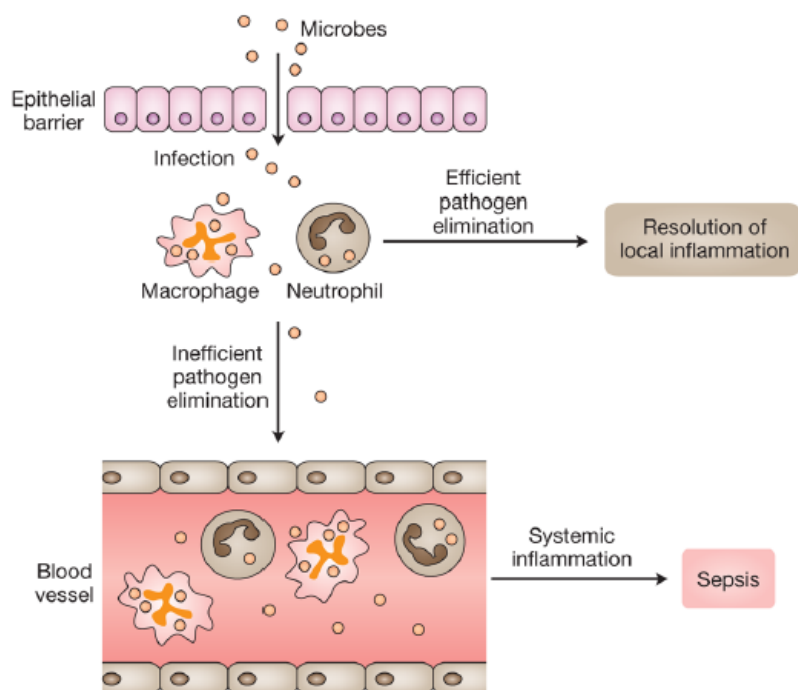
Tabla 3. **Síndrome respuesta anti-inflamatoria compensatoria (SRAC)** (Adib-Conquy et al., 2009).

Leucocitos	Reducido	Aumentado	Sin Cambios
Linfocitos	Proliferación a mitógenos Producción citocinas	Apoptosis	
Monocitos	Expresión superficial de: HLA-DR TNF R p75 CD14 Receptor de transferrina (CD71) Marcador coactivación (CD86) GM-CSF CX3CR Producción de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF en respuesta a LPS	Expresión superficial de: Fc γ R1 (CD64) TNF R p55 CD40; CD48; CD80 Fc γ R1 (CD89) TLR4 TREM-1 Factor tisular Producción de IL-1Ra, MIF en respuesta a LPS	Expresión superficial de: C5a R Respuesta de citocinas a bacterias completas
Neutrófilos	Expresión superficial de: TLR2 Receptores TNF & IL-1 CXCR2 Apoptosis Respuesta a quimiotrayente Fagocitosis Liberación de Cathepsina D Actividad microbicida intracelular Secreción de oxígeno reactivo Producción de IL-1 β , IL-1Ra en respuesta a LPS	Expresión superficial de: Fc γ R1 (CD64) Receptor-fMLP CD66b IL-10R1 Producción PEBF Expresión de fosfolipasa citosólica A2 Liberación Elastase	Expresión superficial de: CD11b, CD11c CXCR1 Producción de IL-1Ra en respuesta a <i>S. aureus</i>

2.3- Iniciación de la respuesta inflamatoria

El sistema inmune innato es un mecanismo de defensa universal del huésped contra patógenos altamente conservado evolutivamente (Creagh et al., 2006), que además se ha desarrollado también para responder frente a traumas y lesiones (Matzinger, 2002). La respuesta inmune innata reconoce la presencia de patógenos invasores, iniciando la contención y reclutamiento de células adicionales para eliminar los patógenos. Al mismo tiempo también incluye mecanismos de retroalimentación que sirven para limitar y restringir el componente proinflamatorio y reestablecer el equilibrio homeostático (Vodovotz et al.,

2006). En mamíferos la inmunidad innata la integran diversos tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, basófilos, mastocitos, eosinófilos, células *natural killer* (NK) y moléculas, o sistemas moleculares, como los péptidos antimicrobianos, las proteínas de fase aguda (colectinas, ficolinas y pentraxinas) y el complemento (Fig. 5).



A microbial infection can trigger a local or systemic inflammatory response

Figura 5. **La infección microbiana puede desencadenar una respuesta inflamatoria local o sistémica.** La ruptura de una barrera epitelial permite la invasión de microorganismos patógenos, que producen una respuesta inmune innata en el sitio de infección. Si los patógenos son eliminados efectivamente por fagocitos, se produce una inflamación local y rápidamente se restablece la homeostasis inmunológica. Si los patógenos invasores no son eliminados totalmente, pueden pasar al torrente sanguíneo y provocar una respuesta inflamatoria sistémica potencialmente dañina (sepsis) (Wang et al., 2008).

Las respuestas de la inmunidad innata frente a patógenos son iniciadas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que identifican estructuras específicas de los microorganismos (Tabla 4). Por lo menos 4 familias de PRRs están descritas: TLRs, receptores del dominio de oligomerización de los nucleótidos (NOD) (NLRs), dominios de reclutamiento y activación de las caspasas (CARDs), receptores de lectinas tipo C y receptores barredores (*scavenger*) expresados en células dendríticas y mieloides (Creagh et al., 2006; Granucci et al., 2005; Nduka, 2009; Cinel, 2007; Opitz, 2009). Las bacterias y los virus tienen estructuras moleculares no compartidas con el huésped, que son comunes entre los patógenos relacionados. Estos patrones moleculares son además expresados por bacterias

no patógenas y comensales (Granucci, 2005) y se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP) (Nduka, 2009; Cinel, 2007).

Tabla 4. **Receptores de reconocimiento de patrones (PRR)** (Pone et al., 2010).

PRR	Ligando(s)	Células inmunes
TLRs	Diferentes MAMPs de superficie e intracelulares	Neutrófilos, monocitos/ Mφ, CDs, células B
NLRs	MDP, toxina del ántrax, RNA, flagelina	Monocitos/ Mφ, DCs
CARD	dsRNA	Neutrófilos, monocitos/ Mφ, CDs, células B
Lectinas tipo C	Ligandos microbianos glicosilados	Monocitos/ Mφ, DCs
Receptores <i>scavenger</i>	Ligandos microbianos conteniendo lípidos	Monocitos/Mφ, DCs

Mφ: Macrófagos, DCs: Células dendríticas

Tras el reconocimiento de las MAMPs por PRRs, las células de la inmunidad innata pueden iniciar una respuesta inflamatoria. Los PAMPs conocidos incluyen el LPS, péptido glicano y regiones de DNA dónde una citosina está junto a guanina (CpG-DNA) microbiana no metilada (Galili et al., 1988; González et al., 1988). Aunque hay una similitud estructural entre varios TLRs, cada TLR puede reconocer un tipo específico de PAMP. Por ejemplo, TLR2 es esencial para el reconocimiento de las lipoproteínas, peptidoglicanos y los ácido lipoteicoico de mayoría de las bacterias Gram positivas (Hemmi et al., 2000). TLR4 reconoce las endotoxinas de bacterias Gram negativas (Poltorak et al., 1998) y TLR9 reconoce el CpG-DNA bacteriano no metilado (Hemmi et al., 2000), ver Tabla 5. En el caso del LPS, además de ser reconocido directamente por TLR4, también activa a TLR2 y TLR4 a través de su unión con CD14, que se expresa en células de la inmunidad innata. Este receptor no se une sólo a la endotoxina, sino que también lo hace a otros elementos bacterianos por lo que se puede considerar un PRR (Antal-Szalmas, 2000).

Las señales inflamatorias son transducidas por series de moléculas adaptadoras (MyD88, TIRAP, TRAM, TRIF) que unidas a los PRRs y a proteínas quinasas o fosfatasa, amplifican la señal en el citoplasma, culminando cada una en la rápida modulación posttranscripcional, o posttranslacional, de una variedad de mediadores inflamatorios o en la activación de varios factores de transcripción. Dentro de estos factores se encuentra el factor nuclear-κB, la proteína activadora 1, miembros de la familia de proteínas de potenciación de la unión a

CCAAT, proteína de respuesta temprana al crecimiento 1 (EGR1), p53, y el transductor de señal y activador de transcripción 1 (Nduka y Parrillo, 2009; Pritts et al., 2002). Tras la transducción de señales se producen y liberan de citocinas (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6), IFN tipo I y quimiocinas (IL-8 y las proteínas inflamatorias del macrófago CCL3 y CCL4) (Akira y Takeda, 2004; Kawai y Akira, 2006). Las quimiocinas son responsables de reclutar más células de la inmunidad innata hacia el sitio de infección o lesión (Baggiolini y Loetscher, 2000), mientras las citocinas pueden activar estas células inmunes para producir más mediadores proinflamatorios (Luster et al., 2005).

Tabla 5. **TLRs y sus ligandos** (Pone et al., 2010).

TLR	Ligando	Microorganismo	Adaptadores TLR	Células inmunes
TLR1	Triacyl lipopeptidos Ej. Pam3CSK4	Bacteria, micobacteria	MyD88, TIRAP	Neutrófilos, monocitos/M ϕ , mDC, células B
TLR2	Diacyl lipopeptidos Ej. Pam2CSK4; ácido lipoteicoico, zimosan	Bacteria, micobacteria, levaduras	MyD88, TIRAP	Neutrófilos, monocitos/M ϕ , mDCs, células B
TLR3	dsRNA	Virus	TRIF	mDCs, M ϕ , células B
TLR4	LPS	Bacterias Gram negativas	MyD88, TIRAP, TRAM, TRIF	Neutrófilos, monocitos/ M ϕ , mDCs, células B
TLR5	Flagelina	Bacteria	MyD88	Monocitos/ M ϕ , mDCs, células B
TLR6	Diacyl lipopeptides	Micoplasma	MyD88, TIRAP	Neutrófilos, monocitos/ M ϕ , mDCs, células B
TLR7	ssRNA	Bacteria y virus	MyD88	Neutrófilos, monocitos/M ϕ , pCDs, células B
TLR8	ssRNA	Bacteria y virus	MyD88	Neutrófilos, monocitos/M ϕ , mastocitos, células B
TLR9	CpG no metilado containing DNA	Bacteria y virus	MyD88	Neutrófilos, monocitos/M ϕ , pCDs, células B
TLR11	Profilina	Toxoplasma	MyD88	Monocitos/M ϕ , células B

M ϕ : macrófagos, mDCs: células dendríticas mieloides, pDCs: células DCs plasmacitoides.

Los agonistas de TLRs, y especialmente la LPS, son potentes inductores de la diferenciación de células B, aunque dependiendo de las circunstancias puede dar a distintos tipos de Ig. Así, la estimulación de linfocitos B de ratón por LPS sólo induce IgG3 (TI), en combinación con IFN- γ induce IgG2a, en combinación con IL-4 induce IgG1 e IgE, y en combinación con TGF- β induce IgG2b e IgA (Stavnezer et al., 2008). Como ya se ha indicado

anteriormente, concentraciones elevadas de LPS se unen a las células B mediante TLR4 activando a las mismas por un mecanismo TI-1 y por tanto incluye virtualmente a todos los linfocitos B. A concentraciones bajas de LPS, además de unirse a TLR4, los carbohidratos del antígeno O también se unen a otros receptores de células B, lo que genera también una diferenciación de estas células TI-2.

2.4- Endotoxina

La envoltura celular de las bacterias comprende la membrana citoplasmática y la pared celular, más una membrana externa en algunos casos. La mayoría de las envolturas celulares bacterianas se dividen en dos categorías (positivas y negativas) por su reacción a la tinción de Gram. La pared celular bacteriana se diferencia del resto de los organismos por la presencia de un peptidoglicano (heteropolímero alternante de poli-N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico) que está situada inmediatamente a continuación de la membrana citoplásmica. La pared celular Gram positiva se caracteriza por la presencia de una capa de peptidoglicano muy gruesa, que es responsable de la retención de los tintes violetas durante la tinción de Gram. Contiene unos polialcoholes denominados ácidos teicoicos, algunos de los cuales se enlazan con lípidos para formar ácidos lipoteicoicos. Puesto que los ácidos lipoteicoicos tienen enlaces covalentes con los lípidos de la membrana citoplásmica, son responsables de enlazar el peptidoglicano a la membrana citoplásmica (Fig. 6). La pared celular Gram negativa, por el contrario, contiene una capa fina de peptidoglicano adyacente a la membrana citoplásmica, que es responsable de la incapacidad de la pared celular para conservar el color violeta en la decoloración con etanol durante la tinción de Gram. Además de la capa de peptidoglicano, la pared celular Gram negativa también contiene una membrana externa adicional compuesta por fosfolípidos y lipopolisacáridos (Fig. 6). Tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas poseen polisacáridos capsulares que proveen de protección adicional a las bacterias y aumentan su virulencia (Fig. 6). Algunos de los polisacáridos capsulares tienen capacidad antigénica, los denominados antígenos K.

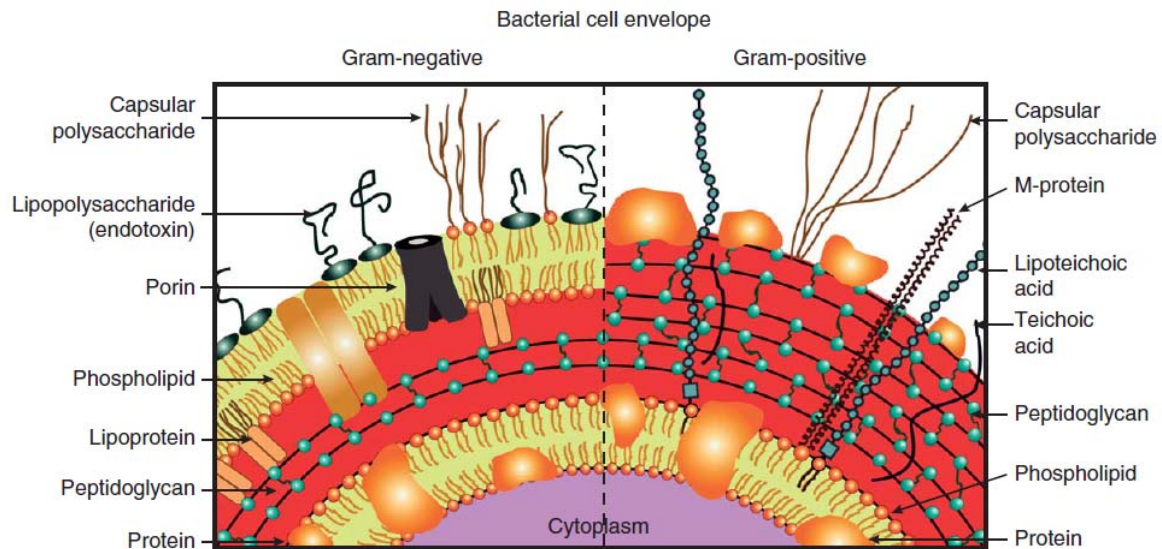


Figura 6. **Representación esquemática de la organización de la membrana en bacterias Gram positivas y Gram negativas.** Sólo las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa lo que determina la existencia de un compartimento adicional, el espacio periplásmico. La membrana externa es el LPS, compuesto de lipopolisacáridos, mientras que la membrana interna está compuesta por fosfolípidos (Holst y Müller-Loennies, 2007).

La endotoxina bacteriana o LPS se encuentra en la pared de las bacterias Gram negativas y, como se ha indicado, es uno de los activadores más potentes de la inmunidad innata. La endotoxina es una molécula compleja que desempeña un papel fundamental en la fisiología bacteriana. Hasta hace unos años se consideraba que era esencial para la viabilidad bacteriana, aunque posteriormente se ha generado en el laboratorio una cepa de *Neisseria meningitidis* que puede sobrevivir y replicarse en ausencia de endotoxina (Pridmore et al., 2001). El LPS está compuesto de tres estructuras interconectadas. La estructura básica consiste en un lípido A, una estructura central de oligosacáridos, y una cadena lateral de polisacáridos repetidos que es la que da la especificidad serotípica y la polaridad a toda la estructura del LPS (Fig. 7).

La estructura del lípido A generalmente consiste de una β 1-6 diglucosamina difosforilada, a la que se unen un número variable (habitualmente 6) de cadenas de ácidos grasos de forma asimétrica (Fig. 7). La estructura del lípido A está muy conservada pero no es idéntica en todas las bacterias Gram negativas, siendo el responsable de las propiedades endotóxicas del LPS. Los oligosacáridos centrales del LPS consisten, en la parte interior de la estructura, en moléculas de heptosa y residuos KDO (ácido 3-deoxi-D-mano octulosónico) unidos con una serie de exosas altamente conservadas (Fig. 7). La parte más externa de los oligosacáridos de la región central contiene una secuencia corta de moléculas de exosas más variables que las de la zona interna (Fig. 7). Esta heterogenicidad da lugar a una serie limitada

de quimotipos, que en el caso de la *E. Coli* son 5. La parte externa del LPS está cubierta por secuencias repetidas de polisacáridos que constituyen la cadena O de las bacterias Gram negativas que es además la región inmunodominante del LPS (Fig. 7).

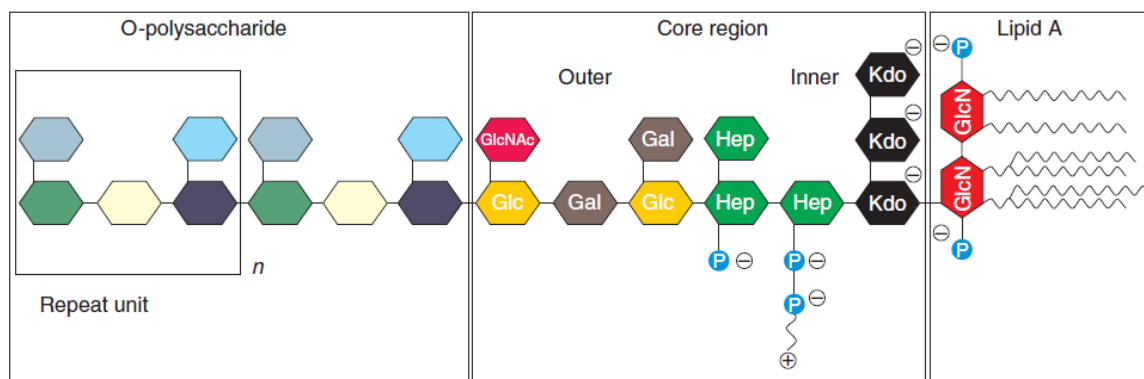


Figura 7. **Representación esquemática de LPS.** El LPS consiste en el lípido A, una región central interna y externa, y el polisacárido O, que habitualmente son unidades repetidas (Holst y Müller-Loennies, 2007).

Uno de los antígenos O mejor caracterizado es el de la *Klebsiella* (Fig. 8). Varios antígenos O se basan en galactanos, que son polimerizaciones de galactosa como el α Gal. Como se ha indicado previamente, la unión de los anticuerpos naturales anti- α Gal a polisacáridos capsulares o del LPS puede dar lugar a dos respuestas totalmente diferentes. Mientras la unión a los capsulares se asociaba con una lisis bacteriana por activación del complemento, la reacción con los del LPS inhibe esta reacción.

La presencia de concentraciones patológicas de endotoxina en pacientes con sepsis grave y shock séptico se ha documentado en diversos estudios clínicos, asociándose las concentraciones más altas con una mayor mortalidad (Danner et al., 1991; Opal et al., 1999). Estas concentraciones elevadas de LPS son aparentemente independientes del microorganismo causante de la sepsis, lo que sugiere que la mayoría procede de las enterobacterias Gram negativas de la flora intestinal. El papel capital que tiene la endotoxina en la sepsis la ha convertido en una de las dianas principales contra la que se han dirigido distintas alternativas terapéuticas. Estas incluyen anticuerpos monoclonales anti-LPS, la adsorción de la endotoxina por técnicas extracorpóreas, o la inhibición de la interacción del LPS con el CD14 o TLR4. Desafortunadamente ninguna de ellas ha podido demostrar eficacia para disminuir la mortalidad asociada con la sepsis grave o el shock séptico (Opal and Glück, 2003; Davies and Cohen, 2011).

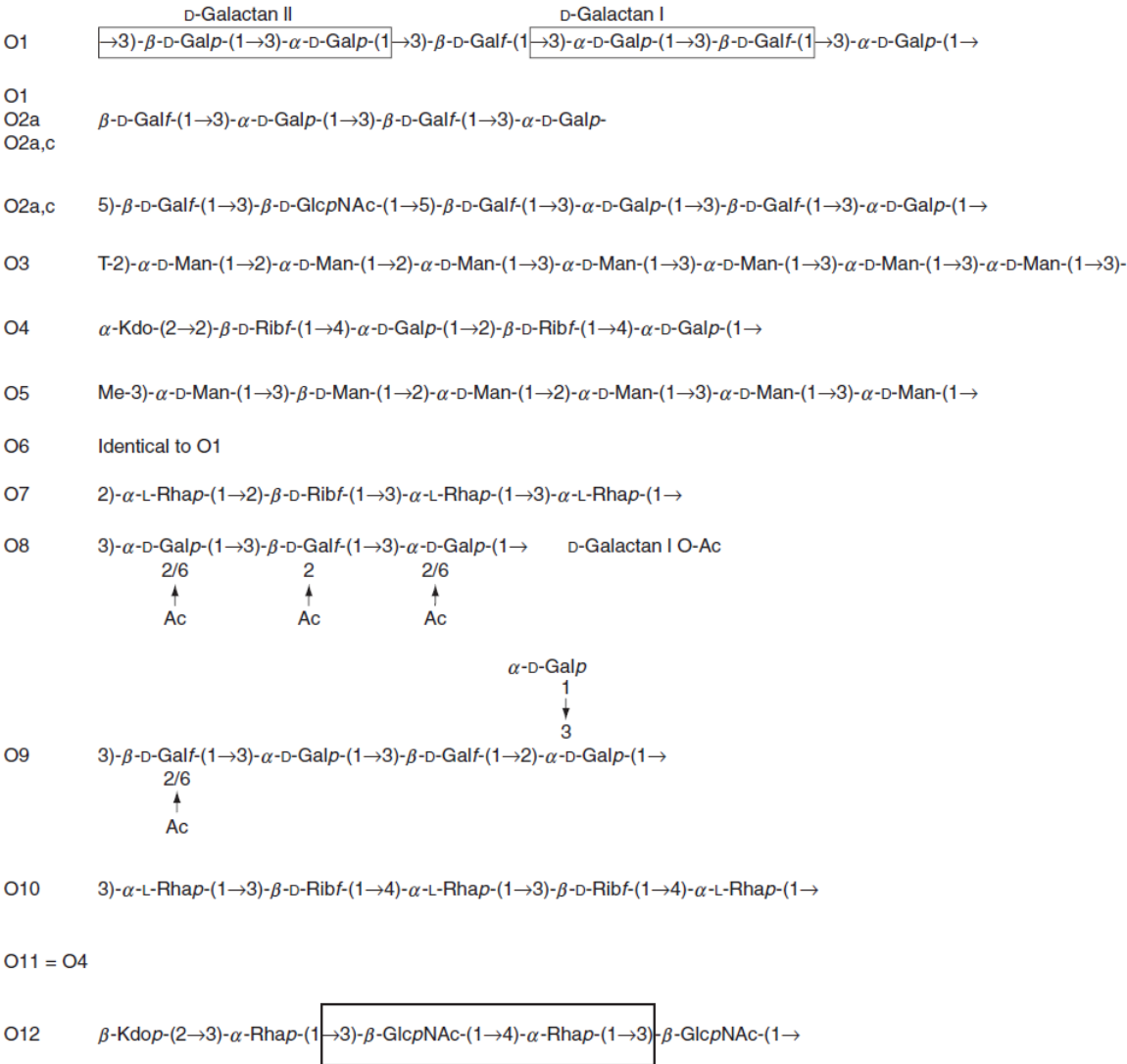


Figura 8. **Antígeno O en 9 serotipos distintos de *Klebsiella*.**

2.5- Tolerancia a la endotoxina

La tolerancia a la endotoxina fue inicialmente descrita en los años 1960-1970 en humanos y animales experimentales, al observar que la exposición a dosis bajas de LPS se asociaba con una marcada disminución de la mortalidad cuando eran inyectados posteriormente con una dosis letal de endotoxina (Brooke, 1965; Greisman et al., 1969). Posteriormente, se evidenció *in vivo*, en modelos experimentales animales, e *in vitro*, con células de ratón y humanas, que los principales responsables de esta respuesta eran los monocitos/macrófagos (Cavaillon y Adib-Conquy, 2006). Los tolerantes a la endotoxina se caracterizaban, al ser nuevamente expuestos a dosis letales de la misma, por una disminución de la producción de citocinas inflamatorias y quimiocinas como TNF- α , IL-6, IL-2, IL-1 β ,

CCL3, CCL4 y CXCL10 (Fig. 9) (Foster et al., 2007; Mages et al., 2007; del Fresno et al., 2009; Draisma et al., 2009). Además, se producía un aumento de la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, TGF- β , e IL-1RA, de receptores de lectinas tipo C y *scavenger* (MARCO, CLEC4a, CD64) y otros reguladores negativos de la señal de los receptores Toll como el IRAK-M (Fig. 9) (Foster et al., 2007; Mages et al., 2007; del Fresno et al., 2009; Draisma et al., 2009). Sin embargo, no todos los estudios mostraron este doble patrón de disminución de mediadores inflamatorios y aumento de los antiinflamatorios, ya que en algunos se observó una disminución de ambos (Draisma et al., 2009). Esto indica que la tolerancia a la endotoxina más que un aumento de la actividad de algunos genes, y la disminución de otros, produce una reprogramación global de los mismos. La Tabla 6 recoge las características de la tolerancia a la endotoxina descritos en distintos estudios.

Además de a monocitos/macrófagos, la tolerancia a la endotoxina también afecta a otras células mieloides, como las células dendríticas y neutrófilos. Las células dendríticas tolerantes a la endotoxina muestran una disminución de la expresión de IL-6, IL-12 y TNF- α , y un aumento de la expresión de IL-10 (Albrecht et al., 2008). Los neutrófilos tolerantes a la endotoxina demuestran una pérdida de expresión de TLR4, aunque mantienen la expresión de citocinas inflamatorias (O'Connell et al., 2007). Células que no intervienen en la respuesta inmune, como las endoteliales o las del intestino también muestran cambios durante la tolerancia a la endotoxina, como una disminución de la activación y adhesión a los leucocitos (Ogawa et al., 2003).

Funcionalmente, los monocitos tolerantes a la endotoxina muestran un aumento de la capacidad fagocítica, junto con un mantenimiento de la facultad de eliminar a patógenos internalizados, y una disminución de la capacidad para presentar antígenos (Fig. 8) (Monneret et al., 2004; del Fresno et al., 2009). En estos estudios, el aumento de la fagocitosis se asoció con un incremento de la expresión del receptor de superficie CD64, mientras que la alteración para presentar antígenos se consideró consecuencia de una expresión reducida de antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad como los HLA-DRs, y de reguladores de los mismos.

Si consideramos globalmente los cambios que tienen lugar durante la tolerancia a la endotoxina, disminución de la respuesta inflamatoria y aumento de la antiinflamatoria, aumento de la fagocitosis y disminución de la presentación de antígenos que puede afectar a la inmunidad adaptativa, estos incluyen aspectos que pueden ser tanto beneficiosos como deletéreos para el huésped. Diversos estudios experimentales sugieren que la tolerancia a la

endotoxina puede ser favorable para el huésped. Así, estudios *in vitro* muestran que macrófagos pre-tratados con LPS incrementan la producción de anión superóxido y la fagocitosis de *Candida albicans* (León et al., 1992). *In vivo* se ha demostrado que a pesar de una respuesta disminuida de citocinas, la tolerancia adquirida a LPS se asocia con una resistencia aumentada a infecciones por bacterias Gram negativas gracias a la mejora de la fagocitosis del sistema inmune innato (Lehner et al., 2001). El pretratamiento con LPS también aumenta la supervivencia de ratones con una infección diseminada de *Cryptococcus neoformans* (Rayhane et al., 2000), que se asoció con una reducción de la carga fúngica en los tejidos. Sin embargo, los cambios observados con la tolerancia a la endotoxina también son similares a los descritos en pacientes con sepsis grave y shock séptico, y que se han asociado con un peor pronóstico de estas patologías. Además, el tipo de respuesta observada en los macrófagos tolerantes a endotoxina no es exclusiva de la sepsis, ya que también se ha observado en otras patologías como la isquemia hepática o renal, los síndromes coronarios agudos, la fibrosis quística e incluso en el cáncer (Biswas et al., 2006; del Fresno et al., 2007; del Fresno et al., 2008; del Fresno et al., 2009).

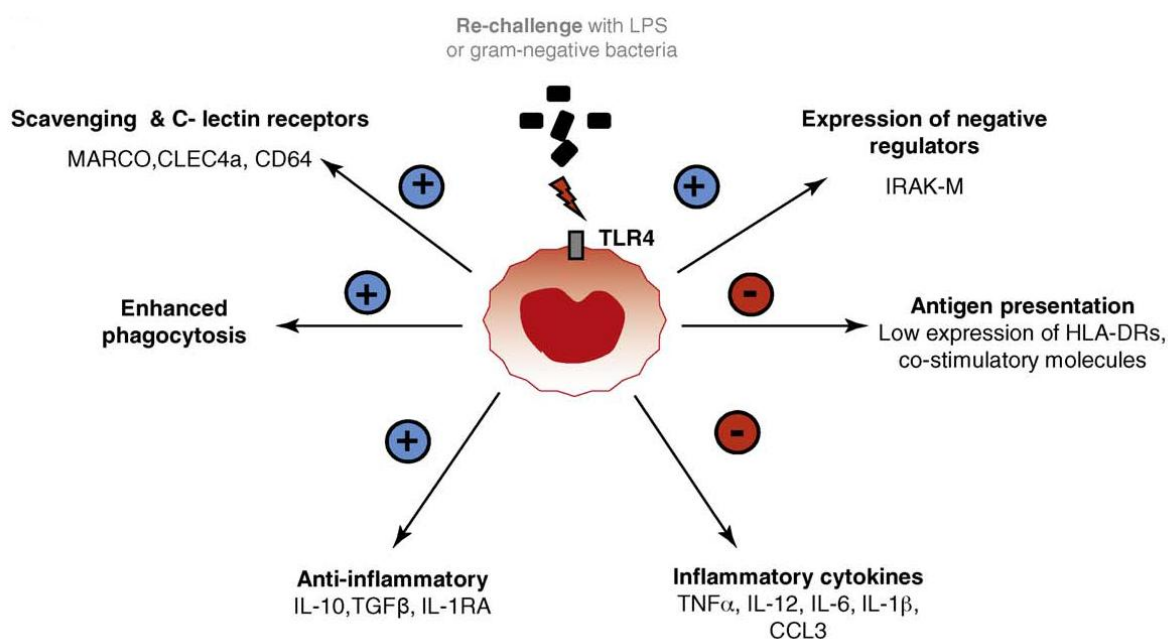


Figura 9. Características de la respuesta de los monocitos/macrófagos tolerantes a endotoxina

Tabla 7. Características de macrófagos y monocitos tolerantes a endotoxina (Biswas y Lopez-Collazo, 2009).

Célula / Tejido	Estímulo / Condición	Fenotipo	Referencias
Macrófago de ratón	Tolerización <i>in vitro</i> con LPS; Reestimulado con LPS	↓ TNF α , IL-1 β , GM-CSF, COX2, IFN β ^a ↓ CCL2, CCL4, CXCL10	Medvedev et al., 2000; Sato et al., 2002
Macrófago de ratón	Homotolerancia <i>in vitro</i> ^b Heterotolerancia <i>in vitro</i> ^b (i) LP sintético seguido por LPS (ii) LP sintético seguido por LPS (iii) LP sintético seguido por LPS	↓ TNF α , IFN β (i) ↑ TNF α , IFN β ^a (ii) ↓ TNF α , IL-1 β , COX2, ↑ CXCL10 (iii) ↑ TNF α	Dobrovolskaia et al., 2003; Sato et al., 2002
Macrófago de ratón	Tolerización <i>in vitro</i> con LPS Reestimulado con LPS	↓ Citocinas inflamatorias / quemoquinas ↑ CCL5, CXCL9, IL-1 β , IL-12a ↑ genes antimicrobianos	Foster et al., 2007; Mages et al., 2007
Fibroblasto embrionario de ratón (MEF)	Tolerización <i>in vitro</i> con lípido A Reestimulado con lípido A	↓ TNF α , CCL3 ↑ IFN β , IL-10	Biswas et al., 2007
Monocitos humanos	Tolerización <i>in vitro</i> con LPS. Reestimulado con LPS	↓ TNF α , IL-1 β , IL-6, CCL3, CXCL10 ↑ IL-10 ↓ Mayoría de los genes inflamatorios ↑ IL-10, TGF β 1, IL-1RA Fagocitosis aumentada Deterioro de la presentación de antígenos ↓ HLA DR, CIITA	Cavaillon y Adib- Conquy 2006; del Fresno et al., 2009; Escoll et al., 2003; del Fresno et al., 2009
Monocitos humanos	Inyección <i>in vivo</i> de LPS a donantes sanos de manera continua durante 5 días. Seguido por estimulación <i>ex vivo</i> con LPS	Día 5: ↓ TNF α , IL-6, IL-1RA, IL-10 (con respecto a los niveles del día 1) TGF β no se modificó	Draisma et al., 2009
Monocitos humanos	Pacientes con sepsis de UCI (Tratados <i>ex vivo</i> con LPS) Pacientes con shock no infeccioso (Tratados <i>ex vivo</i> con LPS)	↓ TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2, TNF β ↑ IL-10, IL-1RA ↓ TNF α , IL-1 β , IL-6	Munoz et al., 1991; Munoz et al., 1991; Escoll et al., 2003
Monocitos humanos	Pacientes con shock séptico	↑ IL-10, ↓ HLA-DR	Monneret et al., 2004
Monocitos humanos	Pacientes con gastrectomía parcial Tratamiento preoperatorio con LPS	↓ TNF α , ↑ IL-10 ↓ HLA-DR	Kawasaki et al., 2001
Sangre total	Infección Meningocócica Tratamiento <i>ex vivo</i> de sangre de pacientes a la admisión y tras recuperación	En admisión: ↓ TNF α , IL-1, IL-6 ↑ IL-1RA	Cavaillon y Adib- Conquy, 2006
Sangre total	Pacientes con sepsis Tratados <i>ex vivo</i> con <i>Escherichia coli</i>	↓ TNF α , IL6, IL-10	Cavaillon y Adib- Conquy, 2006

^a ↓ = disminución o ↑ = aumento con respecto al equivalente no tolerizado (para estudios de tolerización *in vitro*) o donantes sanos (para estudios de muestras de sepsis), según sea el caso. LP: Lipoproteína.

^b La tolerancia a una endotoxina particular inducida por la exposición previa a la misma endotoxina se conoce como homotolerancia. Por el contrario, la tolerancia a una endotoxina inducida por la

exposición previa a una endotoxina diferente se conoce como heterotolerancia (Dobrovolskaia et al., 2003).

Las diferentes respuestas de tolerancia a la endotoxina referidas hasta el momento han sido examinadas con respecto a la reacción mediada por LPS-TLR4 o sepsis Gram negativa. Sin embargo, la tolerancia a endotoxina se encuentra también en la exposición previa a otros ligandos TLR y en sepsis por bacterias Gram positivas. La tolerancia a una endotoxina inducida tras la exposición previa a una endotoxina diferente se denomina heterotolerancia o tolerancia cruzada (Dobrovolskaia et al., 2003). Por ejemplo, la exposición previa a ligandos de TLR2, tales como el ácido lipoteicoico, o distintas lipoproteínas sintéticas generan macrófagos tolerantes a LPS (Dobrovolskaia et al., 2003; Sato et al., 2000), por una señalización defectuosa de TLR similar a la que se ha descrito anteriormente para la tolerancia a la endotoxina de bacterias Gram negativas.

A diferencia de la tolerancia a endotoxina mediada por bacterias Gram negativas, la producida por bacterias Gram positivas no se asocia con una disminución de la expresión de TLR sino con una modulación de la actividad del NF- κ B (Buckley et al., 2006). El resultado funcional es similar al observado en la tolerancia a endotoxina inducida por bacterias Gram negativas como lo demuestra la disminución de la producción de TNF- α tras una infección por *Staphylococcus aureus* observada en estudios de pacientes con sepsis por este microorganismo (Adib-Conquy y Cavaillon, 2009). Sin embargo, los mecanismos de tolerancia a endotoxina inducida por bacterias Gram positivas, así como por causas no infecciosas, todavía están por dilucidar en gran medida. La participación de los ligandos endógenos o los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) no se pueden descartar. Moléculas como el ácido hialurónico, proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1 (HMGB1) y la fibronectina son conocidas por activar las señales mediadas por TLR y por inducir características típicas de tolerancia a la endotoxina (disminución de TNF α y aumento de IL-10) bajo ciertas condiciones (Kuang et al., 2007; Liu et al., 2008; Adair-Kirk y Senior, 2008; Kwon et al., 2004). Por último, la presencia crónica de citocinas inflamatorias, como TNF- α e IL-1 β , también podrían contribuir a la inducción de tolerancia a la endotoxina (Dobrovolskaia et al., 2003), mediante una señalización defectuosa de TLR, u otros mecanismos como modulación epigenética y regulación por micro (mi) RNA.

La tolerancia a la endotoxina tiene una importante relevancia clínica ya que se asocia con un pronóstico negativo en las situaciones de sepsis. Sin embargo, la tolerancia a la endotoxina también puede inducir una tolerancia cruzada contra otras formas de daño no infeccioso, produciendo un beneficio al huésped. Así, diversos modelos experimentales han demostrado

que el tratamiento previo con LPS protege contra el daño producido por los cambios de temperatura, shock hemorrágico, y daño de isquemia reperusión hepático, pulmonar, pancreático, cerebral y renal (Draisma et al., 2009). En el caso concreto del corazón, el pretratamiento con LPS se asocia con una disminución del 40% del tamaño del infarto tras una oclusión coronaria, mientras que a nivel renal se asocia con una función renal completamente normal tras una lesión de isquemia-reperusión. En consecuencia, en intervenciones clínicas con un riesgo elevado de daño isquémico, como puede ser el alotrasplante de órganos o en cirugía vascular o cardíaca, la inducción de una tolerancia a la endotoxina podría ser beneficiosa para el paciente. La tolerancia a la endotoxina podría ser inducida por LPS, pero también por antígenos xenogénicos que, como se ha indicado, son similares a la endotoxina.

2.6.- Modelos experimentales de sepsis

El tratamiento clínico actual de la sepsis y el shock séptico es básicamente de soporte, y se fundamenta en la administración de antibióticos de amplio espectro, la resucitación hemodinámica y un soporte adecuado de la función de los distintos órganos. Estos tratamientos han permanecido idénticos desde hace muchos años, con la única salvedad de la introducción de distintos antibióticos cuando han estado disponibles o nuevas tecnologías para dar el soporte a los distintos órganos. La razón es que a pesar de que se han desarrollado numerosos tratamientos específicos para la sepsis y el shock séptico, ninguno ha sido clínicamente eficaz. El único que consiguió la aprobación de las autoridades reguladoras europeas y de EEUU, fue el drotrecogin alfa o proteína C natural recombinante, que actúa sobre la trombosis existente en la sepsis grave, y también como antiinflamatorio. Ensayos clínicos iniciales sugerían una mejora de la supervivencia de los pacientes con este tratamiento (Bernard et al., 2001). Sin embargo, ha sido recientemente retirado del mercado, ya que nuevos ensayos clínicos no han podido reproducir la eficacia inicialmente observada.

Los distintos tratamientos específicos de la sepsis que han alcanzado la investigación clínica demostraron previamente eficacia en modelos experimentales animales. Si bien, como se ha indicado, ninguno ha sido finalmente efectivo. Este hecho sugiere que los modelos experimentales no pueden reproducir la complejidad de la sepsis en humanos y que, a pesar del conocimiento generado en los últimos años, todavía quedan importantes aspectos por dilucidar. De todas formas, los modelos experimentales animales continúan siendo esenciales para el conocimiento de los mecanismos que participan en la sepsis y el desarrollo de nuevas

estrategias terapéuticas para la misma. Existen tres modelos experimentales animales para investigar la sepsis: a) la administración de toxinas exógenas como el zimosan o el LPS; b) la administración de patógenos viables, como bacterias y virus; y c) la alteración de las barreras endógenas protectoras del animal, como ocurre en la ligadura y punción de ciego (CLP) o en la peritonitis por stent en el colon ascendente (CASP). La Tabla 8 resume las ventajas y desventajas de los modelos más habituales de sepsis.

El modelo de CLP es uno de los más empleados en las investigaciones de sepsis (Hubbard et al., 2005). Comparado con otros modelos, es el que posiblemente refleja mejor la complejidad de la sepsis en humanos. La CLP combina tres insultos: el trauma tisular por la laparotomía, la necrosis causada por la ligadura del ciego, y la infección por la fuga de la flora microbiana al peritoneo. Esto último da lugar a una peritonitis seguida por la translocación de las bacterias entéricas a la sangre, lo que activa los mecanismos inflamatorios y antiinflamatorios y eventualmente conduce al shock séptico. Una de las ventajas de la CLP es que los patógenos son originarios del huésped, lo que imita una de las causas más frecuentes de sepsis en humanos, la sepsis por enterobacterias. La CLP es un procedimiento relativamente fácil que permite ajustar la gravedad de la sepsis en función de la longitud de ciego que se liga y el tamaño de la aguja que utiliza en la punción (Fig. 10).

El otro modelo de interrupción de barrera, el CASP, también causa una peritonitis y sepsis polimicrobiana. En este caso un stent de un diámetro definido se coloca quirúrgicamente en el colon ascendente, lo que determina el flujo de bacterias a la cavidad abdominal. Al igual que ocurre con la CLP, la severidad de la sepsis depende de distintos parámetros como el diámetro del stent (Maier et al., 2004). Sin embargo, comparado con la CLP, la CASP es un modelo relativamente nuevo, más difícil que la CLP, lo que dificulta su reproductividad. Además, se considera que la respuesta inmunitaria que produce es más similar a la que tiene lugar durante la endotoxemia y que no se corresponde tanto con lo que ocurre con la mayoría de sepsis clínicas (Maier et al., 2004).

Tabla 8. **Ventajas y desventajas de los modelos experimentales más comunmente usados para sepsis.**

Modelo de sepsis	Ventajas	Desventajas
Modelo de endotoxemia: Administración sistémica de LPS	Simple y reproducible La respuesta inducida es aguda Modelo muy controlado y estandarizado	La señalización mediada por LPS es estrictamente dependiente de TLR4. No refleja todas las complejas respuestas fisiológicas humanas. Gran aumento, rápido y transiente de citocinas, que difiere de la sepsis humana Los roedores son resistentes a la endotoxina, mientras que los humanos son muy sensibles Respuesta hemodinámica diferente en comparación con la sepsis humana Variabilidad en la dosis, toxina, y ruta de administración
Modelo de inóculo Bacteriano	Presencia de una bacteria permite mecanismos de respuestas del hospedero frente a patógenos	Crecimiento y cuantificación de bacterias es necesaria antes de su administración El modelo simple de bacterias no refleja la diversidad y combinaciones de agentes infecciosos presentes en la sepsis humana Los humanos no son con una masiva carga bacteriana , pero tienen un foco séptico que intermitentemente y persistente el cuerpo con bacterias Altas dosis de bacterias induce un estado endotóxico de un shock séptico, debido a la presencia de LPS después de la lisis rápida de la bacteria. Variabilidad en la carga bacteriana, ruta de administración y cepa bacteriana
Modelo de CLP	Procedimiento simple Presencia de un foco infeccioso Modelo de sepsis polimicrobiano Usando el espectro completo de bacterias entéricas del hospederos Progresión de la sepsis en humanos con fases hemodinámicas y metabólicas similares y la presencia de ambas fases hiper e hipoinflamatorias Prolongado y menor liberación de citocinas, como en humanos	Formación de abscesos Variability en severidad debido a diferencias en procedimientos experimentales

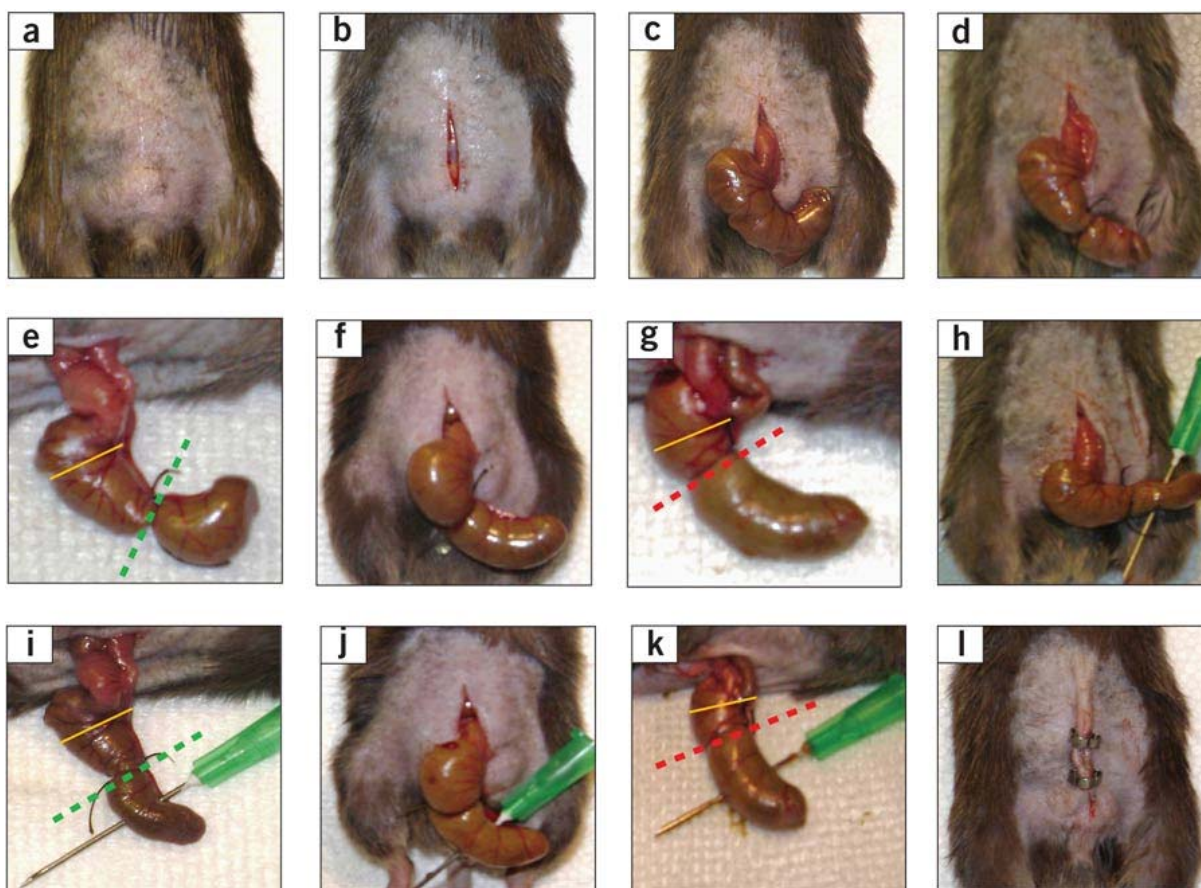


Figura 10. **Técnica de CLP.** a) Desinfección de la pared abdominal tras rasurado. b) Incisión mediana de la piel. c) Exposición del ciego. d,e) Ligadura de ciego para sepsis moderada con mortalidad de ~ 60%. El ciego se liga (línea verde discontinua) a la mitad de distancia entre la parte más distal y la base del ciego (línea amarilla; ~ 1 cm). f,g) Para producir una sepsis grave (90-100% mortalidad), se liga el 75% de ciego (línea roja discontinua). h,i) Punción cecal desde la dirección mesentérica a la antimesentérica en la sepsis moderada. j,k) Punción cecal en la sepsis grave. l) Cierre de la piel tras aplicar sutura a la musculatura abdominal (Rittirsch et al., 2008).

3.- Modulación de la respuesta inmunitaria con fines terapéuticos

3.1.- Aplicaciones de la inmunidad innata en el tratamiento del cáncer

En la medicina actual existen evidencias de que las modificaciones inespecíficas de la respuesta inmunitaria pueden tener aplicaciones terapéuticas como es el caso del tratamiento con Bacilo de Calmette-Gérin (BCG) para algunos tipos de cáncer de vejiga urinaria (Witjes, 2004). En otros casos los efectos heterólogos (no específicos) de la vacunación por BCG, difteria, tétanos y tosferina son menos claros, pero diversos estudios epidemiológicos sugieren la existencia de beneficios, más allá de los aportados contra los microorganismos específicos, a través de la estimulación inespecífica del sistema inmunitario (Vaugelade et al., 2004; Shann, 2004). Por otro lado, una gran parte de tumores experimentales y humanos expresan

altos niveles y/o formas anormales de glucoproteínas o glucolípidos de superficie entre los que se incluyen gangliósidos, antígenos de grupos sanguíneos y mucinas. Las formas anormales son el resultado de las alteraciones que se producen por la adición secuencial de porciones de carbohidratos a moléculas de proteínas o lípidos. Algunos aspectos del fenotipo maligno de los tumores, entre los que se incluyen la invasión tisular y el comportamiento metastático, pueden deberse en parte a la alteración de las propiedades de la superficie celular que son una consecuencia de la síntesis anormal de glicolípidos y glucoproteínas. Aunque la mayoría de los epítomos reconocidos por estos anticuerpos no son expresados específicamente en los tumores, existe una abundancia relativa en las células cancerosas comparadas con las células normales de las que derivan (Vlad y Finn, 2004; Schietinger et al., 2008).

Los antígenos asociados a tumores constituyen una de las dianas preferidas en las estrategias de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer. Así, los gangliósidos, que son glucoesfingolípidos que contienen ácido neuroamínico, se expresan con niveles elevados en melanomas y en algunos tumores cerebrales. Concretamente, los gangliósidos GM2 y GD están presentes en una elevada densidad en la superficie de los melanomas, no siendo los sujetos normales y los enfermos con melanomas tolerantes a estas moléculas, ya que producen anticuerpos anti-gangliósidos que no son eficaces para evitar el crecimiento tumoral. Sin embargo, la inmunización con GM2 más adyuvante induce niveles elevados de IgM en pacientes con melanoma, y esto se ha correlacionado con una remisión clínica de los tumores (Bay et al., 2009).

Otro ejemplo de antígenos asociados a tumores son las mucinas, proteoglicanos de alto peso molecular que contienen numerosas cadenas laterales de carbohidratos de unión O en un núcleo polipéptido. Debido a su complicada estructura ramificada, es posible una gran variabilidad antigénica. La expresión desregulada en los tumores de las numerosas enzimas que sintetizan estas cadenas laterales de carbohidratos puede dar lugar a la aparición de epítomos relativamente específicos de tumor, bien en las propias cadenas laterales de carbohidratos o en el núcleo polipeptídico anormalmente expuesto. Diversas mucinas han sido el foco de estudios diagnósticos y terapéuticos, incluyendo CA-125 y CA-19-9, expresadas en carcinomas de ovarios, y MUC-1, expresada en carcinomas de mama. A diferencia de muchas mucinas, MUC-1 es una proteína integral de membrana que se expresa normalmente solo en la superficie apical del epitelio ductal de la mama, un lugar que está relativamente secuestrado del sistema inmunitario. En los carcinomas ductales de la mama, sin embargo, esta molécula

se expresa en una forma no polarizada y contiene un carbohidrato nuevo altamente específico de tumor y epítomos peptídicos detectables con anticuerpos monoclonales de ratón. Los epítomos peptídicos inducen respuestas de anticuerpos y células T en pacientes con cáncer y, por ello, están siendo considerados como candidatos para vacunas antitumorales.

Lo antígenos de grupos sanguíneos, que como se ha indicado previamente, son epítomos de carbohidratos en moléculas de glucoesfingolípidos o glicoproteínas expresadas en la superficie de las células sanguíneas y las células epiteliales, también se expresan aberrantemente en los carcinomas, especialmente los antígenos T y TN sialilados. Las formas solubles de estos antígenos están empleándose en vacunas experimentales contra el cáncer. Otro antígeno del que también se ha intentado obtener beneficios en la inmunoterapia contra el cáncer es el α Gal. En este caso, dada la existencia de anticuerpos naturales contra el antígeno, la estrategia se fundamenta en el procesamiento de células tumorales autólogas para expresar α Gal. La transducción del gen de la α 1,3-galactosiltransferasa a tumores mediante adenovirus, u otros vectores, se asocia con la expresión de α Gal en las células tumorales. Modelos experimentales *in vitro* con células de melanoma humano e *in vivo* en ratón α Gal KO, han demostrado que las células tumorales son lisadas por una citotoxicidad mediada por complemento, evitando el crecimiento, e incluso la reducción, tumoral en los modelos *in vivo* (Galili, 2011). También, la inmunización con células autólogas tumorales que expresan α Gal se asocia con una opsonización de estas células por anticuerpos anti- α Gal IgG, la interacción de los receptores Fc de estas IgG con receptores Fc γ de las células presentadoras de antígenos (APC), el transporte de las membranas tumorales a los ganglios linfáticos regionales y el procesamiento y presentación de los antígenos asociados a tumores. Esto determina la activación de células T específicas contra el tumor, que en modelos experimentales animales se ha asociado con la falta de crecimiento del tumor o la regresión del mismo. Recientemente, una fase I con esta estrategia se ha concluido en humanos sin signos de toxicidad, lo que ha llevado a la realización de una fase II (Galili, 2011).

3.2- Tratamiento anti-angiogénico

El límite de difusión de oxígeno en los tejidos se halla entre 100 y 200 μ m (Folkman, 1971). Más allá de esta distancia las células necesitan crear nuevos vasos (angiogénesis) para la obtención de oxígeno y nutrientes para su supervivencia (Carmeliet y Jain, 2000). La formación de nuevos vasos puede producirse mediante diferentes procesos. En el

desarrollo temprano del embrión el proceso de formación de vasos es denominado vasculogénesis (Yancopoulos et al., 2000). En la vasculogénesis las células precursoras indiferenciadas o angioblastos sufren un proceso de proliferación y diferenciación in situ que acabará formando vasos como la aorta y venas de gran calibre. A continuación mediante la angiogénesis, o la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, esta red primaria es modificada para formar una red de vasos interconectados característicos de la vasculatura madura.

La angiogénesis fisiológica es limitada, está estrictamente regulada y es fundamental durante la reproducción y el desarrollo embrionario. En la vida postnatal y adulta, la angiogénesis es el único proceso por el cual se pueden formar nuevos vasos, siendo esencial en la reparación de heridas y en el ciclo reproductivo femenino (Kerbel, 2000). Pero la desregulación de este proceso da lugar a la angiogénesis patológica, que suele ser persistente y comporta el crecimiento y progresión de neoplasias, procesos inflamatorios crónicos, como la enfermedad de Crohn, la destrucción de cartílago en la artritis reumatoide o la ceguera en la diabetes, entre muchos otros procesos patológicos.

La angiogenesis tiene lugar en 4 fases:

- a) Fase inicial: se caracteriza por un incremento de la permeabilidad a proteínas y vasodilatación.
- b) Fase de progresión: donde se produce la degradación y remodelación de la matriz extracelular por parte de proteasas liberadas desde las células endoteliales, la migración y proliferación de las células endoteliales y la interacción de la matriz.
- c) Fase de diferenciación: incluye cambios en la morfología de las células endoteliales para alcanzar una estructura tubular o luminal.
- d) Fase de estabilización y maduración: caracterizada por el reclutamiento de pericitos y células musculares lisas y el depósito de nuevas proteínas de la matriz.

En todo este proceso se mantiene un estricto equilibrio entre los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis. La ruptura de este equilibrio dará lugar a la presencia de la neovascularización que caracteriza la angiogénesis patológica.

La angiogénesis tumoral es reconocida como un proceso fundamental y crítico para el crecimiento de tumores sólidos y el desarrollo de metástasis. Gimbrone y colaboradores en 1972 demostraron que el proceso de angiogénesis era necesario para el crecimiento de

fragmentos de tumor o de grupos de células tumorales implantadas en un tejido avascular como la córnea. Dichos implantes eran neovascularizados desde el limbo esclerocorneal, y su inhibición era capaz de detener el crecimiento tumoral (Gimbrone et al., 1972). Posteriormente se observó que todo tumor que excede de 2-3 mm de grosor necesita la creación de nuevos vasos para su nutrición (Folkman y Klagsbrun, 1987). El proceso de angiogénesis se produce en la periferia de la lesión tumoral y está constituida por células normales derivadas del huésped (Weidner, 1993). Esta zona de vasos neoformados es infiltrada posteriormente por las células tumorales.

La angiogénesis no inicia la neoplasia, pero promueve la progresión tumoral y la metastasis. En 1971 Judah Folkman propuso la inhibición de la angiogénesis como diana para el tratamiento del cáncer, y desde entonces se han ideado y desarrollado diferentes fármacos que tienen como principal diana las células endoteliales. Pero ha sido sobre todo durante la última década cuando se han realizado importantes esfuerzos en desarrollar estrategias terapéuticas para inhibir la angiogénesis en el cáncer. A diferencia de las células tumorales, las células endoteliales son genéticamente estables y por esa razón fueron consideradas una diana terapéutica ideal que no presentaría resistencia a la terapia antiangiogénica.

Los medicamentos antiangiogénicos se pueden clasificar según su mecanismo de acción en dos grupos: anticuerpos monoclonales o inhibidores selectivos de la actividad tirosina quinasa (*small-molecules tyrosine-kinase inhibitors*) (Fig. 11). Los anticuerpos monoclonales tienen una acción directa y una indirecta. La acción directa consiste en bloquear el ligando o el receptor, el cual se puede internalizar dejando así de ejercer su función. La acción indirecta se encuentra mediada por el sistema inmune (activación del sistema del complemento, linfocitos citotóxicos y macrófagos) y contribuye a la destrucción de la célula tumoral.

En este grupo se encuentra el primer fármaco que se demostró un claro efecto clínico aumentando la supervivencia en cáncer colorrectal metastático: el bevacizumab (Hurwitz et al., 2004). Se trata de un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que se une al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), evitando la interacción con sus receptores y, por lo tanto, la activación de las vías de señalización que éstos regulan. Bevacizumab fue aprobado por la FDA (Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos) en 2004 para el tratamiento del cáncer colorrectal, y en 2006 para el tratamiento del cáncer de pulmón. En la actualidad varios ensayos clínicos en fase II y III se están llevando a cabo con este anticuerpo en otros tipos de tumores.

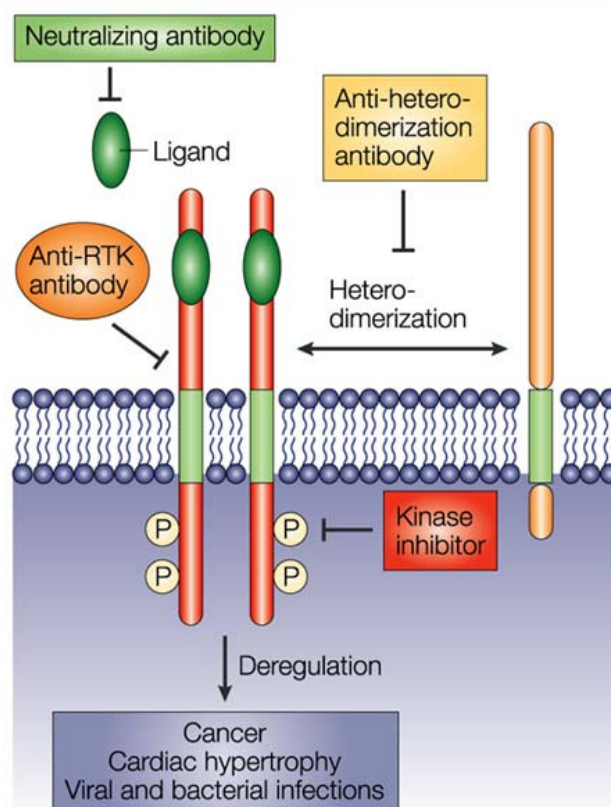


Figura 11. **Mecanismos de acción de los fármacos antiangiogénicos** (Gschwind et al., 2004).

Los inhibidores selectivos de la actividad quinasa compiten con el ATP por la unión al dominio catalítico de la proteína, bloqueando así su actividad quinasa. A finales de la década de los 80 este tipo de fármacos demostraron su uso potencial como agentes antiproliferativos, y desde entonces se ha desarrollado un importante número de inhibidores que actúan en diferentes vías y tipos celulares. Entre los que presentan actividad antiangiogénica, los inhibidores que mejor resultado han demostrado y que actualmente se están administrando en la clínica son el sorafenib y el sunitinib. El sorafenib es un inhibidor multidiana de los receptores tirosina quinasa VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR- β implicados en angiogénesis, y de la serina treonina quinasa Raf-1, implicada en proliferación celular (Wilhelm et al., 2004). En 2005 sorafenib fue aprobado para el tratamiento del carcinoma renal avanzado, y en 2007 para el tratamiento del carcinoma hepatocelular irreseccable. El sunitinib es inhibidor multidiana de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa, con una potente actividad antitumoral y antiangiogénica. Sunitinib inhibe receptores tirosina quinasa implicados en angiogénesis y expresados por células endoteliales y murales como VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR- α y PDGFR- β (Abrams et al., 2003a; Mendel et al., 2003). Por otro lado, también inhibe un conjunto de receptores implicados en

proliferación y supervivencia celular expresados en las células tumorales, como c-KIT (*stem cell factor receptor*), FLT3 (*Fms-Like tyrosine kinase 3*), CSF-1 (receptor tipo I del factor estimulador de colonias) y RET (receptor del factor neutrófico derivado de línea celular glial) (Abrams et al., 2003a; O'Farrell et al., 2003). Sunitinib fue aprobado por la FDA en enero de 2006 para el tratamiento de carcinoma renal de avanzado y sarcomas de tejidos blandos (Faivre et al., 2007; Goodman et al., 2007).

Hace algunos años se demostró experimentalmente otra potencial inmunoterapia antiangiogénica. La inmunización con células endoteliales xenogénicas inducía xenoanticuerpos policlonales que inhibían la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Así, la inmunización de ratones con distintas líneas celulares endoteliales humanas, demostró un efecto antiangiogénico y la inhibición del crecimiento de tumores murinos como fibrosarcoma, hepatoma y cáncer de mama, mientras que la inmunización con líneas celulares endoteliales murinas no tenía ningún efecto (Wei et al., 2000). El mecanismo antiangiogénico se asoció con la producción de anticuerpos contra el VEGFR2 tras la inmunización xenogénica. Posteriormente, también se demostró que los xenoanticuerpos inducidos en conejos tras la inmunización con líneas endoteliales de ratón generaba xenoanticuerpos que causaban la apoptosis de células endoteliales murinas y humanas. Su administración pasiva disminuía el crecimiento tumoral y la mortalidad en ratones inmodeprimidos (*nude*) expuestos a tumores humanos y murinos (Scappaticci et al., 2003). Recientemente se ha demostrado que la inmunización de primates no humanos con hematíes porcinos, induce xenoanticuerpos IgG dirigidos contra antígenos no proteicos (no hay cambios en el patrón de proteínas reconocidas antes y después de la xenoinmunización), que reaccionan de forma cruzada con células endoteliales humanas (Máñez et al., 2009). Esto sugiere que los efectos antiangiogénicos de la inmunización xenogénica no se relacionan con antígenos presentes en las células endoteliales, como se había propuesto, sino con antígenos xenogénicos (posiblemente carbohidratos).

3.3- Modelo transgénico murino RIP-Tag2

Los modelos animales de cáncer han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de la investigación. Sin embargo, en los últimos años y debido sobre todo al enorme avance en los conocimientos sobre las bases moleculares del cáncer, ha surgido la necesidad de disponer de modelos genéticamente definidos, donde las mutaciones genéticas que predisponen o participan en el desarrollo de la enfermedad pueden ser contraladas.

Esta necesidad, combinada con el vertiginoso avance en la tecnología para la manipulación genética en mamíferos ha conducido al desarrollo de modelos animales modificados genéticamente, en su mayoría de origen murino, cada vez más sofisticados, que recapitulan muchos de los procesos que tienen lugar en la patología del cáncer en humanos. Estos modelos están proporcionando una visión más adecuada del proceso tumoral y permite obtener mejores modelos experimentales para desarrollar y ensayar nuevas terapias (Adams y Cory, 1991; Berns, 2001; Van Dyke y Jakcs, 2002). Una de las principales ventajas de los modelos transgénicos es que los tumores se originan a partir de células normales que se encuentran en su correspondiente microambiente tisular, y progresa hacia los diferentes estadios, tal y como ocurre en los tumores humanos (Adams y Cory, 1991; Hanahan et al., 1996). Estos modelos órgano-específicos también presentan oportunidades para el desarrollo, no solo de nuevas terapias contra el cáncer, sino también de estrategias preventivas que bloquean la progresión de lesiones pre-malignas en tumores.

En 1985 Douglas Hanahan desarrolló un modelo de ratón transgénico, el modelo RIP-Tag2, gracias a la fusión génica del promotor de la insulina de rata (RIP) y el antígeno T grande y T pequeño del virus de simio 40 (SV40) (Hanahan, 1985). El antígeno T (Tag) es capaz de transformar una gran variedad de tipos celulares por su capacidad de unirse a diferentes elementos coactivadores transcripcionales como la proteína del retinoblastoma supresora de tumores (pRb) y la p53 (Ali y DeCaprio, 2001). Una de las principales funciones de la pRb es la inhibición de la progresión del ciclo celular, mientras la p53 resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del DNA, activando las enzimas de reparación del DNA y deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. Además también desempeña un papel importante en la activación de la apoptosis y en la entrada de la célula en senescencia (Levine et al., 2004).

La tumorigénesis que se produce en el modelo RIP-Tag2 está dividida en diferentes ciclos muy bien definidos, por lo que sirve como prototipo general de las vías, parámetros y mecanismos moleculares de distintos tipos tumorales con múltiples etapas (Hanahan, 1985). El 100% de los islotes pancreáticos (unos 400 islotes por páncreas) expresan el oncogen Tag ya en su etapa embrionaria, y son morfológicamente asintomáticos hasta la semana 3-4. En ese momento empiezan a aparecer islotes hiperplásicos. Aproximadamente la mitad de los islotes presentan esta hiperproliferación celular de las células β , mostrando displasia y características de carcinoma in situ. El 8-12% de los islotes realizarán el cambio angiogénico, gracias a la secreción excesiva de factores proangiogénicos, aproximadamente a las 7-10

semanas de edad. Este cambio se caracteriza por la proliferación de las células endoteliales, dilatación vascular y microhemorragia, lo que crea islas de sangre en el interior de las lesiones, dándoles una apariencia altamente hemorrágica.

Aproximadamente a las 10 semanas de edad aparecen en los animales tumores sólidos, que representan el 3% del total de islotes del páncreas. Inicialmente estos tumores son pequeños adenomas encapsulados que a las 12-13 semanas progresan hacia adenomas de mayor tamaño o carcinomas invasivos todos ellos presentando una intensa vascularización mediada por vasos hemorrágicos y muy dilatados (Hanahan y Folkman, 1996). Los tumores RIP-Tag2 se generan a partir de células β del páncreas, lo que comporta que se secrete una gran cantidad de insulina a medida que va creciendo el tumor. Éste fenómeno comporta que en estadios avanzados de la enfermedad, a las 14-15 semanas, se produzca una hiperinsulinemia que provoca una hipoglicemia severa que aboca en la muerte del animal.

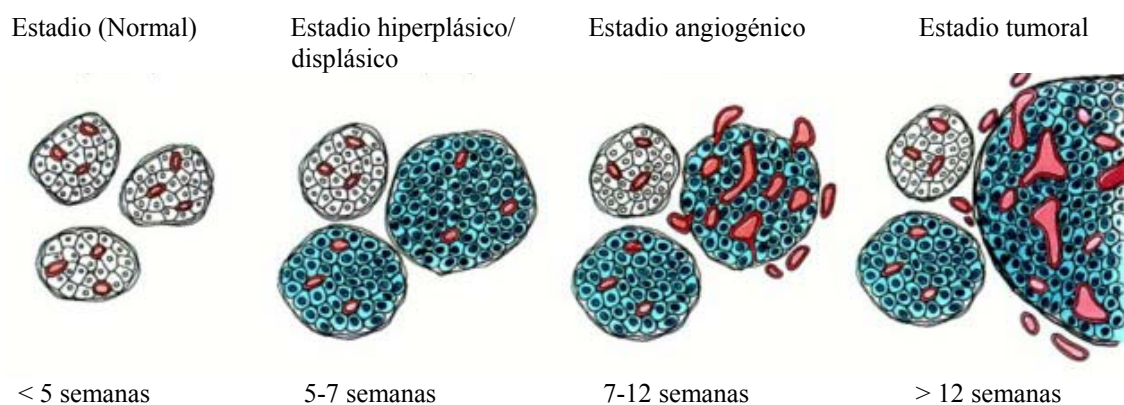


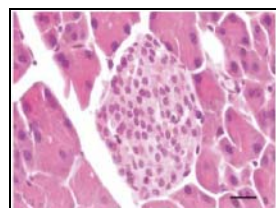
Figura 12. **Progresión tumoral del modelo RIP-Tag2.** Esquema de la progresión tumoral del modelo RIP-Tag2, donde se muestra las etapas del proceso tumoral por semanas (Hanahan y Folkman, 1996).

El modelo RIP-Tag2, al tener tumores altamente hemorrágicos, nos permite observar de manera sencilla y rápida los efectos de los fármacos antiangiogénicos por eso se ha convertido en un modelo ideal para llevar a cabo estudios preclínicos con estos medicamentos. Gracias al hecho que la progresión tumoral de ratones RIP-Tag2 esté tan definida, se pueden diseñar diferentes tipos de ensayos con él, dependiendo del estadio tumoral que se desee estudiar (Bergers et al., 1999). A partir de las 10 semanas de edad, los ratones RIP-Tag2 pueden presentar diferentes tipos de lesiones, las que se pueden clasificar en distintas categorías, descritas en la tabla 8 y representadas en la figura 12 (Lopez y Hanahan, 2002; Hanahan y Folkman, 1996).

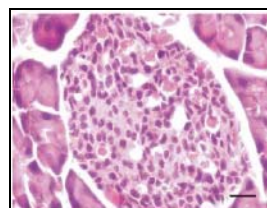
Tabla 8. **Descripción de los diferentes estadios tumorales.** Se enumeran las diferentes características que presentan los tumores RIP-Tag2 en sus distintos estadios, como el tamaño, la morfología de los vasos o el grado de invasión (López y Hanahan, 2002).

Estado	Ratio núcleo/citoplasma	Tamaño de lesión (comparado con islotes normales)	Morfología vascular	Márgenes tumorales
“Normal” Tag+	Similar a células β normales	Similar (<0,2mm)	Similar a los capilares de los islotes normales	Bien definido. Similar a islotes normales
Hiperplásico/displásico	Incrementado respecto a células β normales	Agrandados (0,2-0,5mm)	Similar a los capilares de los islotes normales	Bien definido. Similar a islotes normales
Islotes angiogénicos	Incrementado respecto a células β normales	Agrandados (<1mm)	Vasculatura dilatada y tortuosa: aparición de islas de sangre	Bien definido. Similar a islotes normales
Tumor encapsulado	Incrementado respecto a células β normales	Mucho más grandes (1-10mm)	Vasculatura dilatada y tortuosa: aparición de islas de sangre	Bien definido. Se puede observar una cápsula de colágeno
Tumor microinvasivo	Incrementado respecto a células β normales	Mucho más grandes (1-10mm)	Vasculatura dilatada y tortuosa: aparición de islas de sangre	Regiones focales de invasión. Márgenes interrumpidos por zonas invasivas
Tumor altamente invasivo	Incrementado respecto a células β normales	Mucho más grandes (1-10mm)	Vasculatura dilatada y tortuosa: aparición de islas de sangre	Invasión generalizada. Sin rastro de márgenes tumorales

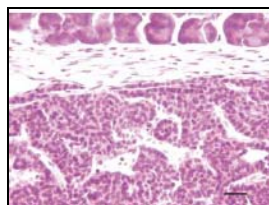
En el mismo páncreas se observan islotes morfológicamente normales; hiperplásicos, en los que la densidad celular se ve incrementada; y angiogénicos, en los que se ha producido el cambio angiogénico y se observan islas de sangre en su interior. Estas lesiones se consideran pre-neoplásicas. Además también se pueden encontrar tumores clasificables como: tumores encapsulados, cuando tiene sus márgenes muy bien definidos y existe una cápsula de colágeno que los rodea completamente, la cual puede ser o no visible; tumores microinvasivos, que tienen regiones focales de invasión, en las que se observan un grupo de células tumorales adentrándose en el tejido acinar adyacente, pero que mantienen la mayor parte de los márgenes intactos; y tumores altamente invasivos, en ellos no se pueden definir márgenes a los tumores, ya que por todo su perímetro encontramos células tumorales invadiendo el páncreas exocrino de alrededor (Fig. 13).



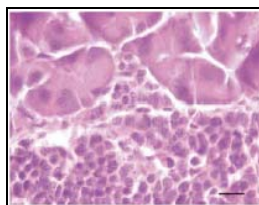
Islote hiperplásico/displásico



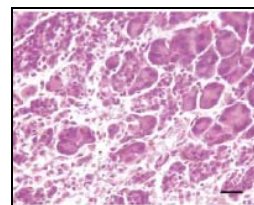
Islote angiogénico



Tumor encapsulado



Tumor microinvasivo



Tumor altamente invasivo

Figura 13. **Morfología de las lesiones pre-neoplásicas y de los tumores RIP-Tag2.** En las imágenes se puede apreciar la morfología de los diferentes tipos de lesiones que se pueden encontrar en un ratón RIP-Tag2 a partir de la décima semana de edad de los animales (López y Hanahan, 2002).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los xenoanticuerpos naturales tienen funciones en el huésped que van más allá de la reacción con células, tejidos u órganos de otras especies y su modulación podría utilizarse con fines terapéuticos.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el impacto de los xenoanticuerpos naturales y su modulación en la sepsis tras CLP de distintos modelos animales y en la tumorigénesis de ratones RIP-Tag2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I.** Investigar el efecto de los anticuerpos anti- α Gal en la sepsis que se produce en ratones α Gal KO tras realizar una CLP.
- II.** Estudiar el impacto de la inmunización xenogénica en la sepsis que se produce en la rata tras realizar una CLP.
- III.** Determinar las características de xenoanticuerpos presentes en la rata tras una inmunización xenogénica, especialmente la reacción cruzada de los mismos con otras especies distintas y microorganismos.
- IV.** Investigar el impacto de la inmunización xenogénica en la angiogénesis y tumorigénesis de ratones RIP-Tag2.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Estudios de reactividad cruzada de los xenoanticuerpos

1.1- Determinación de anticuerpos anti- α Gal en ratón α Gal KO

Los ratones α Gal KO de la colonia que el grupo tiene en el IDIBELL generan espontáneamente altos niveles de anticuerpos naturales anti- α Gal a partir de los 4-6 meses de edad. Estos animales provienen de la colonia con background híbrido de B6xCBAx129sv que generó la Dra. Costa en Alexion Pharmaceuticals (Cheshire, CT, U.S.A.) (Costa et al., 1999). Los ratones α Gal KO son un modelo más cercano al hombre ya que a diferencia de los roedores, los humanos tienen niveles elevados de anticuerpos naturales anti- α Gal debido a una deficiencia en la alfa 1,3-galactosiltransferasa (Galili et al., 1993). Para determinar los niveles de anticuerpos anti- α Gal IgM e IgG circulantes en sangre periférica utilizamos un ELISA preparado en el laboratorio. Para ello se utiliza una placa de 96 pocillos (NUNC, Roskilde, Dinamarca) y se recubren los pocillos con 50 μ l de antígeno α Gal conjugado a albumina sérica humana (HSA, Dextra, Reading, Reino Unido) en la concentración de 2,5 μ g/ml en tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 1,59 g/L, NaHCO_3 (HCL) 2,93 g/L, pH 9,6), y un control negativo en la misma placa con solo HSA. La absorción de los antígenos se lleva a cabo durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lava 3 veces con solución salina tamponada (PBS)/0,5% Tween 20 para eliminar el exceso de antígeno no unido y se bloquea a continuación con 50 μ l por pocillo con PBS/0,05% Tween 20 durante 1 h a 4°C. Se realiza un segundo lavado y se añaden 50 μ l de los sueros problema diluidos en solución bloqueante incubándolos durante 1 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se realiza un lavado y se añaden los anticuerpos secundarios de cabra anti-IgM murina [dilución 1/3000] y anti-IgG murina (H+L) [dilución 1/4000] conjugados con peroxidasa (ZyMax™, Invitrogen Corporation, San Francisco, U.S.A.) en solución bloqueante. Se incuban durante 1 h a temperatura ambiente, se lavan para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas y se añade el sustrato enzimático en solución (*Sigma Fast o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) tablets sets*, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO). La solución sustrato contiene 0,4 mg/ml de OPD (sustrato de peroxidasa), 0,4 mg/ml peróxido de hidrógeno de urea y 0,05 M de tampón fosfato-citrato. Se incuba entre 10-30 min dependiendo de la intensidad del color desarrollado y se para la reacción con 50 μ l de una solución de ácido clorhídrico 3 N. Para la determinación de la densidad óptica se utilizó un espectrofotómetro Biotek Power Wave XS a una longitud de onda de 492 nm, con la ayuda del programa KC Junior.

1.2- Inducción de anticuerpos xenogénicos en rata

Con el fin de inducir un patrón concreto de xenoanticuerpos IgM e IgG en la rata se realizó un modelo experimental en el que ratas albinas machos de raza consanguínea Lewis (200-250g de peso) fueron inyectadas con sangre xenogénica. La sangre se obtuvo mediante punción cardíaca de hámster *golden syrian* (100-150 g de peso) mientras que la de cerdo (híbrido Large White x Landrace de 3 meses de edad) se extrajo de sangre periférica. Los hámsteres y ratas se obtuvieron certificados libres de patógenos de Harlan Interfauna Ibérica S.L. Se mantuvieron en el animalario de la Universidad de Barcelona (campus Bellvitge) en condiciones de temperatura (20-22°C) y humedad controlada con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h y recibieron comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las recomendaciones para el correcto tratamiento y uso de los animales de laboratorio, y fueron aprobados por el comité ético de experimentación animal local y por la *Generalitat de Catalunya*. En concreto, los animales fueron anestesiados tanto para las extracciones de sangre como para las diferentes inyecciones. La extracción de sangre se llevó a cabo por punción intra-cardíaca en hámster y de la vena yugular en cerdos, ambos bajo anestesia profunda. Las ratas fueron sometidas a un grado medio de anestesia para las extracciones de sangre de la vena caudal (para el seguimiento de la producción de anticuerpos) y de anestesia ligera para las inyecciones. La sangre xenogénica se recogió heparinizada y fue inmediatamente inyectada vía intra-peritoneal (ip) a las ratas receptoras. El mismo procedimiento de inyección ip se utilizó en ratas control que recibieron PBS. Se establecieron varios grupos experimentales a los cuales se les aplicaron diferentes protocolos de inmunización y seguimiento de las cinéticas de producción de anticuerpos, incluyéndose cuando se especifica cohortes control inyectadas con PBS.

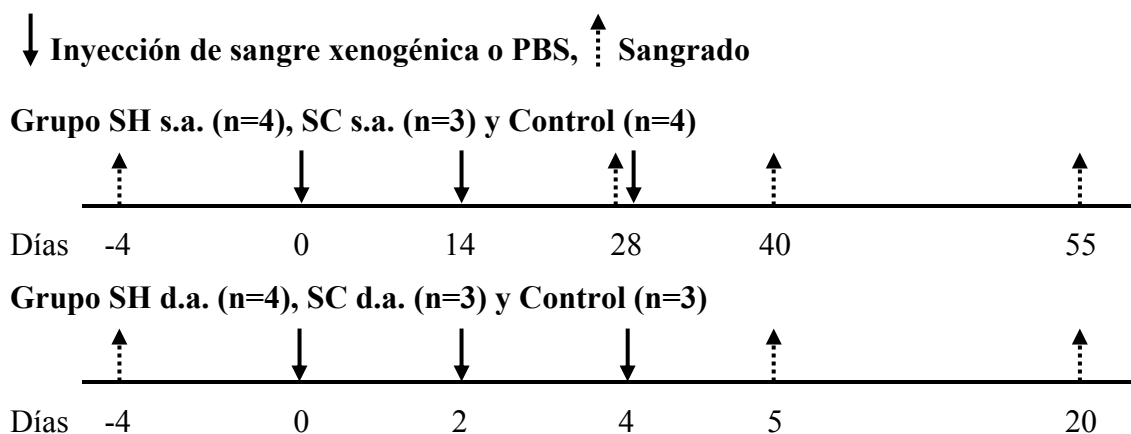
En primer lugar, se realizó un experimento de inmunizaciones repetidas con sangre de hámster inyectada 2 veces por semana durante 5 semanas. Las extracciones de sangre a las ratas se realizaron semanalmente para la determinación de los títulos de anticuerpos. Dentro de este estudio, los grupos experimentales fueron:

- Grupo 1: inyección de 1 ml de sangre de hámster (n=3).
- Grupo 2: inyección de 0,5 ml de sangre de hámster (n=3).

Posteriormente, se llevaron a cabo seis protocolos de inmunización siguiendo diferentes patrones de inyección para los distintos grupos experimentales, los cuales se describen en el Esquema 1. En concreto se establecieron dos protocolos (SH d.a. y SC d.a.) donde los animales recibieron por vía ip 3 dosis de sangre de hámster o cerdo durante una semana

(días alternos (d.a.)) con el objetivo de favorecer la producción de IgM; mientras que los animales del grupo control recibieron PBS siguiendo el mismo procedimiento de inyección. Por otro parte, se establecieron otros dos protocolos (SH s.a., SC s.a.) donde los animales recibieron por vía ip 3 dosis de sangre de hámster o cerdo una por semana (semanas alternas (s.a.)) favoreciendo la producción de IgG, mientras que el grupo control se inyectaron con PBS. Los animales de los grupos SH d.a., SC d.a. y su correspondiente control se sacrificaron a los 20 días posteriores a la primera inyección; mientras que los animales de los grupos SH s.a., SC s.a. y su grupo control a los 55 días.

Esquema 1. **Protocolo de inducción de xenoanticuerpos (IgM e IgG) en ratas macho Lewis.** Los grupos inducidos fueron inyectados con 1 ml de sangre de hámster o de cerdo mientras que los grupos control recibieron una solución salina tamponada.



Se obtuvo una muestra basal de sangre de todas las ratas antes de la primera inmunización. Posteriormente se obtuvieron muestras de cada animal de los grupos experimentales SH s.a. y SC s.a. a los 28 y 40 días tras la primera inmunización, y a los 5 días en los animales de los grupos SH d.a. y SC d.a. También se obtuvieron muestras de los animales controles en los mismos tiempos establecidos. En todos estos tiempos, se obtuvo 1 ml de sangre que fue centrifugada dos veces a 5000 rpm durante 10 min para obtener el suero que se almacenó a -20°C.

Los títulos de xenoanticuerpos anti-hámster y anti-cerdo (IgM e IgG) se determinaron de cada muestra de suero mediante citometría de flujo. Como células diana se utilizaron linfocitos de bazo de hámster o la línea celular de linfoblastos porcinos L35 a una concentración de 1×10^6 células por cada muestra (condiciones de aislamiento y cultivo descritas en apartado 1.3). Las células se incubaron a 4°C durante 30 min en un volumen final

de 100 µl con suero problema diluido 1/50 en PBS/1% BSA. Para ello se utilizaron micro-placas de 96 pocillos con fondo en V (NUNC). Tras la primera incubación se realizó un lavado con PBS/1% BSA y se procedió a una segunda incubación (a 4°C durante 30 min en oscuridad) con 100 µl de una mezcla de los dos anticuerpos secundarios policlonales de cabra (fragmento F(ab')₂ anti-rata IgM (µ) conjugado con ficoeritrina (PE) [dilución 1/200] y fragmento F(ab')₂ anti-rata IgG (H+L) conjugado con diclorotriazinil-aminofluoresceína (DTAF) [dilución 1/100], ambos de Beckman Coulter™ Immunotech, Marsella, Francia) en PBS/1% BSA. Finalmente, las células se lavaron y resuspendieron en PBS y se transfirió todo el volumen a los tubos de citometría. Para la determinación de la intensidad de fluorescencia se utilizó un citómetro FACScalibur (BD Biosciences) con tres detectores/fotomultiplicadores que detectan la luz emitida a 530 nm (FL1), 585 nm (FL2) y >670 nm (FL3), con la ayuda de programas de adquisición y análisis (Cell Quest, FlowJo) y un programa de verificación (Facs Comp).

1.3- Reactividad cruzada de los xenoanticuerpos IgM e IgG con microorganismos

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral es estudiar la reactividad cruzada que presentan los anticuerpos naturales, concretamente los xenoanticuerpos, contra antígenos xenogénicos presentes en bacterias de la flora endógena. Con este fin, se determinó por citometría de flujo la reactividad cruzada de los xenoanticuerpos anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG inducidos en ratas Lewis frente a las cepas bacterianas *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* y *Escherichia coli*. El aislamiento de estas bacterias se describe en el apartado 2.2. Para ello, se incubaron 100 µl de suspensión celular inicial glicerinado en 5 ml de medio Luria-Bertoni (LB) durante 12 h a 37°C en agitación hasta alcanzar la saturación del cultivo. Posteriormente se inocularon 100 µl de este cultivo saturado en 5 ml de medio LB fresco y se incubaron de nuevo a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0,3 a 600 nm determinado con un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England). En este punto, las bacterias se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron en 2,5 ml de PBS/1% BSA. Para determinar la reactividad de anticuerpos, se utilizaron los sueros obtenidos en el punto basal, en el día 5 del grupo de ratas con predominancia IgM (SH d.a. y SC d.a.) y en el día 40 para el grupo con predominancia IgG (SH s.a. y SC s.a.). Se realizaron primero series de diluciones de los sueros con PBS/1% BSA cubriendo un amplio rango [1/5-1/1000] con el fin de establecer aquellas más adecuadas para trabajar en condiciones de linealidad en relación a la intensidad

de fluorescencia obtenida por citometría. Los sueros diluidos se incubaron a 4 °C durante 30 min con las bacterias. Posteriormente se realizó una segunda incubación (a 4 °C durante 30 min) con los anticuerpos secundarios policlonales anti-rata IgM [dilución 1/200] y anti-rata IgG [dilución 1/100] (descritos en el apartado 1.2.) en PBS/1% BSA. Posteriormente se procedió el análisis por citometría, según lo descrito en el apartado 1.2.

1.4- Líneas celulares mamíferas y condiciones de cultivo y preservación

Las líneas celulares mamíferas incluidas en los estudios y sus condiciones de cultivo se describen a continuación.

Linfocitos de hámster, rata y conejo: Se aislaron del bazo de estas especies mamíferas tras disgregar mecánicamente el órgano con ayuda de cristales esmerilados y lisar los eritrocitos presentes en la suspensión celular con la *FACSTM Lysin Solution 1X* (BD Biosciences, San José, U.S.A.). Las células aisladas se utilizaron directamente en el estudio por citometría de flujo de reactividad de los xenoanticuerpos inducidos en la rata mediante inmunización con sangre de hámster o cerdo frente a células de rata y otras especies mamíferas.

Jurkat: Células T linfoblastoides de leucemia humana de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) fueron cultivadas en suspensión en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) (GIBCO, Invitrogen Corporation) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bobino (FBS) y 200 U/ml penicilina/estreptomicina.

L35: Linfoblastos porcinos obtenidos de ECACC fueron cultivados en suspensión en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FBS, 200 U/ml penicilina/estreptomicina, 2mM L-glutamina, 1mM piruvato de sodio (NaP) y 0,05 mM 2-Mercapto etanol (2ME).

HMEC: Células endoteliales de microvasculatura humana de ECACC fueron cultivadas con medio MCDB 131 (GIBCO, Invitrogen Corporation) suplementado con 20% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de L-glutamina, antibiótico antimicótico 1X (Sigma-Aldrich, Inc.), 2 µg/ml hidrocortisona, 0,01 mg/ml ciprofloxacino, 0,03 U/ml DNAsa y 10 ng/ml rhEGF.

PAEC: Células endoteliales aorticas porcinas de ECACC fueron cultivadas con medio *Dolbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) conteniendo 4,5 g/l glucosa y L-glutamina (GIBCO, Invitrogen Corporation) suplementado con 10% (v/v) de FBS, 200 U/ml penicilina/estreptomicina y 50 mg/l mitógeno endotelial (EM, Millipore, Billerica, U.S.A.).

LEW-1A: Células endoteliales de rata inmortalizadas con SV40 fueron donadas por el laboratorio INSERM UMR 643, Francia. Estas células fueron cultivadas con medio DMEM conteniendo 4,5 g/l glucosa suplementado con 10% (v/v) de FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 0,1 mg/mL estreptomina, 1 mM piruvato de sodio, 1% amino ácidos no esenciales, 1% HEPES (*N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid*), y 5×10^{-5} M 2-β mercapto etanol (todo de Sigma-Aldrich, Inc.).

FAO: Células de hepatoma de rata fueron donadas por el Grupo de investigación Claves biológicas del fenotipo invasivo y metastático dirigido por la Dra. Isabel Fabregat en el IDIBELL. Las células fueron cultivadas con medio Ham F12 (modificado de Coom) suplementado con 10% (v/v) de FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 0,1 mg/mL estreptomina, 2,5 µg/ml anfotericina B y 2,68 g/L bicarbonato sódico.

Tanto las líneas celulares endoteliales (HMEC, PAEC, LEW-1A), como la de hepatoma de rata (FAO) crecen en monocapa adheridas al plástico y se utilizó la solución enzimática TrypLE Express (GIBCO, Invitrogen Corporation) para su aislamiento.

Para la criopreservación de células, éstas eran lavadas con medio fresco por centrifugación a 1200 rpm por 5 min y entonces contadas usando una cámara de Neubauer. El medio de congelación (DMEM, 10% (v/v) DMSO y 50% FBS) era añadido al pellet celular hasta alcanzar una concentración final de $1,5-2 \times 10^6$ células/ml. El pellet era resuspendido gentilmente y las células en suspensión eran transferidas a los criotubos marcados e inmediatamente puestos en el contenedor de congelación (Mr. Frosty, Sigma-Aldrich, Inc.) y posteriormente en un congelador de -80°C . Para largos períodos de almacenamiento, las células eran transferidas a un tanque de nitrógeno líquido.

Para la descongelación de células, el criotubo era colocado en un baño a 37°C en agitación hasta la total descongelación de su contenido. Una vez descongelado, el criotubo era lavado externamente con etanol 70% y bajo la cabina biológica las células eran transferidas a un tubo de centrifuga de 15 ml con 10 ml de medio atemperado y centrifugado a 1200 rpm durante 5 min. El sobrenadante era eliminado y el pellet resuspendido con medio fresco. Posteriormente era transferido a un frasco de cultivo celular. El medio de cultivo se cambiaba al día siguiente.

1.5- Reactividad de xenoanticuerpos IgM e IgG con células de rata y de otras especies

En este trabajo, se determinó mediante citometría de flujo el reconocimiento de células linfocitarias y endoteliales de rata (auto-reactividad) y de otras especies por parte de los xenoanticuerpos inducidos en la rata mediante inmunización con sangre de hámster o cerdo. Para ello, se utilizaron los sueros obtenidos en los días 5 (predominancia IgM) y 40 (predominancia IgG) tras el inicio de las inmunizaciones de las cohortes correspondientes. Como células diana se utilizaron linfocitos de hámster, cerdo (L35), conejo, humanos (Jurkat) y de rata Lewis, además de células endoteliales de cerdo (PAEC), humanas (HMEC) y de rata Lewis (LEW-1A). Las células (1×10^6) se incubaron a 4°C durante 30 min en un volumen final de 100 μ l con suero problema diluido 1/50 en PBS/1% BSA. El resto del procedimiento, incluyendo la incubación con anticuerpos secundarios y el análisis por citometría, es idéntico al descrito en el apartado 1.2 para determinar el nivel de inmunización.

1.6- Reconocimiento de carbohidratos por xenoanticuerpos IgM e IgG

Con el objeto de determinar el patrón de reconocimiento de carbohidratos por parte de los xenoanticuerpos IgM e IgG inducidos en ratas Lewis con sangre de hámster o cerdo, se realizó en primer lugar un estudio de *glycoarrays* a través del *Consortium for Functional Glycomics* (CFG, <http://www.functionalglycomics.org>). Los *glycoarrays* de este consorcio son preparados a partir de librerías de carbohidratos naturales y sintéticos que contienen animas terminales que permiten que sean acoplados covalentemente en forma de *microarrays* a portaobjetos de N-hidroxisuccinimida como previamente describió Blixt et al. en 2004. En concreto, el *glycoarray* utilizado (versión 4.2) contenía 511 carbohidratos distintos, ver Anexo 1. En el estudio se analizaron muestras de suero obtenidas en el punto basal, a los 5 días (predominancia IgM) y a los 14 días (predominancia IgG) tras el inicio de las inmunizaciones con sangre xenogénica. Además, se utilizaron anticuerpos secundarios que permitieron determinar los niveles de reconocimiento a carbohidratos de las inmunoglobulinas IgM e IgG por separado.

1.7- Competición de reactividades de xenoanticuerpos IgM e IgG frente a células mamíferas y bacterias con carbohidratos específicos

Con el fin de identificar posibles carbohidratos responsables de la reactividad cruzada, se analizó a continuación por citometría de flujo la capacidad de una serie de carbohidratos de

inhibir la reactividad de los xenoanticuerpos inducidos anti-hámster o anti-cerdo frente a distintas células mamíferas y bacterias. En concreto, se utilizaron para las células mamíferas L-ramnosa, melibiosa y D-glucosa (todos de Sigma-Aldrich, Inc.) en un rango de concentración entre 0 y 50 mM, así como GalNAc β 1-6GalNAc, Gal α 1-4GlcNAc, GlcA β 1-6Gal β (de *Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences*) y el disacárido de Forssman (Sigma-Aldrich, Inc.) en un rango entre 0 y 1 mM. Como células dianas se utilizaron linfocitos de hámster y cerdo, así como células endoteliales humanas. En este estudio se utilizaron las muestras de suero obtenidas en el punto basal, día 5 (predominancia IgM) y 14 (predominancia IgG) tras el protocolo corto de inmunización. Las muestras diluidas 1/50 en solución de PBS/1% BSA se incubaron previamente con los diferentes carbohidratos durante 30 min a 4°C y a continuación, se incubaron con las células dianas durante otros 30 min a 4°C. La incubación con anticuerpos secundarios y el análisis por citometría se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 1.2.

También se realizó un estudio de inhibición de la reactividad de los xenoanticuerpos anti-hámster y anti-cerdo frente a *E. faecalis* con diferentes concentraciones de disacárido de Gala1-4GlcNAc y GlcA β 1-6Gal β entre 0 y 1 mM, y L-ramnosa, melibiosa y D-glucosa entre 0 y 50 mM y el disacárido de Forssman y ácido acetil neuramínico entre 0 y 10 mM. Con este objetivo se determinó la deposición de los anticuerpos anti-hámster y anti-cerdo contra *E. faecalis* por citometría de flujo. Para ello se utilizaron las muestras de suero obtenidas en el punto basal, día 5 (predominancia IgM) tras los protocolos de inmunización de sangre xenogénica días alternos (SH d.a. y SC d.a.). Se realizaron diluciones de los sueros entre 1/100 y 1/500 y se incubaron a 4 °C durante 30 min con los diferentes carbohidratos. Tras la incubación, se realizó una segunda incubación a 4 °C durante 30 min con las bacterias. La incubación con anticuerpos secundarios y el análisis por citometría se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 1.2.

2.- Modelo de sepsis por ligadura y punción del ciego en rata

2.1- Modelo de sepsis por CLP en rata Lewis

Con el fin de estudiar el efecto de la estimulación xenogénica en un proceso séptico, se desarrolló el modelo *in vivo* de sepsis mediante CLP en rata Lewis macho. La CLP permite el estudio de la sepsis causada por microorganismos de la flora endógena, fundamentalmente

por gérmenes Gram negativos (Parker y Watkins 2001; Fink y Heard, 1990). Aunque no encontramos experiencia previa de CLP en rata Lewis, esta cepa se escogió por ser la utilizada en la mayoría de estudios de xenotrasplante en rata y más concretamente en la combinación hámster a rata (Séveno et al., 2007; Komori et al., 2008). En primer lugar se llevó a cabo una estandarización del modelo de CLP en ratas Lewis con el objetivo de obtener una sepsis leve (~ 15% de mortalidad en la fase aguda, primeros 4 días). Los aspectos que determinan la gravedad de la sepsis son principalmente el porcentaje de ciego ligado, grosor de la aguja de punción y la cantidad fecal extraída del ciego como fuente de carga bacteriana. Considerando que la literatura indica que la punción con una aguja 20G y una ligadura del 30% de ciego (3 cm aproximadamente) produce en ratas una sepsis severa, con una mortalidad del 90-100% a los 4 días tras la CLP, se valoró la utilización de agujas de 16G, 17G, 18G, con ligadura de 1 cm de ciego. Para ello cada rata se anestesió inicialmente con 3-4% de isoflurano (FORANE® ABBOTT Laboratories, S.A.) y un flujo de oxígeno de 2 l/min, seguido de una dosis más baja de mantenimiento. Una vez que desaparecieron los reflejos en el animal se realizó una disección longitudinal (1-2 cm) en el abdomen y tras exposición del intestino, se ligó un 25% del ciego (1 cm) con una sutura 4/0 de ácido poliglicólico reabsorbible (Safil®violet, B/Braun, Tuttlingen, Alemania). En el caso de los grupos SH s.a., SH d.a., SC d.a. y sus controles, una vez ligado el ciego, se punzó atravesándolo con una aguja estéril de 19 G, generando 2 perforaciones y causando la salida de material fecal a la cavidad abdominal con su correspondiente carga bacteriana de flora intestinal. Posteriormente, se reintrodujo todo el órgano en el interior de la cavidad abdominal, se suturó el abdomen y se facilitó la recuperación del animal manteniéndolo con una fuente de calor (manta térmica). Se administró como analgésico buprenorfina por vía subcutánea (sc) (dosis de 0,05 mg/kg), previamente a la cirugía y posteriormente cada 8 h, durante 7 días. Los animales permanecieron en observación un mínimo de dos veces por día hasta el momento de su eutanasia en cámara de CO₂ que se llevó a cabo en cuanto cumplieron cualquier criterio de punto final o a los 15 días de realizada la CLP. Se determinaron diferentes parámetros como peso corporal y bienestar animal con el fin de valorar numéricamente el estado de los animales durante el desarrollo de la sepsis. La supervivencia se contabilizó por separado. En la Tabla 1 se describe la metodología y sistema de puntuación en el seguimiento del animal.

Tras los estudios pilotos de CLP, se establecieron los grupos experimentales que se definen en la Esquema 2 y que incluían un protocolo previo de inmunización con sangre de

hámster o cerdo seguido de CLP en un día escogido. Al grupo SH s.a. y su correspondiente control se les practicó la CLP 40 días después de iniciado el protocolo de inmunización, mientras que al grupo SH d.a. y su control, 5 días después (ver Esquema 2).

Esquema 2. Protocolo de inducción de xenoanticuerpos (IgM e IgG) para el estudio de su efecto en modelo de sepsis por CLP en ratas macho Lewis. Los grupos inducidos fueron inyectados con 1 ml de sangre de hámster o de cerdo mientras que los grupos controles recibieron PBS.

Grupo SH s.a. (n=9) y Control (n=8).

<u>1^{ra} Inyección</u>	<u>2^{da} Inyección</u>	<u>3^{ra} Inyección</u>	<u>CLP</u>	<u>48 h post CLP</u>	<u>15 d post CLP</u>
0 días	14 días	28 días	40 días	42 días	55 días

Grupo SH d.a. (n=17), SC d.a. (n=10) y Control (n=17).

<u>1^{ra} Inyección</u>	<u>2^{da} Inyección</u>	<u>3^{ra} Inyección</u>	<u>CLP</u>	<u>48 h post CLP</u>	<u>15 d post CLP</u>
0 días	2 días	4 días	5 días	7 días	20 días

Tabla 1. **Protocolo utilizado de supervisión de animales.**

Peso (2 veces por día):

- Normal (no hay pérdida de peso o el animal crece normalmente) = 0
- Pérdida de peso inferior al 10% = 2
- Pérdida de peso entre 10 y 20%. Posible alteración en el aspecto y cantidad de las heces = 3
- Pérdida de peso superior al 20%. El animal no consume agua ni alimento (Eutanasia) = 5

Observación del animal (diaria):

*Aspecto:

- Normal = 0
- Pelaje mate y/o erizado = 1
- Pelaje mate y/o erizado y/o presencia de secreciones oculares o nasales = 2
- Postura anormal = 3

*Automutilaciones o vocalizaciones extrañas indicativas de dolor: SI = 3 ó NO = 0

*Conducta en respuesta a estímulos (Diaria):

- Normal = 0
- Cambios menores = 1
- Anormal; movilidad reducida, inactivo = 2
- Muy agresivo o comatoso, convulsiones y/o temblores = 3

Cuando un animal obtiene una puntuación ≥ 3 en más de un parámetro, todos los 3 pasan a 4.

La puntuación final se calcula como la suma de los tres aspectos evaluados (peso, aspecto y conducta).

Medidas correctivas según puntuación:

- Hasta 4,9: _____ Sin dolor y incidencias evidentes
- De 5-8,9: _____ Dolor moderado (Supervisar cuidadosamente [analgésicos])
- De 9-12: _____ Dolor intenso (analgésicos – eutanasia en 24 horas)
- Mayor de 12: _____ Eutanasia inmediata

Las medidas correctivas se aplicaron en cualquier nivel del rango de puntuación. Además la muerte del animal no fue nunca un criterio de punto final.

2.2- Recogida y análisis de muestras en el estudio de CLP en rata

Se obtuvo una muestra basal de sangre de todas las ratas antes de la primera inmunización. Posteriormente se obtuvieron muestras de cada animal medio día a un día antes de la CLP (pre-CLP), tras las primeras 48 h y a los 15 días de la realización de la CLP. En todos estos tiempos se obtuvo 1 ml de sangre que fue centrifugada dos veces a 5000 rpm durante 10 min para obtener el suero que se almacenó a -20°C. De los tiempos basal y 48 h se recogieron 0,5 ml de sangre adicionales en tubos con el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que se mantuvieron a 4°C para su posterior análisis hematológico y microbiológico.

A partir de las muestras de suero y sangre completa, se caracterizaron respectivamente el perfil bioquímico y hematológico de las ratas que se generó como resultado de las diferentes pautas de inmunización y CLP. Para ello se monitorizaron varios parámetros metabólicos, de inflamación, daño hepático y renal. Los análisis se realizaron en los servicios de Bioquímica Clínica y Hematología Veterinaria de la Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona (Cerdanyola del Valles, Barcelona).

Además, se determinaron los perfiles de expresión de múltiples citocinas que se generaron en las ratas tras la inmunización con sangre xenogénica y CLP mediante análisis con *microarray* de anticuerpos (RayBiotech, Inc.). Esta tecnología se basa en la unión de anticuerpos anti-citocina acoplados en *microarrays* a una superficie de cristal, según describen los protocolos de trabajo del fabricante. En concreto se analizaron los perfiles de expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias y otras moléculas relacionadas, incluyendo *Activin A*, *Agrin*, *B7-2/CD86*, *beta-NGF*, *CINC-1*, *CINC-2 alpha*, *CINC-3*, *CNTF*, *Fas Ligand*, *Fractalkine*, *GM-CSF*, *ICAM-1*, *IFN-gamma*, *IL-1 alpha*, *IL-1 beta*, *IL-1 R6*, *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-13*, *Leptin*, *LIX*, *L-Selectin*, *MCP-1*, *MIP-3alpha*, *MMP-8*,

PDGF-AA, *Prolactin R*, *RAGE*, *Thymus Chemokine-1*, *TIMP-1*, *TNF-alpha* y *VEGF*. Se analizaron muestras de suero obtenidas del grupo SH d.a. y su respectivo control en el punto basal, a los días 5 tras el inicio de las inmunizaciones con sangre xenogénica (predominancia IgM, tiempo pre-CLP), y a las 48 h posteriores a la CLP. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-citocina conjugado con biotina y estreptavidina fluorescente para determinar los niveles de cada citocina en suero. Las señales de quimioluminiscencia fueron detectadas usando un escáner láser. El análisis de las muestras se realizó en los servicios de *Tebu-bio laboratorios* (París, Francia).

Para caracterizar la bacteriemia en sangre periférica, se sembraron 100 μ l de sangre completa en una placa de Petri con medio base de agar sangre (Sigma-Aldrich, Inc.) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Una vez crecidas las colonias, éstas fueron identificadas mediante la combinación de diferentes métodos: tinción de Gram, cultivo en placa con medio diferencial agar McConkey y pruebas bioquímicas (catalasa y coagulasa). La identificación microbiológica se realizó en el laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.

3.- Modelo de sepsis por ligadura y punción del ciego en ratón α Gal KO

3.1- Estudio farmacodinámico de la molécula GAS914 en ratones α Gal KO

Con el fin de estudiar el papel de los anticuerpos anti- α Gal en sepsis, se realizó en primer lugar un estudio farmacodinámico en ratones α Gal KO tratados con la molécula GAS914 (Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza). El GAS914 es una molécula sintética homóloga al antígeno α Gal con capacidad para captar los anticuerpos anti- α Gal. La metodología empleada consistió en utilizar ratones α Gal KO machos adultos de 30 g de peso tratados con GAS914 siguiendo diferentes pautas que se describen en la Esquema 3. Los ratones, libres de patógenos específicos (SPF), se mantuvieron en condiciones de temperatura (20-22°C) y humedad controlada con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h y recibieron comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos a los cuales se sometieron los animales se realizaron de acuerdo con las recomendaciones para el correcto tratamiento y uso de los animales de laboratorio. Los protocolos de actuación fueron supervisados y aprobados por el comité ético de experimentación animal local.

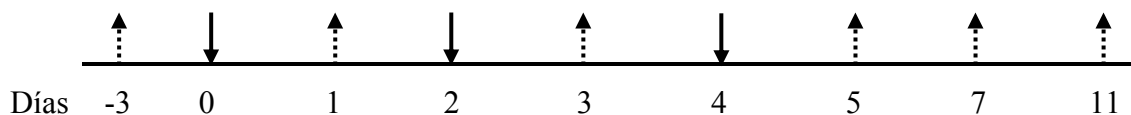
Para el estudio farmacodinámico, se obtuvo de cada ratón una muestra basal de sangre de la vena caudal por un volumen de 50 μ l y muestras en las mismas condiciones los días 1, 3, 5,

7 y 11 posteriores a la primera inyección. A partir de la muestras de sangre se obtuvo el suero mediante centrifugación en frío y las muestras se almacenaron posteriormente a -20°C . A continuación se determinaron los niveles séricos de anticuerpos anti- αGal IgM e IgG mediante el ELISA cuantitativo descrito en el apartado 1.1.

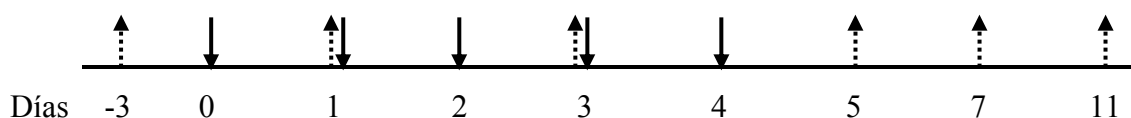
Esquema 3. **Estudio farmacodinámico del GAS914 en ratones machos αGal KO.** Los grupos tratados fueron inyectados con 300 μl de GAS914 en la concentración indicada por vía subcutánea, mientras que los grupos controles recibieron PBS.

↓ Inyección GAS914 o PBS, ↑ Sangrado

Grupo GAS914 1, 2,5, 5 y 10 mg/kg (n=5) y Control PBS 3 (n=3)



Grupo GAS914 5 mg/kg (n=5) y Control PBS 5 (n=3)



3.2- Modelo de sepsis por CLP en ratón αGal KO

La CLP se practicó tras 3 días de iniciado el tratamiento con la molécula GAS914 (Grupo 1) o PBS en el caso de los animales controles (Grupo 2), ver Esquema 4. Cada ratón se anestesió con 3-4% de isoflurano y un flujo de oxígeno de 1 l/min seguido de una dosis más baja de mantenimiento. Una vez desaparecidos los reflejos en el animal, se realizó una disección longitudinal (10-20 mm) en el abdomen y tras exposición del intestino, se ligó un 25% del ciego (~10 mm) con una sutura 4/0 de ácido poliglicólico reabsorbible. Una vez ligado el ciego, se punzó atravesándolo con una aguja estéril de 30G, generando dos perforaciones y causando la salida de material fecal a la cavidad abdominal con su correspondiente carga bacteriana de flora intestinal. Posteriormente, se reintrodujo el órgano en el interior de la cavidad abdominal, se suturó el peritoneo y musculatura del abdomen con sutura reabsorbible de 4/0 (3-4 puntos sueltos) y se cerró la piel con grapas. Se facilitó la recuperación del animal y se administró como analgésico buprenorfina por vía subcutánea (dosis de 0,05 mg/kg, cada 12 h). Los animales permanecieron en observación un mínimo de dos veces diarias durante el desarrollo de la sepsis y se aplicaron los criterios de punto final

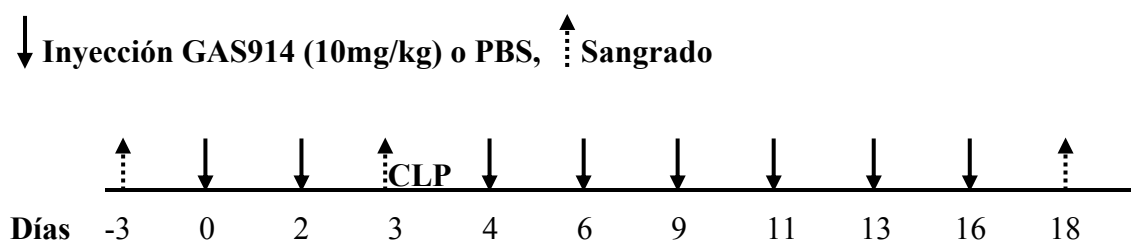
como se describe en la Tabla 1. La valoración numérica del estado de bienestar de los animales se realizó siguiendo la pauta descrita en el apartado 2.1 y se determinaron con este fin diferentes parámetros como peso corporal y aspecto. El número de animales vivos también se documentó a lo largo del tiempo. El experimento finalizó a las dos semanas de realizada la CLP y los animales que se recuperaron del proceso séptico fueron sacrificados en este punto en cámara de CO₂.

3.3- Efecto terapéutico de la molécula GAS914 por inhibición de los anticuerpos anti- α Gal.

Por otro lado, se consideró importante evaluar el potencial terapéutico de la molécula GAS914 una vez iniciado el proceso séptico. Para ello se siguió la misma pauta experimental descrita en el apartado anterior pero sin la inhibición previa de los anticuerpos anti- α Gal. En este caso, se iniciaron las inyecciones de la molécula GAS914 12 h después de realizada la CLP. Las inyecciones se realizaron por vía subcutánea tanto en los animales del grupo tratado (Grupo 3, dosis de 10 mg/kg, 3 inyecciones por semana, días alternos); como en el grupo control que recibió el mismo volumen y frecuencia de PBS (Grupo 4).

Esquema 4. **Protocolo de inhibición de anticuerpos anti- α Gal IgM e IgG para el estudio de su efecto en modelo de sepsis por CLP en ratones α Gal KO.** Los animales tratados fueron inyectados con 350 μ l de GAS914 (10 mg/kg) por vía subcutánea, mientras que el grupo control recibió PBS.

Grupo 1 y 2 (n=17).



3.4- Recogida y análisis de muestras en el estudio de CLP en ratón α Gal KO

Se obtuvo una muestra basal de sangre de todos los ratones antes de la primera inyección. Posteriormente se obtuvieron muestras de cada animal medio día antes de la CLP (pre-CLP) y a los 15 días de la realización de la CLP. En todos estos tiempos se obtuvo una muestra de 70 μ l de sangre a partir de la cual se obtuvo el suero por centrifugación y se almacenó a

-20°C. De los tiempos basal y 48 h se recogieron 50 µl de sangre adicionales en tubos con el anticoagulante EDTA que se mantuvieron a 4°C para su posterior análisis microbiológico.

Los títulos de anticuerpos anti-αGal IgM e IgG en sangre periférica se determinaron en todas las muestras de suero mediante ELISA según se describe en el apartado 1.1.

Para caracterizar la bacteriemia en sangre periférica, se sembraron 50 µl de sangre completa en una placa de Petri con medio base de agar sangre (Sigma-Aldrich, Inc.) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Una vez crecidas las colonias, éstas fueron identificadas mediante la combinación de diferentes métodos: tinción de Gram, cultivo en placa con medio diferencial agar McConkey y pruebas bioquímicas (catalasa y coagulasa). La identificación microbiológica se realizó en el laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.

3.5- Especificidad de la molécula GAS914 frente a xenoanticuerpos anti-αGal

Con el objeto de demostrar la especificidad de reacción de la molécula GAS914 frente a los xenoanticuerpos anti-αGal generados espontáneamente en los ratones αGal KO de nuestra colonia, se realizó un estudio de *glycoarrays* en colaboración con el *Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences*. Los *glycoarrays* de este laboratorio son preparados a partir de librerías de carbohidratos naturales y sintéticos que contienen aminas terminales y permiten que sean acoplados covalentemente en forma de *microarrays* a portaobjetos de N-hidroxisuccinimida. En concreto, el *glycoarray* utilizado contenía 573 carbohidratos distintos, ver Anexo 2. En el estudio se analizaron muestras de suero obtenidas en el punto basal y a los 3 días tras el inicio del tratamiento con la molécula GAS914 10 mg/kg de peso, días alternos por vía subcutánea. Además, se utilizó un anticuerpo secundario policlonal anti-Ig murinas M y G conjugado con biotina (Thermo Scientific Pierce, Barcelona, Spain) que permitió determinar los niveles de reconocimiento a carbohidratos de ambos isotipos conjuntamente.

4.- Papel de los xenoanticuerpos en el proceso de angiogénesis en ratón RIP-Tag2

4.1- Modelo de ratón RIP-Tag2 e inducción de anticuerpos xenogénicos

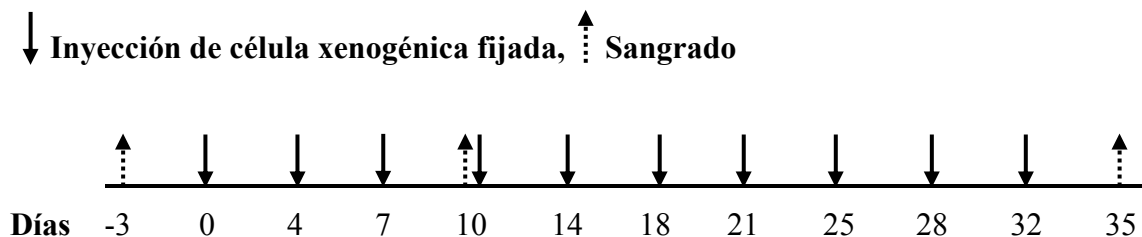
Teniendo en cuenta la polireactividad que presentan los xenoanticuerpos, se estudió también el efecto de los xenoanticuerpos inducidos en el proceso de angiogénesis utilizando

el modelo de ratón transgénico RIP-Tag2. Este modelo murino generado en 1985 por Douglas Hanahan en la Universidad de California en San Francisco desarrolla tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos (TNE-GEP) y ha resultado ser útil durante más de veinte años para estudios mecanísticos de angiogénesis, descubrimiento de dianas y biomarcadores y para probar terapias experimentales con nuevas drogas inhibidoras (Hanahan, 1985; Parangi *et al.*, 1995; Bergers *et al.*, 1999). Para este estudio concreto, se utilizaron ratones de ambos sexos y de 20-30 g de peso. Los animales se mantuvieron en el animalario de IDIBELL libres de patógenos específicos, además en condiciones de temperatura (20-22°C) y humedad controlada, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h y recibieron comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos a los cuales se sometieron los animales se realizaron de acuerdo con las recomendaciones para el correcto tratamiento y uso de los animales de laboratorio. Los protocolos de actuación fueron supervisados y aprobados por el comité ético de experimentación animal local y por la *Generalitat de Catalunya*.

Con el fin de inducir xenoanticuerpos, se establecieron los diferentes grupos experimentales descritos en la Esquema 5. En este caso, se administraron vía ip 2 dosis por semana durante 5 semanas de sangre o células endoteliales de especies concordantes en concreto de humano y cerdo. Teniendo en cuenta la progresión fenotípica del modelo RIP-Tag2, la primera inyección se administró en la octava semana de vida. La sangre humana y de cerdo se extrajo de vía periférica, mientras que las células endoteliales humanas (HMEC) se obtuvieron a partir de cultivos de celulares. Posteriormente, la sangre xenogénica obtenida y las células endoteliales humanas cultivadas fueron fijadas con paraformaldehído 3% en PBS, pH 7,4 por 24 h a 4°C. A continuación, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 2 h a 37°C. Finalmente, se eliminó el paraformaldehído residual de las preparaciones mediante 3 lavados, se resuspendieron éstas en PBS y se inyectaron en los ratones del estudio. Los animales del grupo control no se inmunizaron con células xenogénicas. Además se utilizaron datos históricos de animales sacrificados a las 13 semanas de edad (Grupo Control, n=15). Los animales se sacrificaron en la semana 13 de vida. Por requerimientos del modelo RIP-Tag2, se añadió sacarosa al 5% en el agua de bebida a partir de la semana 12 de edad y se mantuvo hasta el momento del sacrificio.

Esquema 5. **Protocolo de inducción de xenoanticuerpos IgM e IgG para estudiar su efecto en proceso de angiogénesis en ratones RIP-Tag2.** Los grupos inducidos fueron inyectados con 200 μ l de células xenogénicas humanas o de cerdo (1×10^6 de células/dosis).

Grupo SH d.s. (n=16), Grupo SC d.s. (n=5), y Grupo EH d.s. (n=5).



4.2- Recogida y análisis de muestras en el estudio de angiogénesis

Se obtuvo una muestra basal de sangre de todos los ratones antes de la primera inmunización. Posteriormente se obtuvieron muestras de cada animal a los 10 y 35 días después de la primera inmunización. En todos los tiempos se obtuvieron 80 μ l de sangre a partir de los cuales se obtuvo el suero mediante centrifugación en frío a 5000 rpm durante 10 min. Posteriormente las muestras se almacenaron a -20°C .

Los títulos de xenoanticuerpos anti-humano o anti-cerdo IgM e IgG se determinaron en las distintas muestras de suero por citometría de flujo. Como células diana se utilizaron células Jurkat, L35 y HMEC, a una concentración de 1×10^6 células por muestra. Estas se incubaron a 4°C durante 30 min en un volumen final de 100 μ l con suero problema diluido en PBS (0,75%). Para ello se utilizaron micro-placas de 96 pocillos con fondo en V (NUNC). Tras la primera incubación se realizó un lavado con PBS y se procedió a una segunda incubación (a 4°C durante 30 min en oscuridad) con los anticuerpos secundarios policlonales de cabra anti-ratón IgM conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) [dilución 1/100] y anti-ratón IgG (H+L) conjugado con Alexa Fluor® 488 [dilución 1/200], (ambos de Invitrogen Corporation) en 100 μ l de solución de PBS. El resto del protocolo se realizó según lo descrito en el apartado 1.2.

A partir de las muestras de páncreas obtenidas en el momento del sacrificio, se caracterizó el perfil angiogénico y tumorogénico de los ratones RIP-Tag2 tras las diferentes pautas de inmunización mediante estudio anatomopatológico. Para ello, se determinó en cada animal el número de tumores e islotes angiogénicos y el volumen tumoral. Además, se evaluó la infiltración leucocitaria presente en los tumores pancreáticos por inmunohistoquímica. Con este fin, las muestras de tumores obtenidas a los 35 días posteriores a la primera inmunización

de los ratones fueron congeladas a -80°C en OCTTM para su posterior análisis. Se obtuvieron secciones transversales de tejido de 3 μm de grosor con ayuda de un criótomo electrónico Shandon y se tiñeron con hematoxilina/eosina siguiendo un protocolo estándar. Las secciones fueron evaluadas independientemente por dos investigadores. Estos análisis se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Oriol Casanovas del *Laboratori de Recerca Translacional* (LRT) en el IDIBELL.

4.3- Reactividad de los xenoanticuerpos IgM e IgG con células endoteliales y tumorales

La reactividad de los xenoanticuerpos anti-humano IgM e IgG se determinó por citometría de flujo para las distintas muestras de suero obtenidas durante el estudio. Como células diana se utilizaron células endoteliales y tumorales aisladas del páncreas, así como células endoteliales murinas de la línea Ben5, a una concentración de 1×10^6 células por muestra. Las células primarias se extrajeron de tumores pancreáticos de ratones RIP-Tag2 de 13 semanas de edad mediante disgregación mecánica utilizando cristales esmerilados. Éstas se incubaron a 4°C durante 30 min en un volumen final de 100 μl con suero problema diluido hasta obtener un 0,75% en PBS. Para ello se utilizaron micro-placas de 96 pocillos con fondo en V (NUNC). Tras la primera incubación se realizó un lavado con PBS y se procedió a una segunda incubación (a 4°C durante 30 min en oscuridad) con 100 μl de los anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón IgG (H+L) conjugado con Alexia Fluor® 488 [dilución 1/200], (Invitrogen Corporation) y de rata anti-CD31 murino conjugado con PE [dilución 1/100], (BD PharmingenTM) en solución de PBS. El resto del protocolo se realizó según lo descrito en el apartado 1.2.

Las células endoteliales de ratón BEN5, proporcionadas por el Dr. Casanovas, fueron cultivadas con medio DMEM conteniendo 4,5 g/l glucosa y suplementado con 10% (v/v) de FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 0,1 mg/mL estreptomycin (todo de Sigma-Aldrich, Inc.). Los procesos de congelación y descongelación se realizaron según lo descrito en el apartado 1.4.

4.4- Reconocimiento de proteínas por xenoanticuerpos IgM e IgG

Con el objeto de determinar el patrón de reconocimiento de proteínas por parte de los xenoanticuerpos IgM e IgG inducidos en ratones RIP-Tag2 con sangre humana, se llevó a cabo un estudio mediante western blot. En concreto, se analizaron las muestras de sueros

obtenidas en el punto basal y a los 35 días (predominancia IgG) tras el inicio de las inmunizaciones con sangre xenogénica. La extracción de proteínas se realizó mediante la maceración en frío de un fragmento de tumor pancreático previamente congelado en nitrógeno líquido. Al tejido macerado se añadieron 200 µl de solución de lisis (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Tritón X100, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 10% Glicerol, 0,5 mM DTT, 0,37 mg/ml Na₃VO₄, 5,75 mg/ml β-glicerofosfato, 1,6 ng/ml Leupeptina, 1 ng/ml PMSF) y se mantuvo en frío y rotación a 24 rpm durante 60 min. Posteriormente, se centrifugó dos veces a 13000 rpm a 4°C y se recogió el sobrenadante, que se almacenó a -80°C.

La concentración de proteína presente en el extracto se determinó con *BCATM Protein assay kit* (Thermo scientific, Rockford, U.S.A.), siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, se realizó la electroforesis del extracto tumoral en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) en condiciones no desnaturizantes, cargándose 40 µg de proteínas totales por pocillo en 35 µl de volumen. Se empleó un gel concentrador al 4% de poliacrilamida y gel separador al 6 o 15%. La separación de proteínas por SDS-PAGE se resolvió durante 90 min a 120 V. A partir de aquí se desarrolló una de las siguientes opciones:

- **Tinción del gel:** La tinción del gel se hizo con una solución fijadora colorante de azul de Coomassie (2,5 g/l azul de Coomassie G-250, 45% de metano y 10% ácido acético glacial) durante 20 min y después se destiñó con una solución 10% de ácido acético y 30% metanol.

- **Transferencia de *western*:** En primer lugar, las muestras se electrotransferieron en semi-seco a una membrana Immobilon-P (*Immobilon transfer Membrane* con un diámetro de poro de 0,45 µm, Millipore), durante 1 h a 200 mA. Después de bloquear la membrana transferida durante toda la noche a 4°C con una solución de TTBS (TBS (150 mM NaCl y 50 mM Tris.HCl pH 7,4), 10% Tween y agua destilada) con un 5% de leche, se hizo una hibridación con el suero de ratón [dilución 1/2000] durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG murino conjugado con HRP [dilución 1/5000]. La detección de las proteínas se hizo con un sistema de quimioluminiscencia usando *ECL Western blotting substrate* (Thermo scientific) y exponiendo las membranas a un *High performance chemiluminescence film* (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) durante tiempos variables.

5.- Análisis estadístico

El comportamiento de las variables fue descrito a través de los parámetros estadísticos: media, desviación estándar (SD), mediana y error estándar de la media (SEM). Para la comparación de los resultados obtenidos entre los grupos inducidos o tratados y sus correspondientes controles se empleó la prueba T de *student*. En el estudio de supervivencia se realizó una curva Kaplan-Meier y se utilizó el método estadístico Log-Rank. El nivel de significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

RESULTADOS

1.- Efecto de los anticuerpos anti- α Gal en la sepsis que se produce en ratones α Gal KO tras realizar CLP

1.1- Estudio farmacodinámico de GAS914 en ratones α Gal KO

Los niveles de anticuerpos IgM e IgG anti- α Gal circulantes en sangre periférica fueron determinados por ELISA en suero de ratones α Gal KO, que producen espontáneamente anticuerpos anti- α Gal al igual que humanos y primates no humanos. Se observaron niveles más altos de anticuerpos en animales de más de 5 meses de edad, tanto machos como hembras, así como variabilidad entre distintos animales. En consecuencia, se seleccionaron aquellos que mostraban niveles más elevados repartiéndose los dos grupos de estudio de tal forma que no hubiera diferencias en los niveles basales de anticuerpos anti- α Gal. Se realizó también un estudio farmacodinámico en ratones machos α Gal KO con la molécula GAS914 (Novartis Pharma AG). GAS914 es un polímero soluble del trisacárido α Gal conjugado a polilisina con un peso molecular aproximadamente de 500 kDa [Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc]. El GAS914 que contiene el tipo II del trisacárido Gal α (1,3)Gal tiene la capacidad de adsorber *in vivo* los anticuerpos anti- α Gal (Katapodis et al., 2002).

Para evaluar la dosis e intervalos más apropiados para conseguir la depleción de anticuerpos anti- α Gal se administró a distintos grupos de animales 1, 2,5, 5 y 10 mg/kg de GAS914, respectivamente, por vía subcutánea con una frecuencia de 3 veces en una semana o 5 mg/kg de GAS914 de peso cada día durante una semana, recibiendo los grupos control PBS con las mismas pautas de inyecciones anteriormente descritas. Los resultados de los niveles de anticuerpos IgM e IgG anti- α Gal circulantes en sangre periférica demostraron que el GAS914, en las dosis mayores o en las pautas de inyecciones diarias, reducía los títulos de anticuerpos anti- α Gal circulantes en sangre hasta niveles no detectables (Fig. 9). En consecuencia se eligió la dosis de 10 mg/kg tres veces por semana para utilizar en los estudios de sepsis.

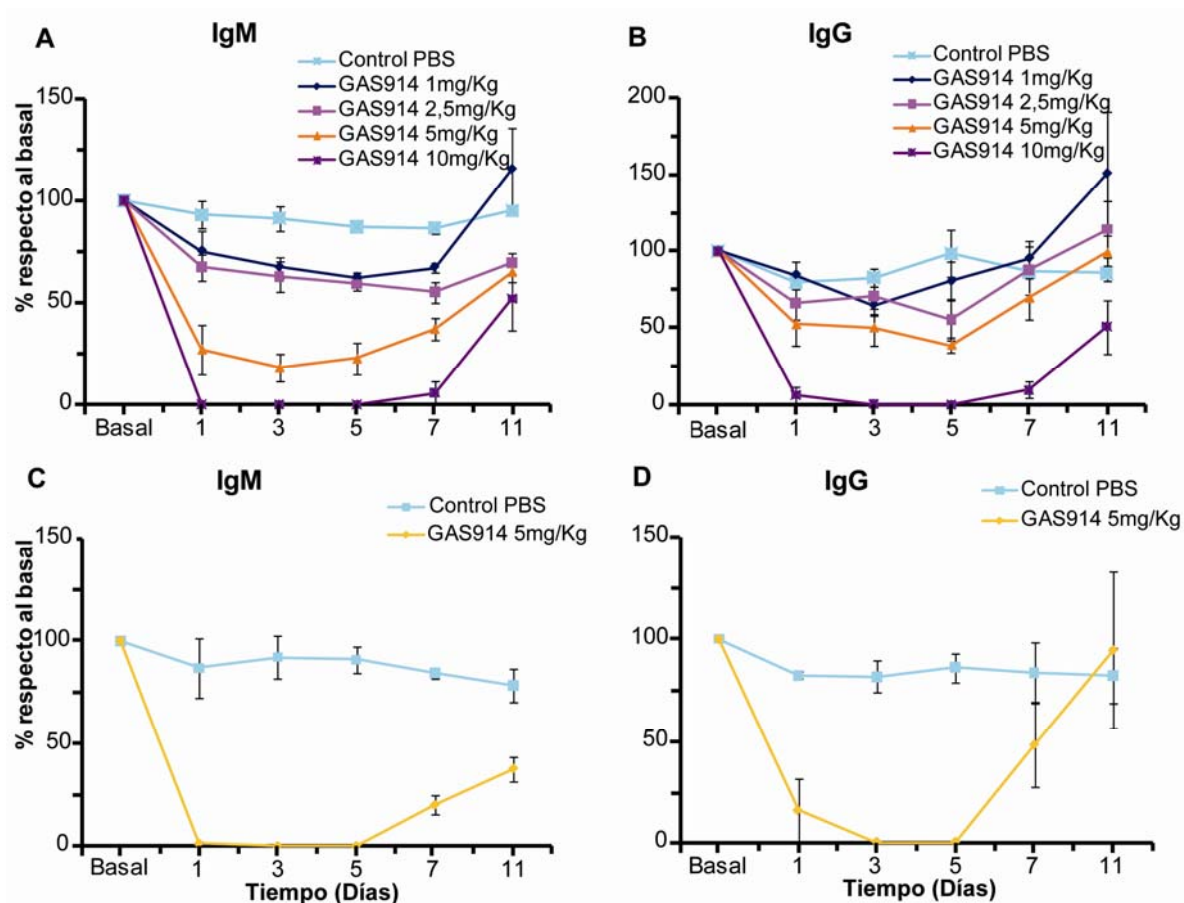


Figura 9. Estudio farmacodinámico de la molécula GAS914 en ratones α Gal KO. Determinación por ELISA de los xenoanticuerpos anti- α Gal (IgM e IgG) en suero de ratones α Gal KO. Se muestra el porcentaje respecto al punto basal de los niveles de xenoanticuerpos (IgM e IgG) en sangre periférica tras 3 inyecciones de GAS914 (A,B) o 5 inyecciones (C,D) durante una semana. El número de animales en los grupos donde se inhiben los xenoanticuerpos con GAS914 fue de 5, mientras que en los grupos controles fue de 3.

1.2- Modelo de sepsis moderada por CLP en ratón α Gal KO

En primer lugar se llevó a cabo una estandarización del modelo de CLP en el ratón α Gal KO con el objetivo de obtener una sepsis moderada ($\sim 60\%$ de mortalidad en la fase aguda, primeros 5 días). Los aspectos que determinan la gravedad de la sepsis son el grosor de la aguja de punción y la cantidad fecal extraída del ciego como fuente de carga bacteriana. A pesar de que la literatura indica que la punción con una aguja 18G y la ligadura de 1 cm de ciego produce en el ratón una sepsis moderada, en nuestro caso la utilización de agujas de 19G, 21G y 25G, con ligadura de 1 cm de ciego comportaron en todos los casos una mortalidad del $\sim 80-90\%$ de los ratones α Gal KO a las 48 h, que se considera una sepsis grave. En el caso del ratón α Gal KO sólo fue posible obtener una sepsis moderada cuando se utilizó una aguja de 30G y la ligadura de ciego a 0,5 cm, por lo que eligieron estas condiciones.

1.3- Impacto de la depleción de los anticuerpos anti- α Gal en la sepsis moderada en ratón α Gal KO

Se investigaron dos protocolos de depleción de anticuerpos anti- α Gal con GAS914 a dosis de 10 mg/kg tres veces por semana en la sepsis de ratón α Gal KO. En el primero la adsorción de anticuerpos se inició en el día -3 de la CLP, y se mantuvo después de la misma (hasta el día 15 post-CLP) (Grupo 1), mientras que el grupo control no recibió GAS914 (Grupo 2). Se incluyeron 17 animales en cada uno de los dos grupos, y los resultados mostraron que la depleción de anticuerpos anti- α Gal se asociaba con una mortalidad del 24%, mientras que en el grupo control fue del 65% ($p=0,01$) (Fig. 10A). Se investigó también la pérdida de peso y grado de bienestar de los animales que se combinaron en un valor numérico, que demostró desde el primer día de la CLP una menor puntuación (menor pérdida de peso y mejor bienestar) en los animales tratados con GAS914 que en el grupo control (Fig. 10B).

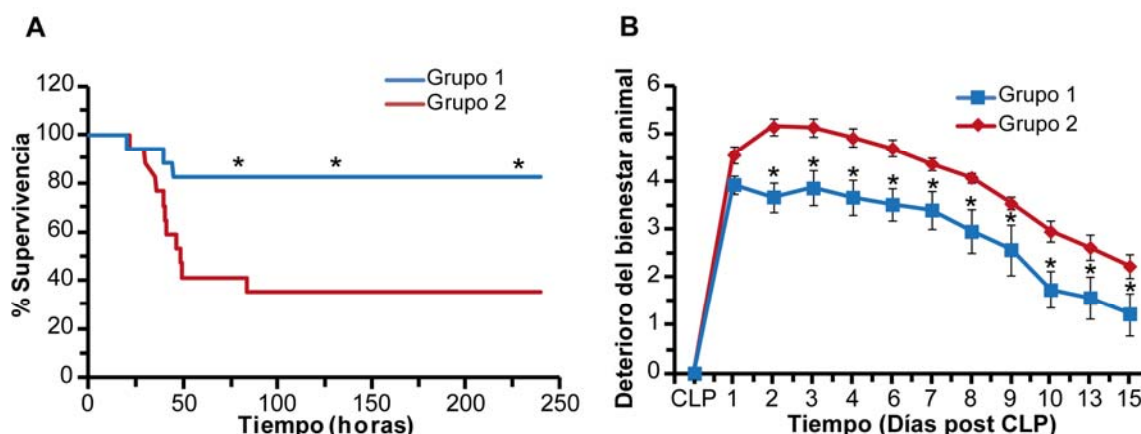


Figura 10. **Depleción de anticuerpos anti- α Gal mediante GAS914 en ratones α Gal KO antes de provocar una sepsis moderada.** A) Supervivencia y B) Cinética del grado deterioro del bienestar animal de los animales tratados con GAS914 (Grupo 1) y control (Grupo 2). Los resultados muestran la media \pm SEM de cada grupo [Grupo 1 y 2 ($n=17$)]. El análisis estadístico se muestra entre el grupo B y su correspondiente control en cada tiempo determinado, $*p < 0,05$.

Los niveles de anticuerpos anti- α Gal IgM e IgG antes del tratamiento con GAS914 no difirieron entre los animales que recibieron este tratamiento y el grupo control (Fig. 11A). Del mismo modo, el nivel basal de anticuerpos anti- α Gal IgM e IgG también fue similar, tanto en los ratones tratados con GAS914 como en los controles, entre los que fallecieron por la sepsis y los que no (Fig. 11B).

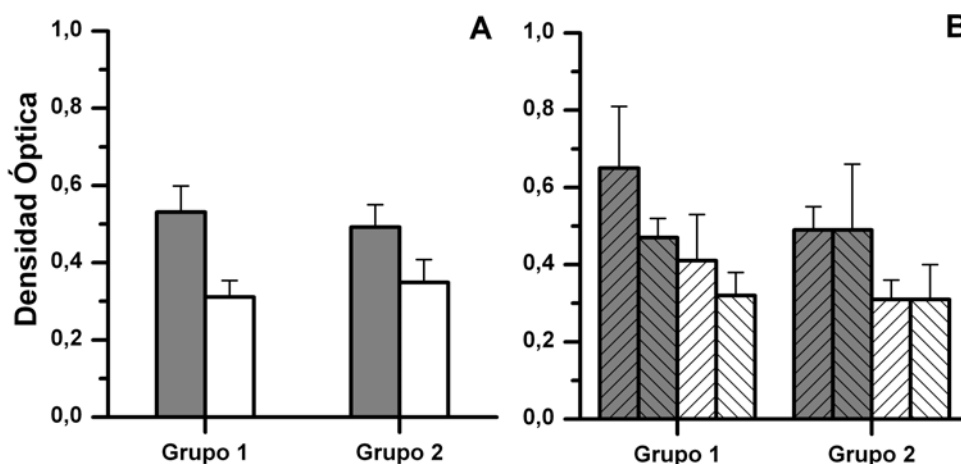


Figura 11. Niveles basales de anticuerpos anti- α Gal en ratones α Gal KO. Determinación por ELISA de los niveles de anticuerpos IgM e IgG anti- α Gal en los animales control (Grupo 1) y tratados con GAS914 10mg/kg (Grupo 2). Los resultados muestran la media \pm SEM de cada grupo [A] ■ IgM, □ IgG (n=17); B) ▨ IgM (n=11), ▩ IgG (n=4) de los animales que mueren; ▤ IgM (n=6), ▥ IgG (n=13) de los animales que sobreviven].

En el segundo protocolo, la depleción de anticuerpos anti- α Gal mediante GAS914 se inició 12 horas después de realizada la CLP (Grupo 4), a las mismas dosis que el primer protocolo, mientras que el grupo control (Grupo 3) no recibió GAS914. Se incluyeron 13 animales en cada grupo, y los resultados mostraron una mortalidad del 62,5% en el grupo 3 y del 54,8% en el grupo 4. La pérdida de peso y bienestar de los animales mostró una mejoría en los tratados con GAS914 en los animales que no murieron que alcanzó diferencias estadísticamente significativas en los días 3, 4, 8 y 9 post-CLP, (Fig. 12). Estos resultados sugieren que los anticuerpos naturales anti- α Gal tienen un efecto negativo en la sepsis causada por enterobacterias de la flora endógena y que su depleción antes de que se produzca la sepsis se asocia con una disminución significativa de la mortalidad.

1.4- Especificidad de la molécula GAS914 frente a xenoanticuerpos anti- α Gal IgM e IgG en ratones α Gal KO mediante *Glycoarray*

Una de las características de los anticuerpos anti-carbohidrato es la polireactividad. Para evaluar el efecto del tratamiento GAS914 se estudió mediante *glycoarray* los niveles de reactividad frente a diferentes antígenos carbohidratos de los xenoanticuerpos presentes en los ratones α Gal KO previo y posterior al tratamiento con GAS914 (Fig. 13A,B respectivamente). En la Tabla 9 se muestran aquellos que mostraron cambios estadísticamente

significativos, con medianas de intensidad de fluorescencia neta superior a 1000, y que incluían únicamente anticuerpos frente a diferentes fragmentos del antígeno α Gal. Estos incluyen Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β (#220, #221), Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β (#222), Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β (#373), Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β (#481) ya sea unidos a los monosacáridos de glucosa o glucosamina, con una disminución de la reactividad entre el 82 y 96 % comparado con el basal.

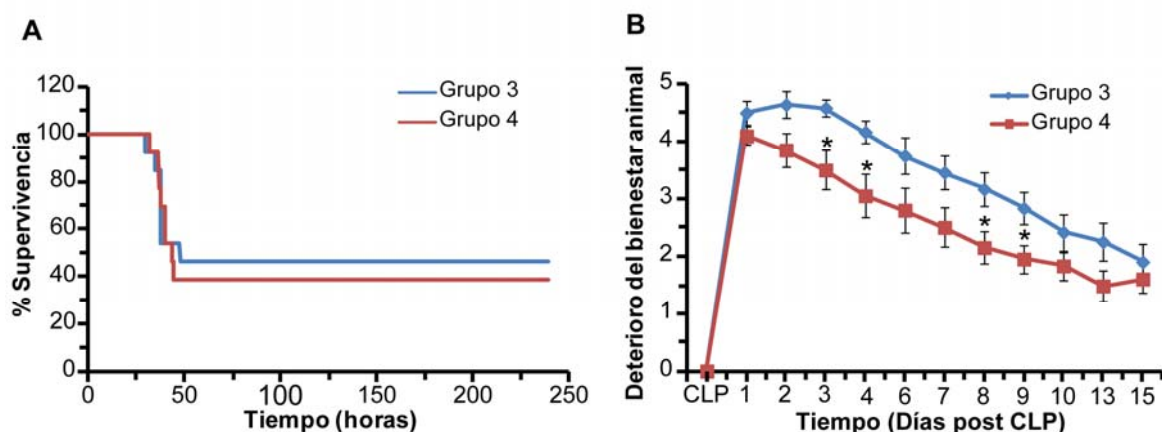


Figura 12. Depleción de anticuerpos anti- α Gal mediante GAS 914 en ratones α Gal KO doce horas después de provocar una sepsis moderada. A) Supervivencia y B) Bienestar de los animales control (Grupo 3) y tratados con GAS914 (Grupo 4). Los resultados muestran la media \pm SEM de cada grupo [Grupo C y D (n=13)]. El análisis estadístico se muestra entre el grupo D y su correspondiente control en cada tiempo determinado, * $p < 0,05$.

2.- Impacto de la estimulación xenogénica en la sepsis que se produce en la rata tras realizar una CLP

El potencial papel deletéreo de los anticuerpos naturales en la sepsis causada por bacterias de la flora endógena también se investigó en un modelo de sepsis en rata. El objetivo era comprobar hasta qué punto era posible reproducir los resultados obtenidos en el ratón α Gal KO en otros modelos animales y analizar las características de los anticuerpos responsables de la reacción. Para ello se eligió un modelo experimental en ratas Lewis, ampliamente utilizado en las investigaciones de xenotrasplante, en el que la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos naturales está muy bien caracterizada.

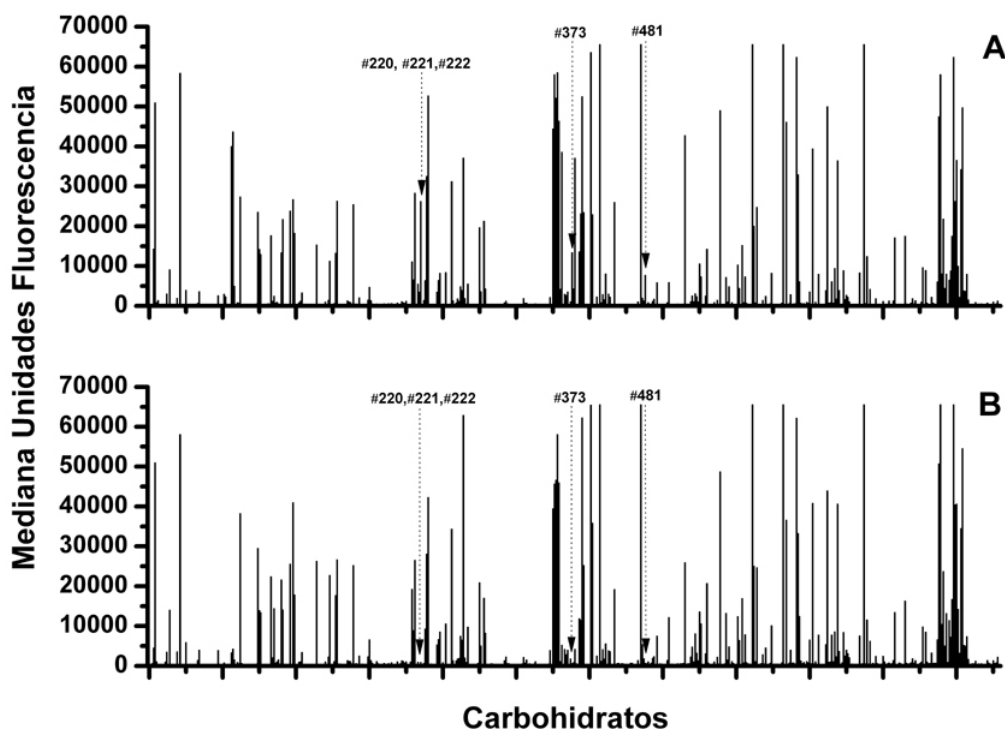


Figura 13. **Reactividad de los anticuerpos anti-carbohidrato en ratones α Gal KO antes y después del tratamiento con GAS914** Patrón de anticuerpos anti-carbohidrato en ratones α Gal KO antes y después del tratamiento con GAS914. Los resultados representan la mediana expresada en unidades netas de fluorescencia (NFU) del grupo 1 (A: Basal; B: día 3, n=4).

Tabla 9. **Cambios de reactividad de anticuerpos frente a carbohidratos causados por GAS914 en ratones α Gal KO.**

Carbohidrato	Basal (NFU)	Día 3 (NFU)	Disminución respecto basal (%).
Gala1-3Galb1-4GlcB-sp2	5495	981	82
Gala1-3Galb1-4GlcB-sp4	3477	479	86
Gala1-3Galb1-4GlcNAcb-sp3	26216	934	96
Gala1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb-sp3	13395	625	95
Gala1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcB-sp4	7693	735	90

2.1- Establecimiento de un modelo de sepsis leve por CLP en rata Lewis

En primer lugar se llevó a cabo una estandarización del modelo de CLP en ratas Lewis con el objetivo de obtener una sepsis leve (~ 15% de mortalidad en la fase aguda, primeros 4 días). Este modelo se considero el más apropiado para investigar un potencial papel deletéreo de los anticuerpos. A partir de los resultados publicados se valoró la utilización de

agujas de 16G, 17G, 18G, con ligadura de 1 cm de ciego. En estas condiciones se obtuvo una mortalidad entre el 60 y 100% de las ratas a las 48 h, dependiendo del tamaño de aguja utilizado, lo que constituye un modelo de sepsis moderada-grave. La producción de una sepsis leve sólo fue posible en ratas Lewis cuando se realizó una doble punción con aguja de 19G y la ligadura de ciego a 1 cm, por lo que este modelo fue el elegido para investigar el impacto de los anticuerpos xenogénicos.

2.2- Impacto de la estimulación xenogénica con sangre de hámster en la sepsis de ratas Lewis

2.2.1- Patrón de xenoanticuerpos en la rata tras la inmunización con sangre de hámster

Los anticuerpos naturales anti-hámster se encuentran normalmente a niveles bajos pero la exposición a los antígenos de hámster hace que aumenten de forma significativa durante los primeros 8 días tras la inmunización. El modelo experimental empleado de ratas Lewis macho se desarrolló a partir de un modelo xenogénico concordante anteriormente utilizado en estudios de xenotrasplante (Brouard et al., 2000; Ginestà et al., 2002). Dado que los patrones de xenoanticuerpos anti-hámster en la rata han sido descritos tras la exposición a distintos tipos de órganos trasplantados, inicialmente se estudió la cinética de producción de anticuerpos IgM e IgG tras inmunización con sangre de hámster. Se investigó el papel del volumen de antígeno mediante inmunizaciones 2 veces por semana durante 5 semanas por vía ip con 1 ml de sangre de hámster (Grupo 1) y 0,5 ml (Grupo 2). Para la determinación de los anticuerpos anti-hámster, se realizaron extracciones semanales de sangre y se determinó por citometría de flujo su reactividad contra linfocitos de hámster con una dilución del 2% de suero. Esta dilución fue previamente establecida tras diferentes pruebas con suero de rata inmunizada que se diluyó al 2%, 0,4% y 0,1% y se determinó la intensidad de fluorescencia.

En relación a los títulos de IgM anti-hámster (Fig. 13A), se observó en ambos grupos un incremento de estos anticuerpos a partir del día 4 de la primera inyección y un pico máximo entre los días 14 y 21. Posteriormente, los títulos de IgM decrecieron hasta prácticamente niveles basales en el día 56. Aunque las curvas/cinéticas de los dos grupos experimentales eran semejantes, los niveles alcanzados por el Grupo 1 (que recibió el doble de sangre que el otro) eran marcadamente más elevados, siendo las diferencias estadísticamente significativas en el día 21.

La determinación de IgG confirmó también una respuesta de anticuerpos anti-hámster del isotipo IgG (Fig. 13B), pero la reactividad se detectó a partir del día 7 y el pico máximo se observó más tardíamente en el día 42. Ambos grupos experimentales mostraron una cinética y títulos de IgG muy semejantes, con una tendencia del grupo 1 a un aumento más temprano de los anticuerpos IgG respecto al grupo 2, y mostrando diferencias estadísticamente significativas en el día 14.

Teniendo en cuenta estos resultados, se diseñaron dos regímenes diferentes de inyecciones de 1 ml de sangre de hámster con el fin de obtener dos patrones de inmunización distintos, un grupo en el que se favorecía la inducción de IgG y otro de IgM. Como se ha indicado el patrón de anticuerpos asociado con la producción predominante de IgM se considera que mantiene las mismas características de los anticuerpos naturales independientes de las células T, mientras que el predominio de anticuerpos IgG ya incluye anticuerpos con mutaciones somáticas dependientes de las células T. Para inducir el patrón predominante de anticuerpos IgM se inmunizaron los animales con 3 inyecciones de sangre de hámster en una semana (días alternos) (Grupo SH d.a.), mientras que para inducir IgG los animales se inmunizaron con 3 inyecciones a intervalos de dos semanas (Grupo SH s.a.). Se establecieron grupos control para cada uno de los protocolos que recibieron inyecciones de PBS con la misma frecuencia.

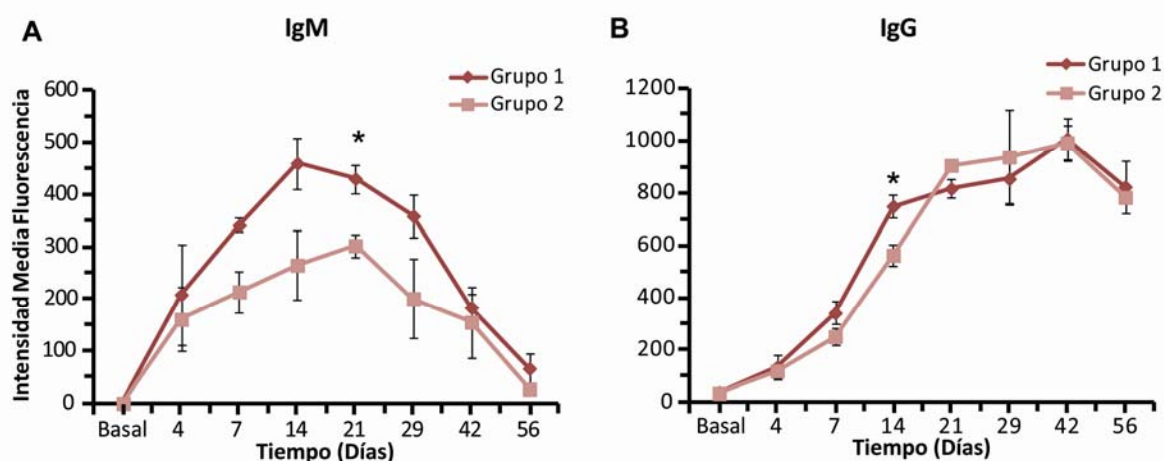


Figura 13. Cinética de xenoanticuerpos anti-hámster IgM e IgG en ratas Lewis inmunizadas con distintos volúmenes de sangre de hámster. Determinación por citometría de flujo de los xenoanticuerpos anti-hámster inducidos mediante inyección de 1 ml de sangre de hámster (Grupo 1) o 0,5 ml de sangre (Grupo 2). Los resultados presentan la media de la intensidad media de fluorescencia \pm SEM de cada grupo (n=3). La estadística representada compara las medias de los dos grupos en cada intervalo de tiempo, *p < 0,05.

Para hacer la determinación de los niveles de anticuerpos anti-hámster (IgM e IgG), se obtuvieron muestras de suero en el punto basal y tras iniciar la inmunización en los días 5, 8 y 20 para el grupo SH d.a., y sus respectivos controles, y en el punto basal, 28, 40, y 55 días para los animales del grupos SH s.a., y sus controles. Los patrones obtenidos se muestran en la figura 14. Los anticuerpos IgM alcanzaron su nivel más alto inmediatamente después de las inmunizaciones y decrecieron posteriormente. Por el contrario, los anticuerpos IgG lo hicieron entre los días 28 y 40 después de iniciadas las mismas. Este pico de IgG sólo se determinó en el grupo SH s.a. ya que en el SH d.a. no se pudo valorar pues se terminó el experimento en el día 20. Los grupos controles siempre mostraron reactividades semejantes a las de los valores basales. La comparación de los niveles de anticuerpos anti-hámster de los grupos inmunizados y los controles fue estadísticamente significativa en todos los tiempos evaluados con excepción de los basales). Comparando los tipos de inmunización, el grupo SH d.a. mostró títulos de IgM, aproximadamente 2 veces más que el grupo SH s.a. (Fig. 14A,B) y niveles de IgG que eran la mitad de las IgM a los 5 días tras la primera inyección (Fig. 6A). Por el contrario, el grupo SH s.a. mostró niveles menores de IgM (Fig. 14B) y los títulos más altos de IgG, 4 veces más que el grupo SH d.a., tras 40 días de la primera inyección (Fig. 14B).

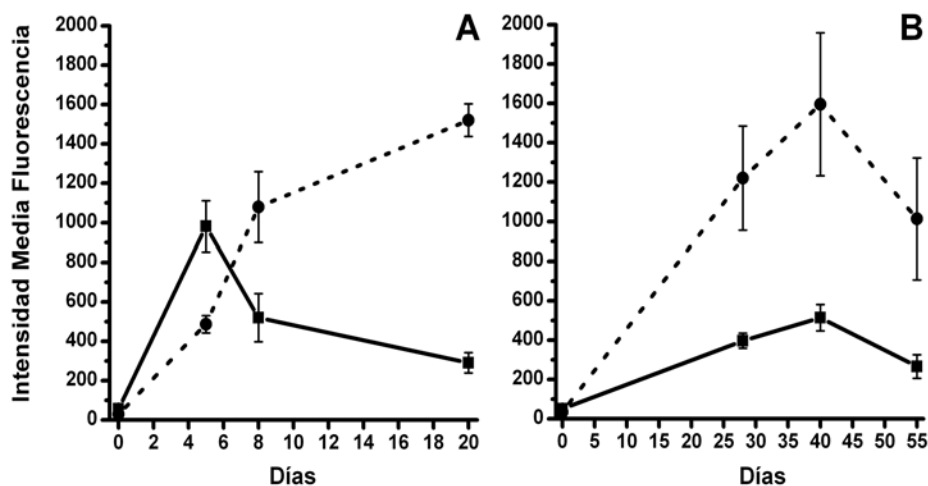


Figura 14. Cinética de xenoanticuerpos anti-hámster IgM e IgG en ratas Lewis inyectadas con sangre de hámster. Determinación por citometría de flujo de los xenoanticuerpos. A: SH d.a., B: SH s.a.; ■ IgM, ● IgG). Los resultados muestran la intensidad media de fluorescencia \pm SEM de cada grupo [SH d.a. (n=4), SH s.a. (n=4)].

2.2.2- Supervivencia, bienestar y peso de ratas Lewis tras xenoinmunización con sangre de hámster y/o sepsis

Una vez inducidos los xenoanticuerpos, se realizó la CLP de los animales de los grupos SH d.a. y SH s.a. (en los días 5 y 40 tras iniciar la inmunización respectivamente) y sus grupos controles. Tras la CLP, el grupo SH s.a. mostró una supervivencia idéntica (100%) al grupo control hasta los 15 días posteriores a la CLP (Fig. 15A). La supervivencia a los 15 días en el grupo SH d.a. fue del 52,9%, significativamente inferior el 88,2% la del grupo control (Fig. 15B). El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambos grupos a partir de las 16 horas post-CLP hasta el final del estudio a los 15 días.

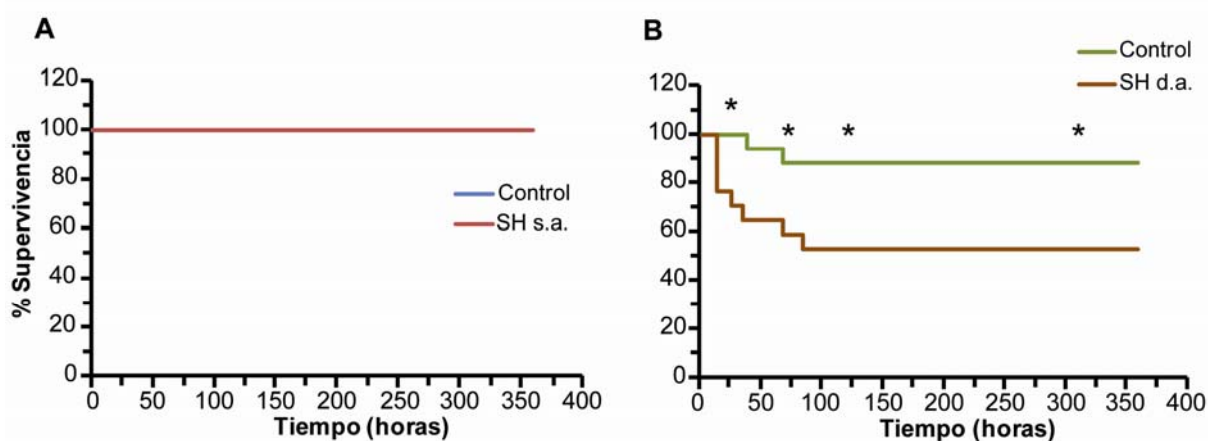


Figura 15. **Supervivencia en el modelo de CLP poco severo en ratas Lewis inyectadas con sangre de hámster.** Se muestran los resultados de los grupos SH s.a. (A) y SH d.a. (B) con sus respectivos controles. Porcentaje de supervivencia tras la CLP de cada grupo [Control (n=8) y SH s.a. (n=9); Control y SH d.a. (n=17)]. Al comparar cada grupo con su control, únicamente se observaron diferencias significativas en los porcentajes de supervivencia de las ratas del grupo SH d.a. respecto a su control, $*p < 0,05$.

En los primeros días de sepsis, los animales disminuyeron hasta un 13% de su peso corporal (respecto al día de la cirugía) sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos inmunizados y sus controles (Fig. 16A,B). A partir de los 7 días posteriores a la CLP, los animales que sobrevivieron comenzaron a recuperar progresivamente su peso en todos los grupos estudiados. Los protocolos de inyecciones de sangre de hámster en ratas Lewis produjeron cambios en el peso corporal en el momento de la CLP en el grupo SH d.a. pero no en el SH s.a. (Fig. 16A,B). En los animales control del grupo SH d.a. el peso aumentó una media del 9% en los 6 días tras la primera inyección con PBS, mientras que en los animales inmunizados la media de aumento fue del 0,68% ($p < 0,005$)

(Fig. 16B). Esta falta de aumento de peso antes de la CLP fue a expensas de los 8 animales que murieron tras la CLP (SH d.a.m.; ganancia de peso 0,28%), mientras que en los 14 que sobrevivieron (SH d.a.v.) el aumento de peso durante la inmunización fue del 6,6% ($p < 0,05$) (Fig. 17). La variación de peso en estos últimos animales no mostró diferencias significativas con el grupo control. Por otro lado el protocolo de inyecciones de sangre de hámster (días alternos) en ratas Lewis no produjo cambios en los niveles de xenoanticuerpos anti-hámster en el momento de la CLP entre los aquellos animales que sobreviven (SH d.a.v.) o mueren (SH d.a.m.) tras realizada la CLP (Fig. 18).

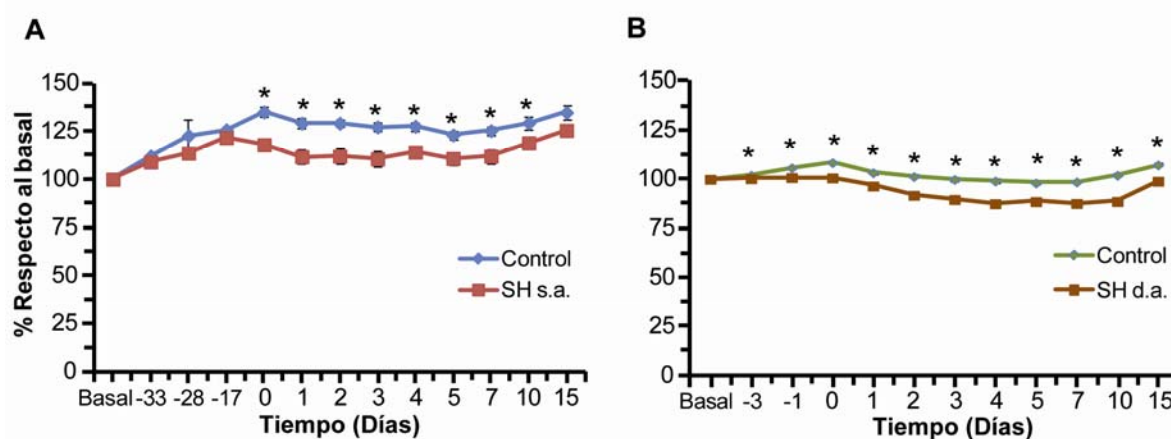


Figura 16. **Peso corporal en el modelo de CLP poco severo en ratas Lewis inyectadas con sangre de hámster.** Se muestran los resultados de las cinéticas de peso corporal de los grupos SH s.a. (A) y SH d.a. (B) con sus respectivos controles. Los resultados se presentan mediante el porcentaje respecto al basal \pm SEM de cada grupo [Control (n=8) y SH s.a. (n=9); Control y SH d.a. (n=17)]. Se muestran comparaciones estadísticas entre los grupos inmunizados y sus correspondientes controles en cada tiempo determinado, * $p < 0,05$.

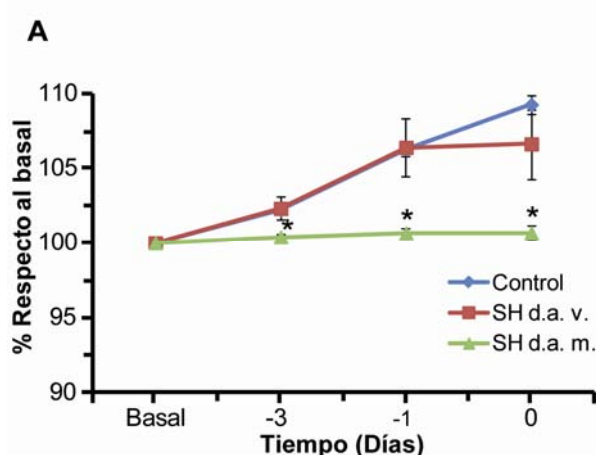


Figura 17. **Peso corporal en el modelo de CLP poco severo en ratas Lewis inyectadas con sangre de hámster.** Se muestran los resultados de las cinéticas de peso corporal de los grupos SH d.a. y con su respectivo control durante la inmunización con sangre xenogénica. Los resultados se presentan mediante el porcentaje respecto al basal \pm SEM de cada grupo [Control (n=12), SH d.a.v. (n=12) y SH d.a.m. (n=6)].

El grado de bienestar animal tras la CLP se determinó diariamente durante los primeros 5 días y a continuación en los días 7, 10 y 15. Es importante resaltar que este indicador no incluye la mortalidad y por tanto describe únicamente el estado de los animales vivos. Tras la CLP, el grupo SH s.a. mostró un perfil similar a su grupo control en el grado de bienestar (Fig. 19A). El grado de bienestar alcanzó valores medios máximos entre 2 y 3 (mayor deterioro) en los primeros 5 días tras la CLP, para luego volver paulatinamente a la normalidad. En el grupo SH d.a. se observó un deterioro del grado de bienestar durante las primeras 72 horas superior al de su grupo control (Fig. 19B), si bien esta diferencia no era significativa.

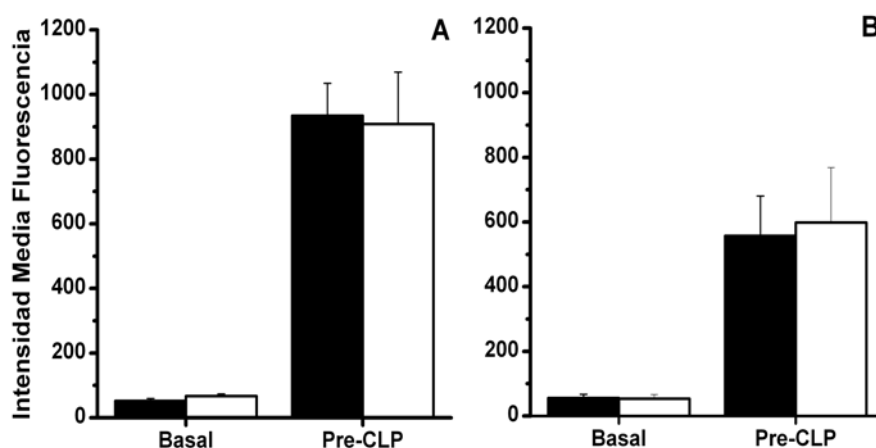


Figura 18. **Cinética de xenoanticuerpos anti-hámster IgM e IgG en ratas Lewis inyectadas con sangre de hámster.** Determinación por citometría de flujo de los xenoanticuerpos. A: IgM, B: IgG; ■ SH d.a.v., □ SH d.a.m.). Los resultados muestran la intensidad media de fluorescencia \pm SEM de cada grupo [SH d.a.v. (n=14), SH s.a.m. (n=8)]

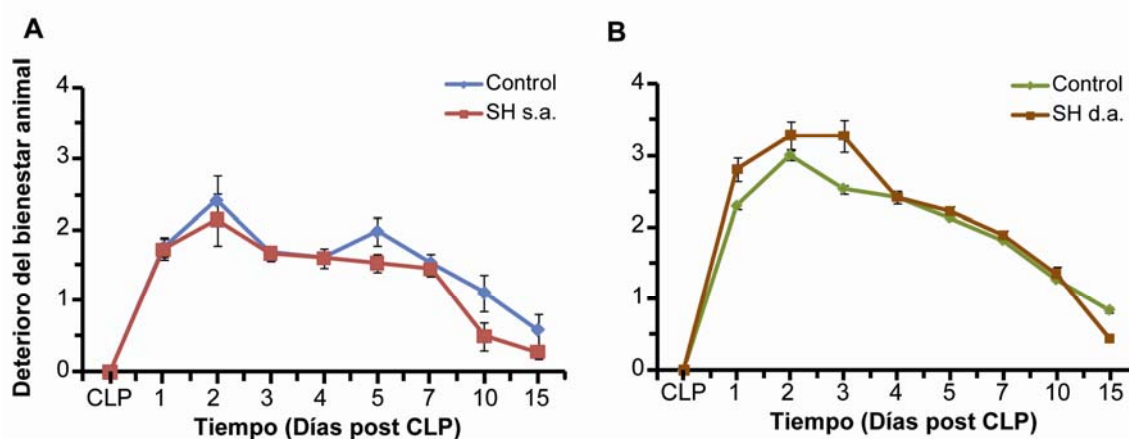


Figura 19. **Bienestar animal en el modelo de CLP poco severo en ratas Lewis inyectadas con sangre de hámster.** Se muestran los resultados del grado de bienestar animal (según tabla 2 de Materiales y Métodos) de los grupos SH s.a. (A) y SH d.a. (B) con sus respectivos controles. Los resultados se presentan mediante la media \pm SEM de cada grupo [Control (n=8) y SH s.a. (n=9); Control y SH d.a. (n=17)].

2.2.3- Análisis hematológico y bioquímico de la xenoinmunización con sangre de hámster y/o sepsis en ratas Lewis

La caracterización hematológica de las muestras de sangre de rata se resume en la Tabla 10 donde únicamente se presentan los recuentos de las distintas poblaciones leucocitarias. Las determinaciones relacionadas con otros elementos sanguíneos como eritrocitos y plaquetas no se incluyen pues no se observaron variaciones relevantes. En el análisis hematológico de los grupos SH s.a. y su control, no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos con la inmunización. Por el contrario, el estudio hematológico reflejó diferencias estadísticamente significativas en el grupo SH d.a. respecto a su grupo control tras las 3 inyecciones de sangre (Pre-CLP, día 5). En este punto, el grupo SH d.a. mostró un aumento significativo de los leucocitos totales, neutrófilos, monocitos ($p < 0,05$). A las 48 horas de la CLP se produjo un aumento de leucocitos y neutrófilos en todos los grupos estudiados no mostrando diferencias significativas entre los grupos inmunizados (SH d.a. y SH s.a.) y controles. Hay que tener en cuenta que el 35% ratas en el grupo SH d.a. desarrollaron un cuadro grave y habían muerto antes de la determinación de las 48 horas. Por otro lado, en el grupo SH d.a. no se observaron diferencias en los parámetros hematológicos en el punto Pre-CLP entre las ratas Lewis que fallecieron tras las sepsis y las que no.

Tabla 10. Análisis hematológico de la xenoinmunización con sangre de hámster y/o sepsis en ratas Lewis. Los resultados representan la media \pm SEM de cada grupo [Control y SH s.a. (n=4-5); Control (n=9) y SH d.a. (n=13)]. Sólo se muestran comparaciones estadísticas entre los grupos inmunizados y sus correspondientes controles en cada tiempo determinado, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$.

Tiempo	Grupos	Leucocitos totales ($\times 10^3$ cells/ μ l)	Neutrófilos ($\times 10^3$ cells/ μ l)	Linfocitos ($\times 10^3$ cells/ μ l)	Monocitos ($\times 10^3$ cells/ μ l)	Eosinófilos ($\times 10^3$ cells/ μ l)	Basófilos ($\times 10^3$ cells/ μ l)	Células no teñidas ($\times 10^3$ cells/ μ l)
Basal	Ctrl. y SH s.a.	9,11 \pm 0,24	1,50 \pm 0,12	7,08 \pm 0,15	0,20 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01
pre CLP	Ctrl.	11,39 \pm 0,54	1,87 \pm 0,23	8,76 \pm 0,34	0,38 \pm 0,02	0,10 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,17 \pm 0,03
	SH s.a.	11,45 \pm 0,59	1,68 \pm 0,03	9,09 \pm 0,53	0,34 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01*	0,13 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01
48h postCLP	Ctrl.	7,55 \pm 0,98	2,13 \pm 0,34	4,63 \pm 0,69	0,31 \pm 0,07	0,06 \pm 0,02	0,09 \pm 0,03	0,33 \pm 0,11
	SH s.a.	10,27 \pm 1,17	3,19 \pm 0,73	6,02 \pm 0,54	0,36 \pm 0,06	0,09 \pm 0,04	0,07 \pm 0,02	0,53 \pm 0,17
Basal	Ctrl.	12,47 \pm 0,49	2,03 \pm 0,14	9,20 \pm 0,38	0,45 \pm 0,04	0,08 \pm 0,01	0,23 \pm 0,03	0,49 \pm 0,10
	SH d.a.	11,89 \pm 0,54	2,22 \pm 0,21	8,42 \pm 0,31	0,41 \pm 0,03	0,09 \pm 0,01	0,19 \pm 0,02	0,33 \pm 0,05
preCLP	Ctrl.	11,14 \pm 0,21	1,93 \pm 0,12	8,28 \pm 0,23	0,43 \pm 0,05	0,09 \pm 0,01	0,19 \pm 0,02	0,22 \pm 0,03
	SH d.a.	15,16 \pm 0,89**	5,21 \pm 0,66**	8,36 \pm 0,61	0,60 \pm 0,06*	0,09 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,67 \pm 0,13*
48h postCLP	Ctrl.	9,87 \pm 1,01	2,49 \pm 0,19	5,72 \pm 0,63	0,25 \pm 0,06	0,04 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	1,23 \pm 0,23
	SH d.a.	12,57 \pm 1,49	3,20 \pm 0,45	7,54 \pm 0,92	0,35 \pm 0,05	0,05 \pm 0,01	0,21 \pm 0,03	1,23 \pm 0,23

El estudio bioquímico mostró una disminución de la glucosa y triglicéridos similares en todos los grupos tras la CLP comparado con los valores basales. Para estos parámetros, se observaron diferencias significativas entre el grupo inmunizado SH s.a. y su control a nivel de la glucemia en el momento de pre-CLP (Tabla 11). Los triglicéridos mostraban una tendencia similar en este grupo, pero sin alcanzar significación. En el caso del grupo SH d.a., se detectó una disminución significativa de los triglicéridos y de la urea respecto a su grupo control tras la inmunización (pre-CLP). El resto de parámetros bioquímicos estudiados no mostraron cambios significativos ni con la inmunización xenogénica ni con la sepsis, ni en el grupo de ratas SH d.a. en el punto Pre-CLP entre las que fallecieron y las que no lo hicieron, por lo que las alteraciones fueron mínimas en ambos procesos y no parecen responsables de la mortalidad observada en el 47% de las ratas del grupo SH d.a. (Tabla 11).

Tabla 11. **Análisis bioquímico de la xenoinmunización con sangre de hámster y/o sepsis en ratas Lewis.** Los resultados representan la media \pm SEM de cada grupo [Control (n=8) y SH s.a. (n=9); Control (n=9) y SH d.a. (n=13)]. Sólo se muestran comparaciones estadísticas entre los grupos inmunizados y sus correspondientes controles en cada tiempo determinado, *p < 0,05.

Tiempo	Grupos	Glucosa (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	ALT (UI/L)	ALP (UI/L)	Urea (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Basal	Ctrl.	181,44 \pm 9,07	131,86 \pm 8,95	47,13 \pm 4,12	269,65 \pm 21,06	29,50 \pm 1,40	0,49 \pm 0,01
	SH s.a.	191,62 \pm 10,22	153,11 \pm 23,37	54,22 \pm 3,62	275,31 \pm 20,37	27,96 \pm 1,26	0,46 \pm 0,01
preCLP	Ctrl.	170,72 \pm 3,47	163,60 \pm 21,44	57,40 \pm 3,06	249,46 \pm 7,32	33,58 \pm 1,96	0,52 \pm 0,05
	SH s.a.	136,02 \pm 8,59*	140,00 \pm 14,57	79,00 \pm 12,23	276,83 \pm 12,68	29,16 \pm 0,67	0,45 \pm 0,01
48h postCLP	Ctrl.	143,16 \pm 5,21	53,36 \pm 2,31	42,00 \pm 2,60	282,98 \pm 27,40	31,83 \pm 1,91	0,48 \pm 0,01
	SH s.a.	134,67 \pm 23,54	56,89 \pm 5,68	34,44 \pm 1,68*	235,88 \pm 41,13	29,53 \pm 1,43	0,46 \pm 0,01
15d postCLP	Ctrl.	131,70 \pm 8,01	117,88 \pm 13,34	63,88 \pm 3,26	274,24 \pm 41,48	28,06 \pm 0,86	0,51 \pm 0,03
	SH s.a.	129,91 \pm 9,94	116,00 \pm 7,18	62,56 \pm 2,64	275,44 \pm 37,26	25,41 \pm 0,74*	0,45 \pm 0,00
					AST (UI/L)		
Basal	Ctrl.	168,04 \pm 8,05	163,11 \pm 7,97	42,11 \pm 2,39	89,89 \pm 3,23	23,81 \pm 1,00	0,43 \pm 0,01
	SH d.a.	180,85 \pm 3,56	163,23 \pm 13,02	47,85 \pm 3,57	80,46 \pm 3,01	25,85 \pm 0,76	0,42 \pm 0,01
preCLP	Ctrl.	171,72 \pm 4,77	179,00 \pm 13,22	54,33 \pm 3,56	86,78 \pm 3,54	28,79 \pm 0,50	0,44 \pm 0,01
	SH d.a.	173,98 \pm 7,20	130,91 \pm 10,68*	58,36 \pm 2,11	98,55 \pm 5,41	25,24 \pm 0,65*	0,46 \pm 0,03
48h postCLP	Ctrl.	137,99 \pm 9,20	83,25 \pm 9,31	28,88 \pm 1,53	149,75 \pm 9,27	36,28 \pm 1,93	0,49 \pm 0,01
	SH d.a.	129,61 \pm 9,92	86,50 \pm 8,77	25,00 \pm 4,42	139,38 \pm 10,98	35,39 \pm 3,06	0,48 \pm 0,02
15d postCLP	Ctrl.	154,17 \pm 13,12	132,14 \pm 10,93	59,14 \pm 5,05	94,43 \pm 9,13	20,41 \pm 1,38	0,42 \pm 0,01
	SH d.a.	171,13 \pm 5,90	134,86 \pm 18,95	56,29 \pm 1,63	84,00 \pm 2,23	20,26 \pm 0,53	0,40 \pm 0,01

2.2.4- Análisis de citocinas en la xenoinmunización con sangre de hámster y/o sepsis en ratas Lewis

Con el objetivo de caracterizar mejor la respuesta inflamatoria e antiinflamatoria durante la inmunización xenogénica con sangre de hámster en el protocolo SH d.a. y durante la sepsis,

se investigó mediante *arrays* el patrón de 34 citocinas generado en los distintos modelos. Los niveles basales de citocinas fueron similares en el grupo control y en las ratas inmunizadas con sangre de hámster, tanto si fallecieron tras la CLP como si no los hicieron, para 33 de las citocinas estudiadas. La excepción fue la L-Selectina que mostró unos niveles basales estadísticamente inferiores ($p < 0.05$) en los animales inmunizados que posteriormente murieron tras la CLP comparados con los que no hicieron, y con una tendencia a la significación estadística ($p < 0.1$) con respecto al grupo control.

En el grupo control, la sepsis a las 48 h de la CLP se caracterizó por el aumento de 8 citocinas (24%), que no fue significativo en ningún caso; la disminución de 19 (56%), que fue estadísticamente significativa en 6 (CINC-3, IL1-R6, IL13, LIX, prolactina R y VEGF), y la ausencia de cambios en 7 (20%) (Fig. 20). La xenoinmunización con sangre de hámster en las ratas del grupo SH d.a. que no murieron por la sepsis, se asoció en la pre-CLP en comparación con los niveles basales con el aumento de 4 (12%) citocinas, que fue significativo para una de ellas (TIMP-1), una disminución de 29 (85%), estadísticamente significativa en 7 (γ -IFN, IL-1 β , IL-1 R6, LIX, L-Selectina, MMP8 y TNF- α), y no mostró cambios en 1 (3%) (Fig. 20). A las 48 h de la CLP, este grupo de animales mostró aumentos de las 34 linfocinas estudiadas en comparación con la pre-CLP, que fueron estadísticamente significativos para 4 de ellas (CINC-2 α , ICAM-1, LIX, y TIMP-1) (Fig. 20). Los animales xenoinmunizados del grupo SH d.a. que murieron, evidenciaron en el momento pre-CLP el aumento de 17 citocinas (50%), que fue estadísticamente significativo en 2 de ellas (leptina, y TIMP-1), la disminución de 12 (35%) que no fue significativa para ninguna de ellas, y no presentaron cambios 5 (15%) de las citocinas. Además, la leptina fue la única citocina que mostró diferencias estadísticamente significativas tras la inmunización con sangre de hámster en la pre-CLP entre las ratas que murieron tras la CLP y las que no lo hicieron (Fig. 20).

Estos resultados sugieren que la sepsis leve inducida por CLP en ratas Lewis se asocia con la disminución de numerosas citocinas, similar a la que tiene lugar en la tolerancia a la endotoxina. Nuestros resultados también demuestran que la xenoinmunización con SH d.a. puede conducir en algunos casos a una disminución de la mayoría de citocinas en el momento de la CLP. Este patrón de respuesta se asocia con la supervivencia del animal tras la CLP. Sin embargo, en otras ocasiones, con el mismo protocolo de xenoinmunización, la disminución mayoritaria de citocinas no está presente y aumenta significativamente la leptina lo que se asocia con una mortalidad precoz con la sepsis. Los animales que mueren se caracterizan por presentar niveles disminuidos de L-selectina antes de ninguna manipulación

y elevados de leptina en el momento pre-CLP, que podrían explicar la pérdida de peso observada en los animales.

2.2.5- Estudio microbiológico de la sepsis en rata Lewis

La investigación de bacteriemia a las 48 h posteriores a la CLP en las ratas que no fallecieron por la sepsis, utilizando métodos de cultivo estandarizados, mostró el aislamiento de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*) y Gram positivas (*Enterococcus faecalis*), en el 33% de los animales estudiados (Tabla 12). Además, se llevaron a cabo algunos cultivos controles con sangre tomada antes de la CLP que demostraron la ausencia de enterobacterias en la sangre de estos mismos animales.

Tabla 12. **Bacterias aisladas en sangre periférica de ratas Lewis tras 48 h de ser inducida la sepsis por CLP.**

Número de animales	Aislamiento de colonias	Gérmenes
12	4 (33%)	<i>Escherichia coli</i> (n=2) <i>Enterococcus faecalis</i> (n=2)

2.3- Impacto de la inmunización xenogénica con sangre de cerdo en la sepsis de ratas Lewis

También se investigó el impacto en la sepsis de ratas Lewis tras CLP de la inmunización xenogénica con especies alejadas en la escala filogenética como la porcina. El motivo es que se ha demostrado la existencia de reacción cruzada de xenoanticuerpos con especies próximas en la escala filogenética cuando el responsable de la inmunización también lo era. Así, los xenoanticuerpos generados en ratas Lewis con injertos de hámster reconocen, además de las células hámster, células de ratón (Chong et al., 2000). Esto hace posible que el efecto deletéreo de la inmunización con sangre de hámster en ratas Lewis sólo tenga lugar con especies próximas en la escala filogenética y no con las alejadas.

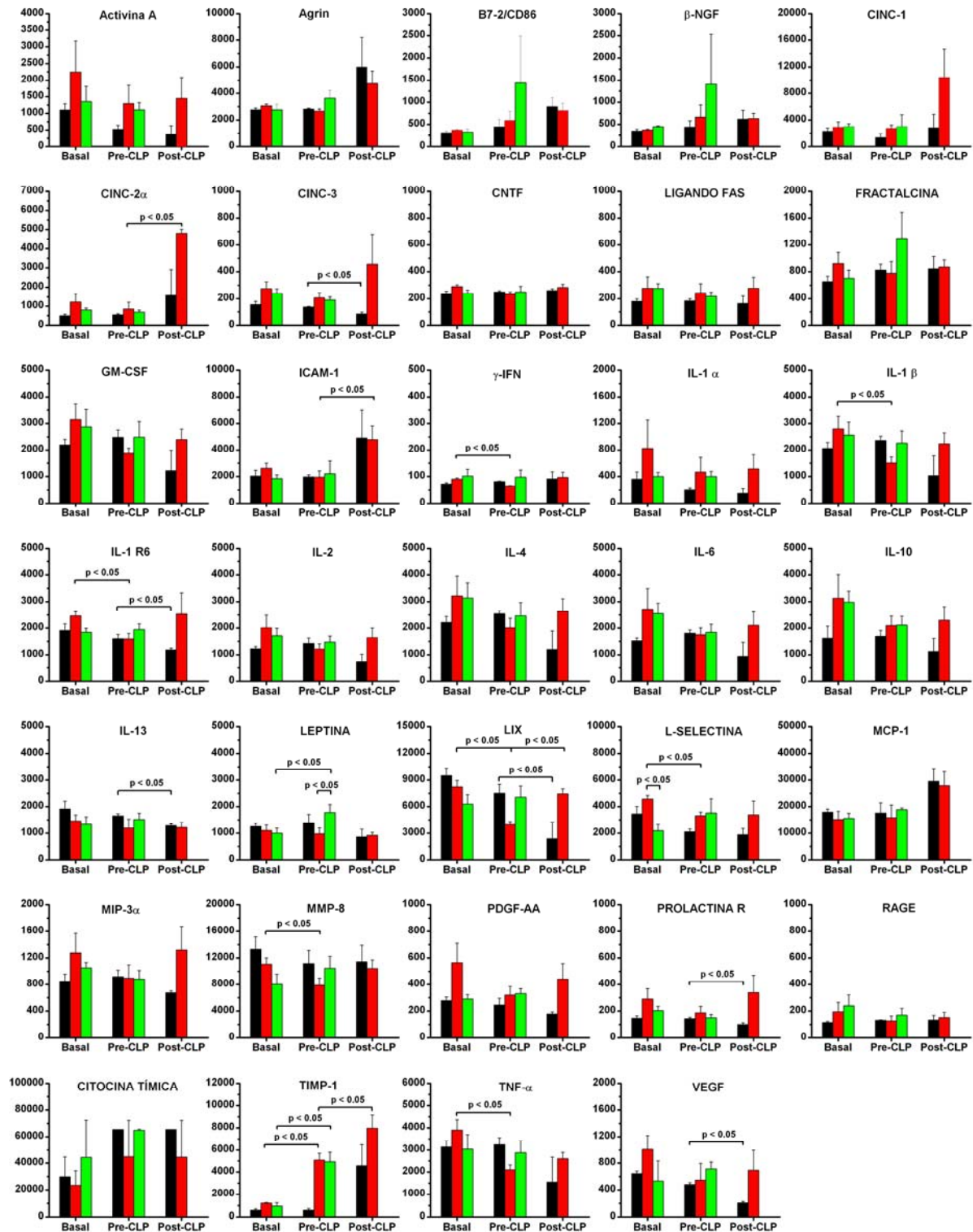


Figura 20. Patrón de expresión de citoquinas de las ratas Lewis inyectadas con sangre de hámster en el modelo de CLP poco severo. Determinación por *microarray* de los patrones de expresión de citoquinas en el grupo SH d.a. sujeto al régimen de inducción de IgM y su correspondiente grupo control. Los resultados representan la mediana de cada grupo [■ Control, ■ SH d.a.v. ■ SH d.a.m. mortalidad (n=3)].

2.3.1- Patrón de xenoanticuerpos en la rata tras la inmunización con sangre de cerdo

Los mismos protocolo de inmunización utilizados con sangre de hámster (3 inyecciones cada dos semanas y a días alternos) para generar anticuerpos anti-hámster IgG e IgM, se utilizaron con 1 ml de sangre de cerdo ip. Los xenoanticuerpos anti-cerdo se determinaron mediante citometría de flujo utilizando linfocitos de cerdo a una concentración de 1×10^6 células por cada muestra. El patrón de xenoanticuerpos inducidos anti-cerdo fue similar a los anti-hámster, aunque en este caso el pico de anticuerpos IgG en grupo SH s.a. se observó en el día 55 (2 veces el generado en grupo SH d.a.), en lugar del día 40 (1,5 veces el generado en el grupo SH d.a.) (Fig. 21). El pico de IgM se observó también en el día 5 en el grupo SH d.a., siendo mínimos los cambios observados de este isotipo de Ig en el grupo SH s.a. (Fig. 21).

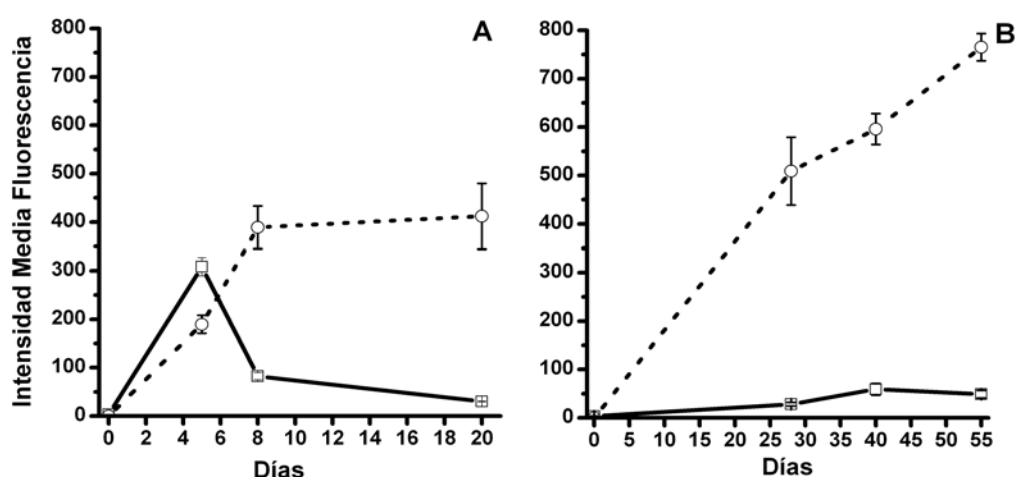


Figura 21. **Cinética de títulos de xenoanticuerpos anti-cerdo IgM e IgG en ratas Lewis inmunizadas con sangre de cerdo.** Determinación por citometría de flujo de los xenoanticuerpos anti-cerdo (C: SC d.a., D: SC s.a.; □ IgM, ○ IgG). Los resultados muestran la intensidad media de fluorescencia \pm SEM de cada grupo [SC d.a. (n=3), SC s.a. (n=3)].

2.3.2- Supervivencia y consecuencias de la xenoimmunización con sangre de cerdo y sepsis en ratas Lewis

Una vez inducidos los xenoanticuerpos, se realizó la CLP de los animales del grupo SC d.a. (en el día 5 tras iniciar la inmunización) y su grupo control. La supervivencia a los 15 días en el grupo SC d.a. fue del 60%, inferior el 88,2% la del grupo control (Fig. 22A), aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. En los primeros días de sepsis, los animales disminuyeron hasta un 17% de su peso corporal (respecto al día de la

cirugía) sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre el grupo inmunizado y su control (Fig. 22B). A partir de los 5 días posteriores a la CLP, los animales que sobrevivieron comenzaron a recuperar progresivamente su peso en ambos grupos. El protocolo de inyección de sangre de cerdo en ratas Lewis no produjo cambios significativos en el peso corporal de los animales del grupo SC d.a. en el momento de la CLP respecto a su grupo control (Fig. 22B), a diferencia de lo observado en el grupo SH d.a..

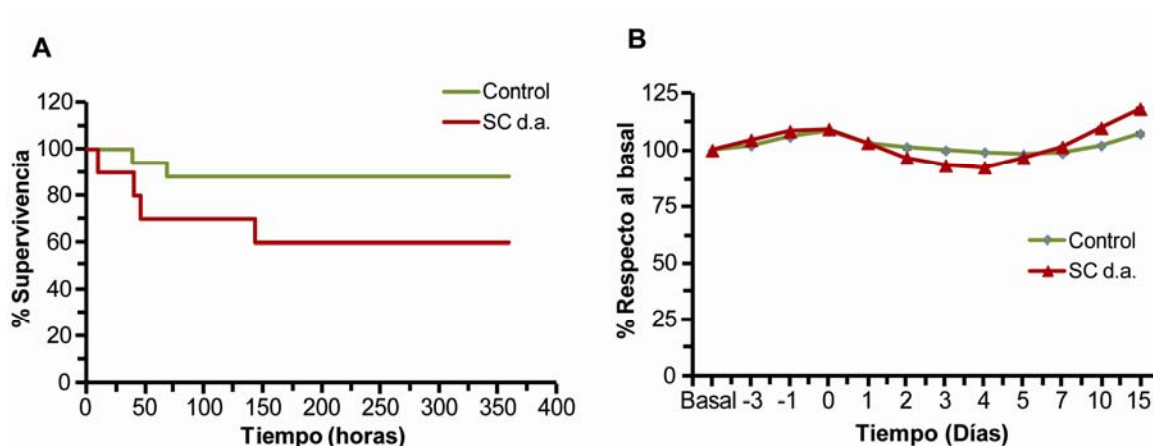


Figura 22. **Supervivencia y cinética del peso corporal en el modelo de CLP poco severo en ratas Lewis inyectadas con sangre de cerdo.** A) Porcentaje de supervivencia tras la CLP del grupo SC d.a. y su respectivo control; B) Se muestran los resultados de las cinéticas de peso corporal de cada grupo. Los resultados se presentan mediante el porcentaje respecto al basal \pm SEM de cada grupo [Control (n=17) y SC d.a. (n=10)].

2.3.3- Análisis microbiológico tras la xenoinmunización con sangre de cerdo y sepsis en ratas Lewis

La caracterización de la bacteriemia en sangre periférica de ratas utilizando métodos de cultivo estandarizados en los cultivos controles con sangre tomada antes de la CLP así como a las 48 h posteriores a la CLP demostraron la ausencia de bacterias de flora intestinal en sangre de estos mismos animales (Tabla 13).

Tabla 13. **Flora cecal detectada en sangre periférica de ratas Lewis tras 48 h de ser inducida la sepsis por CLP.**

Número de animales	Aislamiento de colonias	Gérmenes
8	0	0

3.-Características de xenoanticuerpos presentes en la rata tras inmunización xenogénica

3.1- Reactividad cruzada de xenoanticuerpos de rata Lewis anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG con microorganismos entéricos

Se investigó mediante citometría de flujo la reacción cruzada de los xenoanticuerpos de rata anti-hámster y anti-cerdo contra las bacterianas *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* aisladas tras la realización de CLP en ratas (Fig. 23). Inicialmente se hicieron diferentes diluciones del suero de las ratas (en el rango entre 1/2 a 1/1000) para determinar la dilución más adecuada en cada caso y trabajar en condiciones de linealidad para la intensidad de fluorescencia obtenida. No se detectó reactividad de los anticuerpos naturales de la rata frente a *E. coli*, ni reacción cruzada de los anticuerpos xenogénicos anti-hámster en los grupos SH d.a. (día 5) y SH s.a. (día 40), en ninguna de las diluciones de trabajo (Fig. 23A,B). Por el contrario, los anticuerpos naturales de la rata mostraron una cierta reactividad frente a *E. faecalis*, que aumentó de forma significativa para las IgG e IgM en el grupo SH d.a. evaluadas con respecto a su grupo control en la dilución 1/500 (en situación de no saturación) (Fig. 23A,B). La media de aumento de reactividad de las IgM e IgG anti-hámster posterior a la inmunización del grupo SH d.a. (día 5) fue de 3 y 2,3 veces respectivamente, comparado con el grupo control PBS. Los sueros del grupo SH s.a. (día 40) no mostraron un reconocimiento diferencial significativo respecto a su grupo control en la dilución 1/500 (Fig. 23A,B).

Los anticuerpos xenogénicos anti-cerdo no mostraron tampoco ninguna reacción cruzada contra *E. coli* aislada tras la realización de CLP en ratas. Por el contrario, los anticuerpos naturales de rata mostraron una cierta reactividad frente a *E. faecalis*, que aumentó de forma significativa tras la inmunización con sangre de cerdo para las IgM e IgG en el grupo SC d.a. (día 5) evaluadas con respecto a su grupo control en la dilución 1/500 (Fig. 23C,D). El aumento de la media de IgM e IgG posterior a la inmunización en el grupo SC d.a. (día 5) fue de 19 y 6 veces respectivamente. Los sueros del grupo SC s.a. (día 40) tampoco mostraron un reconocimiento diferencial significativo respecto a su grupo control en la dilución 1/500, al igual que ocurrió con los anticuerpos anti-hámster (Fig. 23C,D).

3.2- Reactividad cruzada de xenoanticuerpos de rata Lewis anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG con células de otras especies

Los xenoanticuerpos anti-hámster IgM e IgG del grupo SH d.a. (día 5) y del SH s.a. (día 40), además de reconocer a linfocitos de hámster, se unen también a linfocitos porcinos (L35), linfocitos T humanos (Jurkat) y linfocitos de conejo (Fig. 24). La media de la unión de IgM en el día 5 fue más alta que el día 40 para todos los tipos celulares (Fig. 24A). Así, además del aumento de 13 veces observado con los linfocitos de hámster, también se observaron aumentos de 12 veces para L35 porcina, 6 veces para las células Jurkat y 5 veces para linfocitos de conejo comparado con el grupo control de PBS. La media de la unión de IgG en el día 40 fue mayor que en el día 5 para los linfocitos de hámster (aumento de 20 veces comparado con control), L35 porcina (aumento de 5 veces comparado con control), células Jurkat o linfocitos de conejo (aumento de 2 veces en ambos casos comparado con el grupo control) (Fig. 24B).

La inmunización de ratas con sangre de cerdo indujo xenoanticuerpos IgM e IgG en los grupos SC d.a. (día 5) y SC s.a. (día 40), que además de reconocer a las células porcinas L35, se unen a linfocitos de hámster o conejo, y células Jurkat humanas (Fig. 24C,D). La unión media de las IgM fue mayor en el día 5 que al día 40 para todos los tipos celulares, mientras que la unión de las IgG fue el contrario. Los aumentos de reconocimiento de las IgM del día 5 comparado con el grupo control PBS fue 39 veces para L35, 9 veces para los linfocitos de hámster y 4 veces para células Jurkat humanas y linfocitos de conejo (Fig. 24C). La media de los aumentos de la unión de IgG en el día 40 comparado con grupo control fueron 400 veces para L35, 9 veces para los linfocitos de hámster, 27 veces para las células Jurkat humanas y 2 veces para los linfocitos de conejo (Fig. 24D).

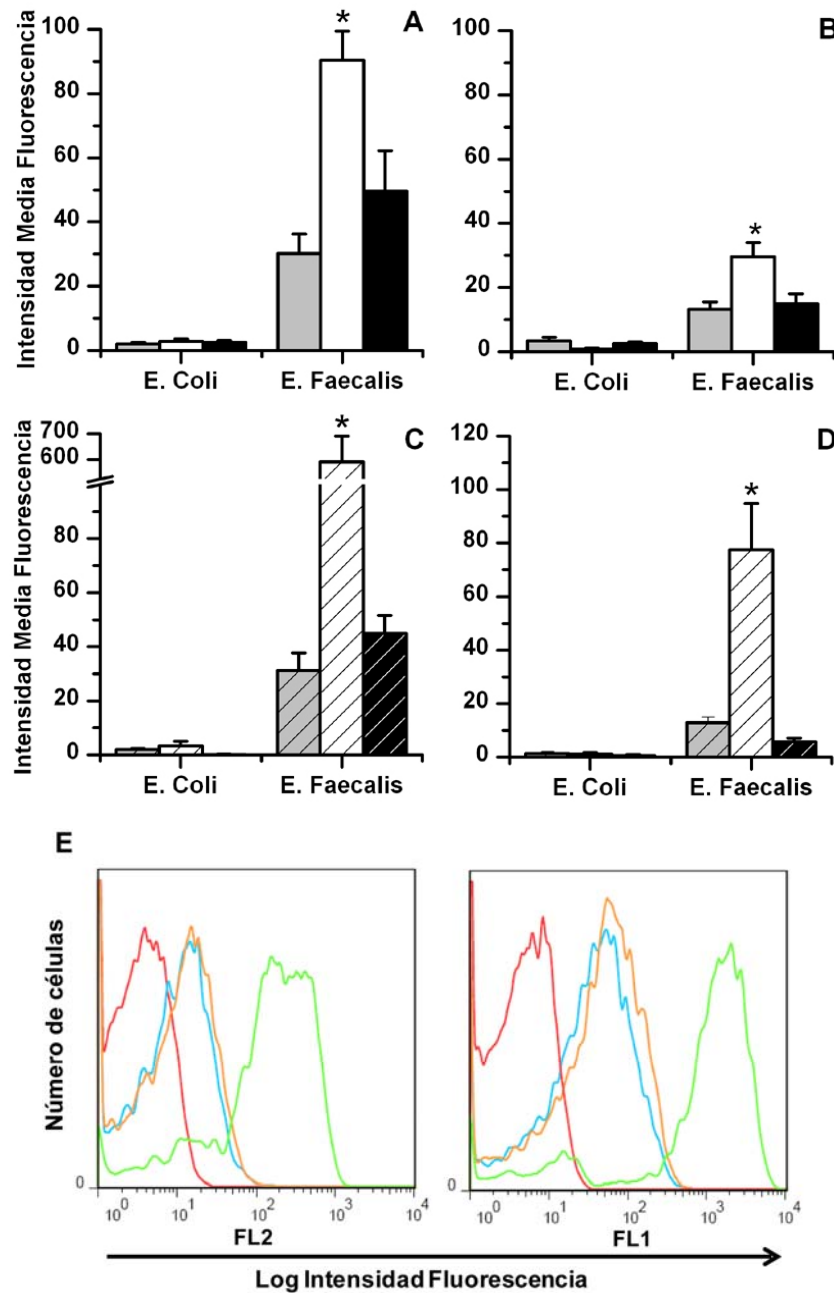


Figura 23. **Reactividad cruzada de xenocuerpos de rata Lewis anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG con enterobacterias.** Los resultados muestran la media de intensidad de fluorescencia \pm SEM de IgM (A,C) e IgG (B,D) en el momento pre-CLP (día 5 SH d.a y SC d.a.; día 40 SH s.a. y SC s.a.) (□ Control (n=2), □ SH d.a. (n=7), ■ SH s.a. (n=3); ▨ Control (n=3), ▨ SC d.a. (n=3), ▩ SC s.a. (n=3). El análisis estadístico sólo se muestra entre grupos inducidos y sus correspondientes controles, * $p < 0,05$. E: Los resultados muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia de IgM (FL2) e IgG (FL1) de un experimento representativo frente a bacterias *E. faecalis*; — Bacterias (*E. faecalis*), — Control, — SC s.a., — SC d.a.

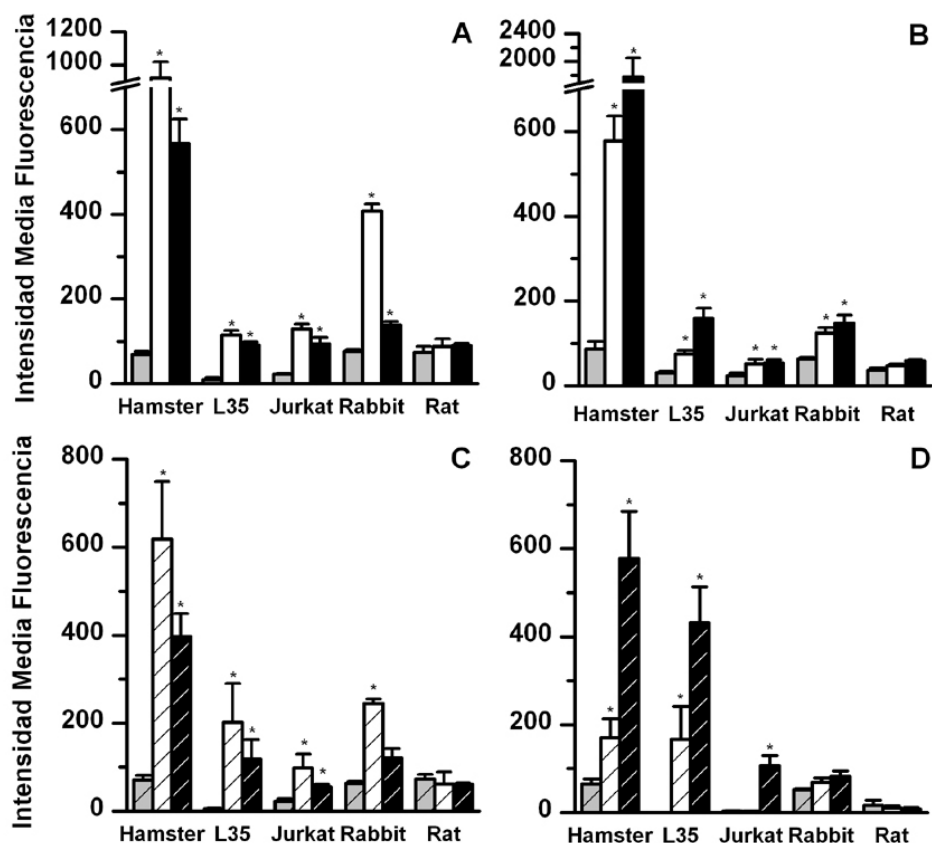


Figura 24. **Reactividad cruzada con linfocitos de otras especies y autoreactividad de xenoanticuerpos de rata Lewis anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG.** Los resultados muestran la media de intensidad de fluorescencia \pm SEM de IgM (A,C) e IgG (B,D) en el momento pre-CLP (día 5 SH d.a y SC d.a.; día 40 SH s.a. y SC s.a.; \square Control, \square SH d.a., \blacksquare SH s.a.) y sangre de cerdo (C, IgM y D, IgG; \square Control, \square SC d.a., \square SC s.a.). El número de animales inmunizados con sangre de hámster fueron 5 en cada grupo, y 3 en las inmunizaciones con sangre porcina. La estadística representada compara cada media con su control en el tiempo, * $p < 0,05$.

Además se investigó si los xenoanticuerpos de rata anti-hámster y anti-cerdo se unían a otras células xenogénicas además de los linfocitos de distintas especies. Los xenoanticuerpos anti-hámster IgM e IgG no mostraron cambios en la reactividad con células endoteliales porcinas (PAEC) y células endoteliales humanas (HMEC) comparado con su respectivo grupo control de PBS (Fig. 25). La excepción fue la unión de los anticuerpos IgM a las células HMEC en el protocolo SH d.a. (día 5), el cual demostró un incremento de 11 veces respecto al grupo control PBS (Fig. 25A). La inmunización con sangre de cerdo se asoció con una notable producción de xenoanticuerpos IgM e IgG que además de unirse a PAEC también mostró una significativa reactividad paralela a HMEC (Fig. 25C,D). En el grupo SC d.a. (día 5) la media de la unión IgM a PAEC aumentó 39 veces y a HMEC en 67 veces comparado con el grupo control de PBS (Fig. 25C). El aumento medio de la unión de IgG

posterior a la inmunización del grupo SC s.a. (día 40) comparado con el grupo control PBS fue de 570 veces para PAEC y 249 veces para HMEC (Fig. 25D).

Finalmente se investigó si los xenoanticuerpos de rata anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG modificaba la autoreactividad contra células linfoides y endoteliales de rata. Los resultados mostraron una ausencia de autoreactividad contra estos dos tipos celulares (Fig. 24 y 25), así como tampoco se observó contra las células epiteliales FAO (hígado de rata). En consecuencia, los xenoanticuerpos de rata, generados mediante la inmunización tanto de especies próximas (hámster) como alejadas filogenéticamente (cerdo), reaccionan de forma cruzada con células de otras especies, tanto próximas como alejadas filogenéticamente. Esta reacción se produce por isotipos IgM e IgG en el caso del reconocimiento de linfocitos, y de IgM en las células endoteliales humanas con la inmunización con sangre de hámster. En el caso de la reacción cruzada de los xenoanticuerpos anti-cerdo con células endoteliales humanas, se producen niveles de anticuerpos cruzados notablemente más elevados, que sugieren una particular reacción de los xenoanticuerpos anti-porcinos hacia este tipo celular.

3.3- Reconocimiento de carbohidratos por xenoanticuerpos de rata anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG mediante *Glycoarray*

Como se ha indicado, la respuesta a la inmunización xenogénica se considera mediada por anticuerpos naturales dirigidos contra antígenos glucídicos compartidos por microorganismos, aunque en los últimos años este aspecto se ha convertido en un tema controversial. La razón es el importante papel que estos anticuerpos desempeñan en el rechazo de injertos porcinos implantados en primates no humanos y que constituyen una de las causas fundamentales por las que el xenotrasplante no ha podido implementarse en el ámbito clínico. Las investigaciones de xenotrasplante en primates no humanos han identificado algunas proteínas como posibles xenoantígenos en el rechazo de xenoinjertos porcinos. Sin embargo, en la mayoría de ocasiones la inmunización xenogénica no cambia el perfil de reconocimiento de antígenos proteicos, tal como hemos podido comprobar en nuestros estudios en el objetivo 4. Por otro lado, los numerosos experimentos realizados para investigar la reactividad cruzada de los xenoanticuerpos inducidos con células de distintas especies y bacterias, hacía prácticamente inviable investigar el patrón de reconocimiento de proteínas de forma individualizada. En consecuencia, se optó por estudiar el patrón de carbohidratos identificados por los xenoanticuerpos inducidos mediante *arrays*.

La inmunización de ratas con sangre de hámster en el grupo SH d.a. indujo xenoanticuerpos IgM e IgG en el momento Pre-CLP (día 5), con niveles que globalmente fueron más altos para el último isotipo (Fig. 26 y 27). En la Tabla 14 se recogen los 20 carbohidratos que mostraron mayores incrementos para IgG e IgM, que fueron similares para ambos tipos de Ig. Los anticuerpos contra el disacárido GalNAc β 1-6GalNAc β (#440, Fig. 26 y 27A,C) fueron los que mostraron mayores incremento (48,8 veces para la IgG y 64,16 para la IgM) mientras que los anticuerpos contra la ramnosa (#8, Fig. 26 y 27A,C) y melibiosa (Gal α 1-6Glc β , #122, Fig. 26 y 27A,C) fueron los que mostraron los niveles más altos tras la inmunización, aunque con incrementos menores porque partían de niveles basales más altos.

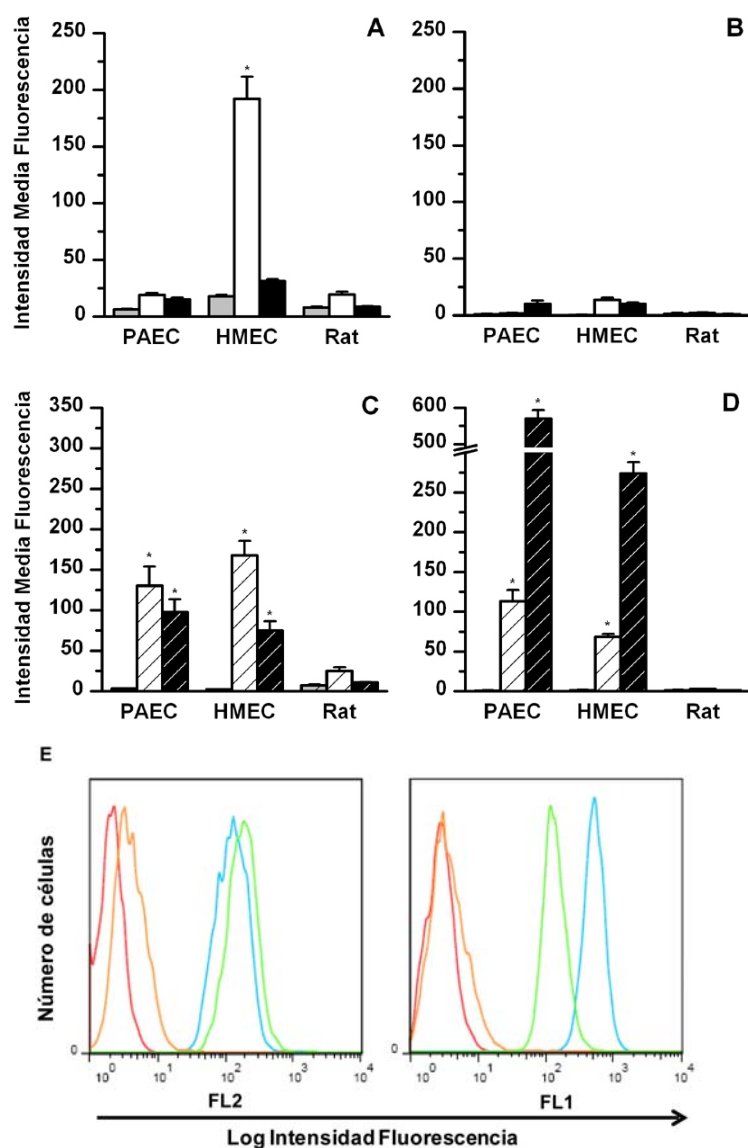


Figura 25. **Reactividad cruzada con células endoteliales de otras especies y autoreactividad de xenoanticuerpos de rata Lewis anti-hámster y anti-cerdo IgM e IgG.** Los resultados muestran la media de intensidad de fluorescencia \pm SEM de IgM (A,C) e IgG (B,D) en el momento pre-CLP (día 5 SH d.a. y SC d.a.; día 40 SH s.a. y SC s.a.; \square Control, \square SH d.a., \blacksquare SH s.a.) y sangre de cerdo (C, IgM y D, IgG; \square Control, \square SC d.a., \blacksquare SC s.a.). E: Los resultados muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia de IgM (FL2) e IgG (FL1) de un experimento representativo frente a células HMEC; \square Células endoteliales HMEC, \square Control, \square SC s.a., \square SC d.a. El número de animales inmunizados con sangre de hámster fueron 5 en cada grupo, y 3 en las inmunizaciones con sangre porcina. La estadística representada compara cada media con su correspondiente control en el tiempo, * $p < 0,05$.

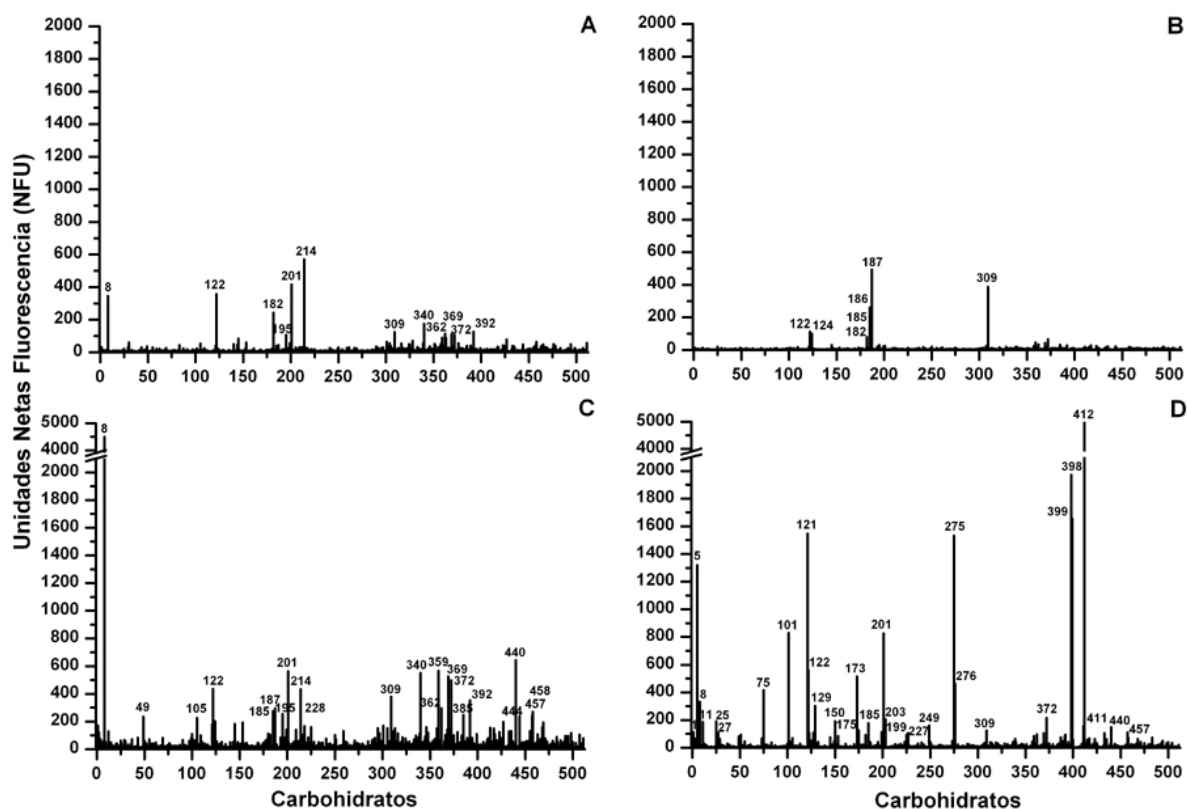


Figura 26. **Reactividad de los anticuerpos anti-carbohidrato IgM anti-hámster y anti-cerdo en el momento pre-CLP en los grupos SH y SC d.a.** Determinación por *glycoarray* del patrón de reconocimiento a antígenos glucídicos de los xenoanticuerpos IgM anti-hámster (A: Basal; C: día 5) o anti-cerdo (B: Basal; D: día 5) presentes en ratas Lewis. Los resultados representan la mediana expresada en unidades netas de fluorescencia (NFU) de cada grupo [SH d.a. y SC d.a. (n=2)].

La inmunización de ratas con sangre de cerdo en el grupo SC d.a. indujo también xenoanticuerpos anti-carbohidrato IgM e IgG en el momento Pre-CLP (día 5), con un mayor aumento global de las IgG, al igual que ocurría con la inmunización con sangre de hámster (Fig. 26 y 27B,D). Los niveles de anticuerpos, así como el número de carbohidratos reconocidos, fueron notablemente mayores con la inmunización con sangre de cerdo que con la de hámster. Los anticuerpos contra el antígeno de Forsman ($\text{GalNAc}\alpha 1\text{-3GalNAc}\beta 1\text{-3Gal}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-4Glc}\beta$; #412 y #398 Fig. 26 y 27B,D) fueron los que mostraron los mayores incrementos y niveles más altos, tanto para IgG como IgM. El aumento de IgG fue de hasta 843,7 veces, y las IgM 1578,5 veces comparado con el basal. Otros carbohidratos que también mostraron aumentos significativos en el reconocimiento de los anticuerpos fueron la galactosamina ($\text{GalNAc}\alpha$) (#5, Fig. 26 y 27B,D) (590,7 veces para IgG y 201,7 para IgM), el disacárido $\text{GalNAc}\beta 1\text{-6GalNAc}\beta$ (#400, Fig. 26 y 27B,D; 488,9 veces para IgG y 63,9 para IgM), el disacárido $\text{Gal}\alpha 1\text{-4GlcNAc}\beta$ (#121, Fig. 26 y 27B,D; 41 veces para IgG y 73,9 para IgM), y distintas formas del ácido acetil neuramínico en configuración β . Los anticuerpos

contra melibiosa, L-ramnosa mostraron niveles muy elevados aunque con menores incrementos, ya que al igual ocurría con la inmunización con sangre de hámster partían de niveles basales más elevados.

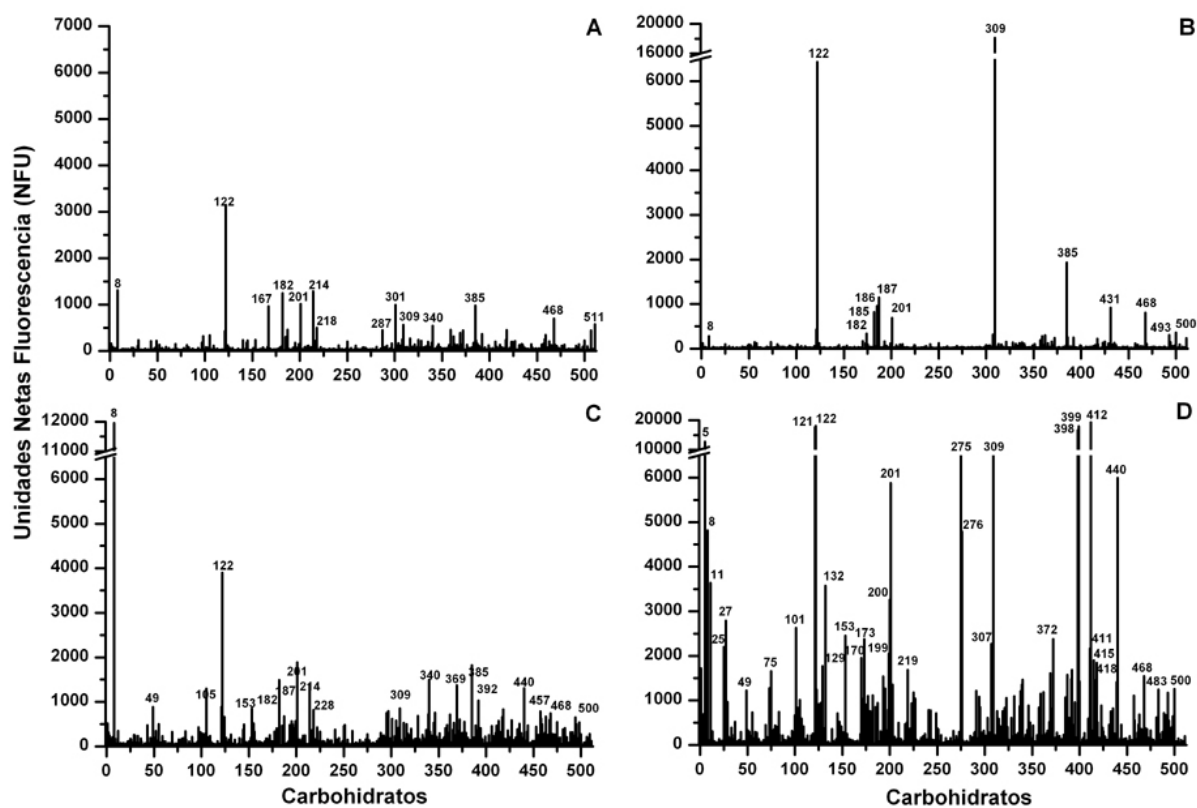


Figura 27. Reactividad de los anticuerpos anti-carbohidrato IgG anti-hámster y anti-cerdo en el momento pre-CLP en los grupos SH y SC d.a.. Determinación por *glycoarray* del patrón de reconocimiento a antígenos glucídicos de los xenoanticuerpos IgG anti-hámster (A: Basal; C: día 5) o anti-cerdo (B: Basal; D: día 5) inducidos en ratas Lewis. Los resultados representan la mediana expresada en unidades netas de fluorescencia (NFU) de cada grupo [SH d.a. y SC d.a. (n=2)].

Tabla 14. **Incremento de la reactividad de anticuerpos IgM e IgG frente a carbohidratos específicos posterior a la xenoinmunización.** Determinación por glycoarray del patrón de reconocimiento a antígenos glucosídicos de los xenoanticuerpos IgM e IgG anti-hámster o anti-cerdo inducidos en ratas Lewis. Los resultados representan la mediana expresada en unidades netas de fluorescencia (NFU) de cada grupo [SH d.a. y SC d.a. (n=2)].

Anticuerpos anti-Hámster IgG				Anticuerpos anti-Hámster IgM			
Carbohidrato	Basal (NFU)	Día 5 (NFU)	Increment.	Carbohidrato	Basal (NFU)	Día 5 (NFU)	Increment.
GalNAc β 1-6GalNAc β	26	1311	50,89	GalNAc β 1-6GalNAc β	10	643	64,16
Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6(Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc β -6AA	18	545	30,69	Gal β	5	128	26,23
[3OSO ₃][6OSO ₃]Gal β 1-4GlcNAc β	4	101	24,44	Gal β 1-6Gal β	2	38	24,27
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-3GalNAc α	14	306	22,44	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc	2	33	20,85
Gal β 1-4GalNAc β 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β	24	514	21,02	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3GalNAc	4	66	17,48
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-6(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-6(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β	31	599	19,39	Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-6)GalNAc α	4	62	16,12
Glc β 1-6Glc β	33	492	14,94	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -N(LT)AVL	2	23	13,65
6-H ₂ PO ₃ Glc β	56	749	13,40	Rha α	344	4508	13,10
Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc	21	269	12,95	Glc α	10	125	12,42
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3GalNAc α	26	333	12,63	Neu5Ac α 2-6GalNAc β 1-4[6OSO ₃]GlcNAc β	8	95	12,06
Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3GalNAc	13	168	12,62	Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β	5	59	11,64
Neu5Ac α 2-6GalNAc β 1-4[6OSO ₃]GlcNAc β	40	499	12,58	GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	4	43	10,22
Gal β 1-3GlcNAc β 1-6GalNAc α	31	382	12,27	Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -	20	201	9,88
Gal α 1-2Gal β	27	322	12,14	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β	17	160	9,42
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β	44	480	10,86	GlcA β 1-3Gal β	10	92	9,38
GalNAc α 1-3GalNAc β	20	213	10,41	Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β	7	67	9,33
Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-6)GalNAc α -	24	235	9,75	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc	11	98	9,11
Gal β	36	348	9,67	Gal α 1-3GalNAc β	5	44	9,07
Rha α	1306	11955	9,16	Gal β 1-3GlcNAc β	4	36	8,81
Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1-6GalNAc α -Sp14	47	408	8,65	[3OSO ₃]Gal β -Sp8	8	71	8,80

Anticuerpos anti-Cerdo IgG

Carbohidrato	Basal (NFU)	Día 5 (NFU)	Increment.
GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β	23	19274	843,69
GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	25	16704	655,61
GalNAc α	22	12705	590,68
Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α	7	3572	500,06
GalNAc β 1-6GalNAc β	12	5991	488,91
GlcA β 1-3Gal β	7	3260	479,15
Neu5Ac β	11	3636	340,26
Gal α 1-4Gal β 1-3GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal α 1-4Gal β 1-3GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β	70	17918	255,11
Neu5Ac β 2-6GalNAc α	42	9830	233,06
Neu5Ac β 2-6Gal β 1-4GlcNAc β	29	4789	165,14
[3OSO3]Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β	21	2793	131,29
Fuca1-2Gal β 1-4GlcNAc β	17	1653	98,22
Fuca1-2[6OSO3]Gal β 1-4[6OSO3]Glc	21	1686	79,93
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β	23	1414	60,70
KDN α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β	23	1351	57,51
Gal β 1-4GlcNAc β 1-6GalNAc α	33	1771	54,22
GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-3GalNAc α	47	2165	45,91
Gal α 1-4GlcNAc β	429	17668	41,21
Gal β 1-4[6OSO3]Glc β	65	2451	37,80
Fuca1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β	45	1573	34,90

Anticuerpos anti-Cerdo IgM

Carbohidrato	Basal (NFU)	Día 5 (NFU)	Increment.
GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β	3	5028	1578,46
GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β	3	1971	571,67
GalNAc α	7	1321	201,69
Fuca1-2Gal β 1-4GlcNAc β	3	416	145,12
Gal α 1-4Gal β 1-3GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal α 1-4Gal β 1-3GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β	13	1654	126,70
Neu5Ac β 2-6GalNAc α	14	1532	111,34
KDN α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β	2	207	101,75
Gal α 1-4GlcNAc β	21	1547	73,92
Gal β 1-4GlcNAc β 1-6GalNAc α	4	302	68,04
Neu5Ac β 2-6Gal β 1-4GlcNAc β	7	463	64,43
GalNAc β 1-6GalNAc β	2	150	63,91
Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GlcNAc β	15	830	55,00
Neu5Ac β	4	188	53,04
Rha α	6	332	53,02
Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β	3	109	40,66
GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α	14	514	37,95
[3OSO3]Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β	3	109	36,02
GlcA β 1-6Gal β	25	827	32,94
Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α	1	41	32,03
Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-4Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β	7	191	28,68

3.4- Inhibición de la reactividad cruzada de los xenoanticuerpos de rata IgG e IgM anti-hámster y anti-cerdo frente a enterobacterias y células de otras especies con diferentes carbohidratos

La potencial participación de los anticuerpos anticarbohidrato inducidos por la inmunización con sangre de hámster o cerdo en la reacción cruzada con células de otras especies y enterobacterias, se investigó mediante estudios de inhibición con glucosa, ramnosa, melibiosa, antígeno de Forssman, ácido acetil neuramínico, Gal α 1-4GlcNAc β y GalNAc β 1-6GalNAc β . Los mayores efectos de inhibición se observaron en la reacción cruzada de xenoanticuerpos inducidos con *E. faecalis* (Fig. 28). La melibiosa redujo de forma concentrada dependiente la reacción de los xenoanticuerpos inducidos con *E. faecalis*. A 1 mM la reacción de los anticuerpos anti-cerdo IgG e IgM se redujo un 18% mientras que a 20 mM la inhibición fue del 76% para la unión de IgG y un 77% las IgM. La reacción de los anticuerpos anti-hámster se redujo un 14% para las IgG y un 15% para las IgM con un 1 mM y un 25% y 36% para IgG e IgM, respectivamente, con 20 mM. La ramnosa también mostró una cierta capacidad de inhibición dosis dependiente de los xenoanticuerpos inducidos aunque a concentraciones más altas. A 20 mM la reacción de los anticuerpos anti-cerdo IgG se redujo un 15% y las IgM un 12%, mientras que la reacción de los anticuerpos anti-hámster se redujo un 22% para las IgG y un 26% para las IgM. El resto de carbohidratos investigados no mostraron ningún efecto inhibitorio sobre la reactividad cruzada de los anticuerpos de rata anti-hámster o anti-cerdo con *E. faecalis*.

Por lo que respecta a la reacción cruzada de los xenoanticuerpos inducidos por la inmunización con sangre de hámster o cerdo con linfocitos y células endoteliales de otras especies, la incubación con los diferentes carbohidratos no demostraron ninguna inhibición de la reactividad para ninguno de los distintos tipos celulares y especies estudiados. En consecuencia, estos estudios han permitido la identificación de antígenos glucídicos específicos con un potencial papel en la reacción cruzada de los xenoanticuerpos de rata anti-cerdo y anti-hámster con *E. faecalis*. Por el contrario no ha sido posible reconocer ningún antígeno específico para la reacción cruzada de los xenoanticuerpos de rata anti-hámster o anti-cerdo con células de otras especies.

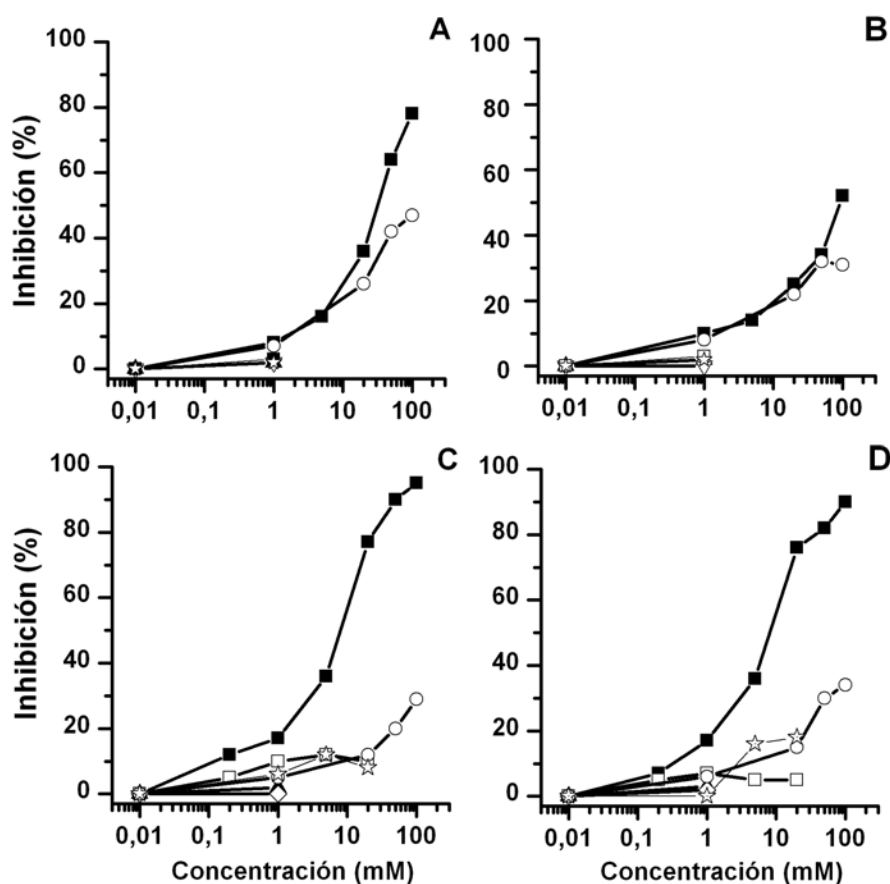


Figura 28. Estudio de inhibición de la reactividad de xenocuerpos IgM e IgG con carbohidratos específicos frente a *E. faecalis*. Porcentaje de inhibición con distintos carbohidratos de la reacción cruzada de los xenocuerpos anti-hámster (A: IgM y B: IgG) y anti-cerdo (C: IgM y D: IgG) con *E. faecalis*. (■ Melibiosa, □ Forssman, ○ Ramnosa, ▲ Gal α 1-4GlcNAc, ◇ GlcA β 1-6Gal β , ☆ Ácido acetil neuramínico). El número de animales inmunizados con sangre de hámster o sangre porcina fueron 3 en cada grupo.

4.- Impacto de la inmunización xenogénica inducidos en la angiogénesis y tumorigénesis de ratones RIP-Tag2

4.1- Inducción de anticuerpos xenogénicos en ratones RIP-Tag2

La inmunización con células endoteliales humanas en ratones ha demostrado la producción de xenocuerpos que inhiben la angiogénesis y crecimiento de tumores murinos. Para definir mejor este fenómeno se investigó el impacto de la inmunización xenogénica con células endoteliales humanas (HMEC), sangre humana, y sangre porcina en ratones transgénicos RIP-Tag2, que se caracteriza por el desarrollo espontáneo de tumores angiogénicos de páncreas.

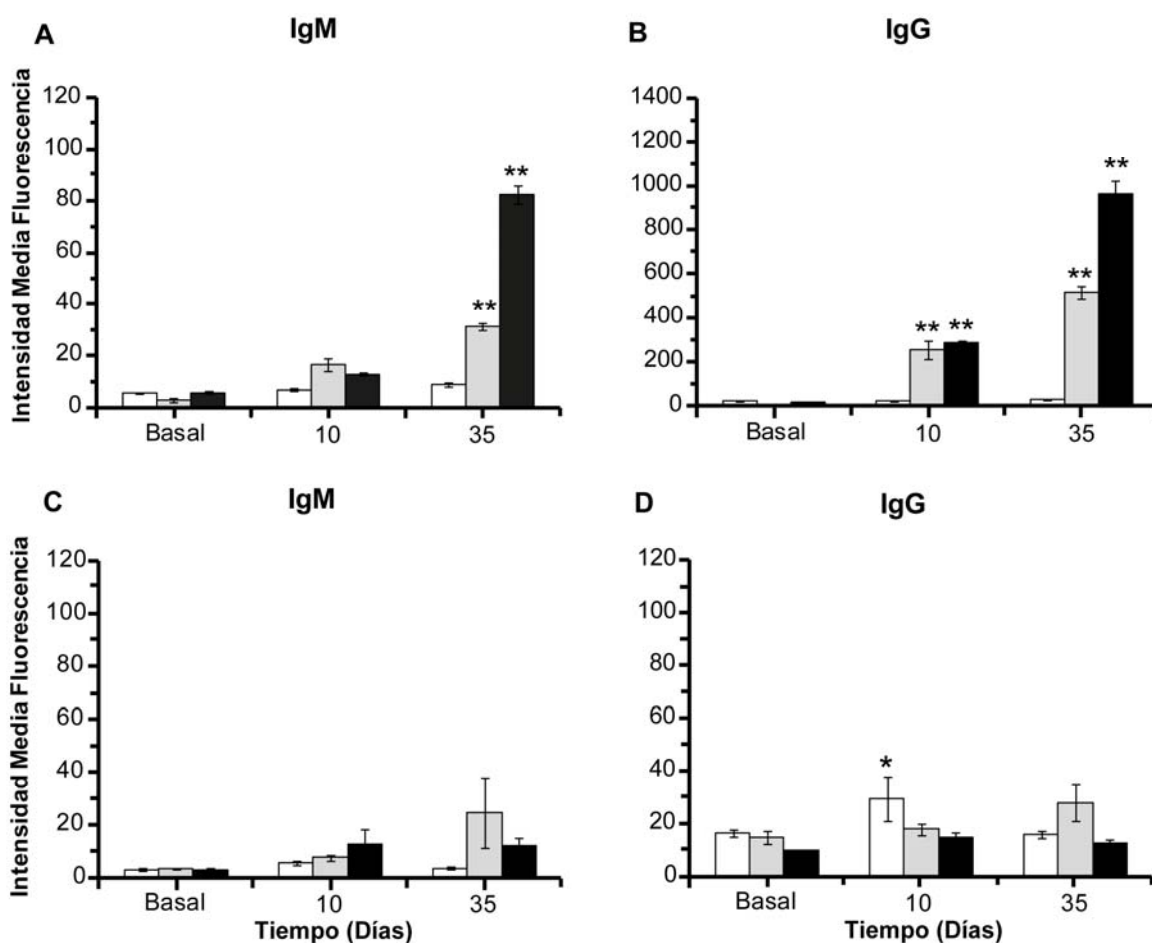


Figura 29. Cinética de títulos de xenoanticuerpos IgM e IgG en ratones RIP-Tag2 inyectados con células endoteliales humanas, sangre humana o de cerdo. Determinación por citometría de flujo de los xenoanticuerpos de ratón anti-HMEC (A,B) o anti-Ben5 (C,D) inducidos tras la inmunización con sangre humana □, de cerdo ◻ o células endoteliales humanas ■. Se muestran resultados de los títulos de IgM (A,C) e IgG (B,D) en forma de media de intensidad media de fluorescencia \pm SEM de cada grupo [SH d.s. (n=16), SC d.s. y EH d.s. (n=5)]. La estadística mostrada compara cada media con su correspondiente muestra basal en cada tiempo determinado, *p < 0,05, **p < 0,005.

La inmunización de ratones RIP-Tag2 con células HMEC dos inyecciones por semana durante 5 semanas, indujo xenoanticuerpos IgM e IgG frente a las células HMEC en los días 10 y 35 que alcanzaron su nivel más alto a los 35 días después de la primera inmunización (Fig. 29A,B). La media de la unión de las IgM en el día 35 mostró aumentos de 15 veces comparado con la muestra basal y de 48 veces en el caso de las IgG. Por el contrario, el grupo de animales inmunizado con sangre humana tanto las IgM como las IgG no mostraron ninguna reactividad con las células HMEC (Fig. 29A,B), aunque sí lo mostraron contra otros tipos celulares humanos como las Jurkat. La inmunización con sangre de cerdo indujo xenoanticuerpos IgM e IgG en los días 10 y 35 que además de reaccionar con las células

porcinas también lo hicieron de forma cruzada con las HMEC (Fig. 29A,B). Concretamente, la media de la unión de las IgM en el día 35 mostró aumentos de 11 veces comparado con la muestra basal y de 116 veces en el caso de las IgG. Hay que destacar que la inmunización con sangre de cerdo generó un nivel notable de anticuerpos que reaccionaron con la HMEC, mientras que este fenómeno no se observó con la inmunización con sangre humana.

Los xenoanticuerpos inducidos IgM e IgG tras la inmunización con células HMEC, sangre humana o de cerdo, siempre mostraron reactividades bajas con células endoteliales murinas (Ben5) (Fig. 29C,D). La inmunización con sangre humana fue la única que mostró un aumento significativo ($p < 0,05$) de la reactividad de las IgG a los 10 días, en los que duplicó los niveles basales. Esta misma inmunización con sangre humana se asoció con un incremento de 2 veces respecto a la muestra basal de la reactividad de las IgG con las células tumorales y endoteliales aisladas de los tumores pancreáticos del ratón RIP-Tag2 (Fig. 30).

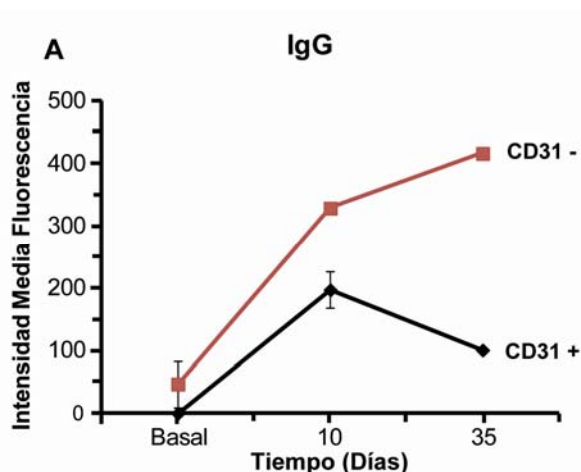


Figura 30. **Reactividad de los xenoanticuerpos IgG inducidos en ratones RIP-Tag2 frente a células tumorales y endoteliales.** Determinación por citometría de flujo de la reactividad de los anticuerpos IgG de ratón inducidos tras la inmunización con sangre humana frente a células tumorales (CD31 -) \blacklozenge o endoteliales (CD31 +) murinas \blacksquare . Se muestran resultados de la reactividad de los anticuerpos en forma de intensidad media de fluorescencia \pm SEM del grupo SH d.s. (n=2).

4.2- Perfil angiogénico y tumorogénesis en el modelo de ratón RIP-Tag2

Los resultados obtenidos en ratones RIP-Tag2 con 13 semanas de edad tras los distintos protocolos de inmunización xenogénica mostraron que el volumen tumoral no se modifica significativamente respecto a los controles. Sin embargo, se observaron cambios significativos del fenotipo hemorrágico tumoral en los grupos experimentales donde los animales fueron inmunizados con sangre o células endoteliales humana, mientras los animales

inyectados con sangre de cerdo no mostraron cambios respecto al control (Fig. 31A). Concretamente, los animales inmunizados con células endoteliales humanas alcanzan un valor medio de 72% de tumores hemorrágicos, 4% de tumores parcialmente hemorrágicos y 22% de tumores no hemorrágicos (Fig. 31B). Por otra parte los animales inmunizados con sangre humana también modificaron significativamente el fenotipo hemorrágico de los tumores, alcanzando valores medios de un 65,5% de tumores hemorrágicos, 19,8% de tumores parcialmente hemorrágicos y 14,8% de tumores no hemorrágicos (Fig. 31B).

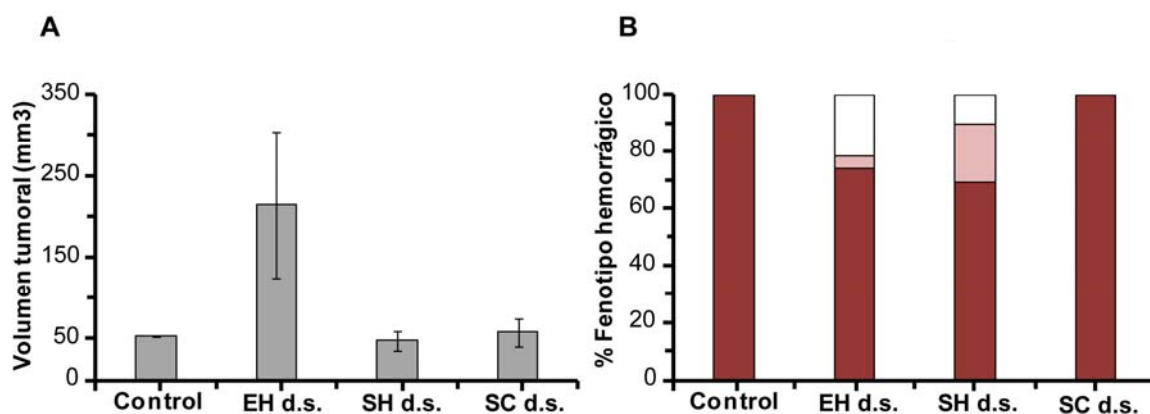


Figura 31. **Volumen tumoral y fenotipo hemorrágico en ratones RIP-Tag2 tras la inmunización xenogénica.** A) Volumen tumoral (mm³); B) Porcentaje de tumores hemorrágicos ■, parcialmente hemorrágicos ■ y no hemorrágicos □ tras la inmunización con células endoteliales humanas y sangre humana o de cerdo y control. [EH d.s. (n=5), SH d.s. (n=14), SC d.s. (n=3), Control (n=14)].

Estos resultados demuestran la contribución de la estimulación xenogénica con células endoteliales o sangre humana en la inhibición del proceso de angiogénesis que se produce durante el desarrollo del cáncer de páncreas en el modelo murino RIP-Tag2. Por el contrario, la inmunización con sangre porcina no tuvo ningún efecto, lo que sugiere que los efectos beneficiosos de la inmunización xenogénica tienen un componente específico que viene determinado por la especie utilizada para la inmunización.

4.3- Reconocimiento de proteínas por xenoanticuerpos IgG e IgM anti-humano

Los patrones de reconocimiento de proteínas por los xenoanticuerpos IgG obtenidos a los 35 días tras la inmunización con sangre humana en ratones RIP-Tag2 comparado con la muestra basal no mostraron un reconocimiento diferencial de proteínas (Fig. 32). Esto sugiere que los xenoanticuerpos que se generan se dirigen probablemente contra antígenos glucídicos.

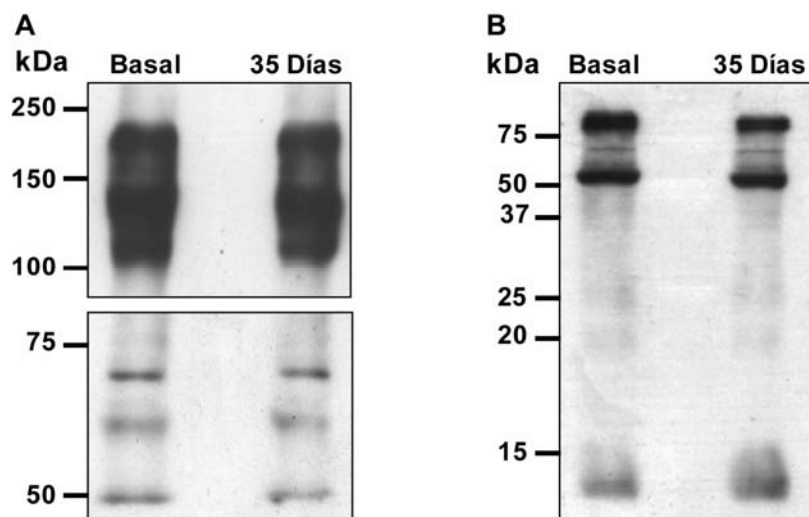


Figura 32. Perfil de reconocimiento de proteínas por xenoanticuerpos tras la inmunización con sangre humana en ratones RIP-Tag2. Antígenos proteicos de extracto de tumor pancreático por western blot reconocidos por los anticuerpos de ratón antes y después de la inmunización con sangre humana. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y 15% (A y B, respectivamente). En ambas figuras se muestran dos carriles, el correspondiente al suero basal y 35 días tras la primera inyección de sangre humana (n=5).

4.4- Análisis histológico del páncreas en ratones RIP-Tag2 tras la xenoinmunización

El análisis histológico de los páncreas obtenidos a los 35 días tras la inmunización con sangre humana en ratones RIP-Tag2 no mostró diferencias, comparadas con las muestras control, en cuanto a la infiltración leucocitaria en el tejido tumoral, Fig. 33. Esto indica que, el efecto antiangiogénico de la inmunización xenogénica está mediado fundamentalmente por elementos humorales y no por mediadores celulares.

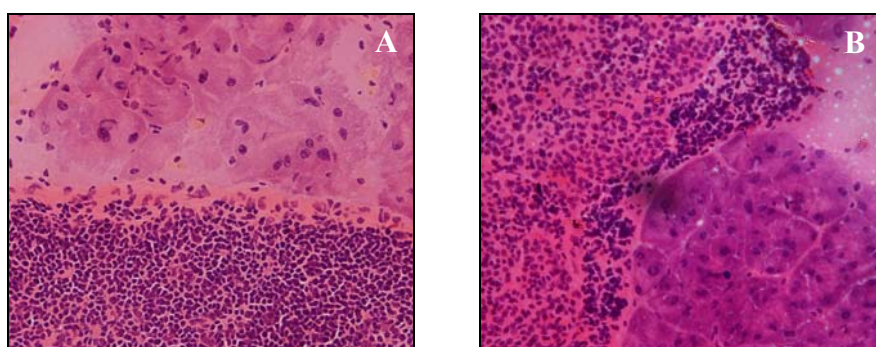


Figura 33. Infiltración leucocitaria en tumores pancreáticos tras la inmunización xenogénica en ratones RIP-Tag2. Infiltración leucocitaria en animales expuestos a xenoinmunización con sangre humana (A, n=15) y sus respectivo control (B, n=15). La imagen microscópica está a 20 aumentos.

DISCUSIÓN

El importante papel que desempeñan los anticuerpos naturales dentro de la inmunidad innata ha hecho que exista un gran interés en la potenciación de los mismos como estrategia para mejorar la respuesta inmunitaria contra infecciones bacterianas o víricas (Ochsenbein, 1999), parasitarias (Liles, 2001) y cáncer (Vollmers y Brändlein, 2007). Una de las características de los anticuerpos naturales es la polireactividad, reconociendo autoantígenos como el ssDNA, el receptor Fc para las IgG o la tiroglobulina. Sin embargo, estos anticuerpos naturales polireactivos se consideran distintos de los autoanticuerpos que se asocian con enfermedades autoinmunes (Casali y Notkins, 1989). El papel fisiológico de los anticuerpos naturales se desconoce, aunque se ha postulado que participan en la respuesta inmunitaria como primera línea de defensa contra microorganismos invasores (Cramer, 2000), y para facilitar la eliminación de células senescentes (Casali y Notkins, 1989). Lo que sí parece cierto es que la relevancia que tienen estos anticuerpos naturales no la determina su función fisiológica.

Los xenoanticuerpos son un subgrupo de anticuerpos naturales que se conocen fundamentalmente por el papel que desempeñan en el rechazo de injertos de otras especies, que se podría considerar como patológico, pero no por su papel fisiológico. En presencia de inhibidores autólogos de activación del complemento [CD55, proteína cofactor de membrana (MCP) y factor acelerador de la degradación (DAF)] en la membrana de las células, estos anticuerpos no activan el complemento hasta el punto de producir daño a las células de la propia especie. Cuando los inhibidores de membrana son heterólogos como ocurre en el caso del xenotrasplante, la unión de los xenoanticuerpos con los antígenos del injerto produce una activación del complemento que lleva a la destrucción del injerto. Este tipo de respuesta fue la que llevó a la producción de cerdos transgénicos para las proteínas reguladoras del complemento humano, cuyos injertos demostraron que podían prevenir el rechazo hiperagudo cuando eran trasplantados en primates no humanos (Mañez et al., 2004).

El propósito de los trabajos recogidos en esta tesis era aprovechar la producción de xenoanticuerpos que tiene lugar tras la exposición a xenoantígenos, así como la posibilidad de su neutralización, para caracterizar su función como anticuerpos naturales. La hipótesis es que la modulación de los xenoanticuerpos puede mejorar la respuesta inmunitaria en distintas condiciones, especialmente teniendo en cuenta que reaccionan mayoritariamente con antígenos glucídicos. Los estudios se centraron en el papel de los xenoanticuerpos en dos situaciones como son la respuesta contra infecciones bacterianas graves y la angiogénesis tumoral.

1.- Efecto de los anticuerpos anti- α Gal en la sepsis que se produce en ratones α Gal KO tras realizar CLP

Entre los xenoanticuerpos naturales más estudiados están los que se dirigen contra el antígeno α Gal, ya que son los principales responsables del rechazo de xenoinjertos porcinos en humanos y primates no humanos, y que sólo están presentes en estas dos especies. De ahí que fuera necesario la manipulación genética de ratones (α Gal KO), para poder obtener un modelo experimental que presentara espontáneamente altos niveles de anticuerpos anti- α Gal en sangre periférica cuando son adultos, al igual que ocurre en humanos y primates no humanos. Curiosamente, estos anticuerpos anti- α Gal parecen producirse como consecuencia de la inmunización de las bacterias de la flora endógena (Galili, 1988). Sin embargo, estos mismos anticuerpos pueden acabar teniendo un efecto deletéreo para el individuo, ya que se ha sugerido que los anticuerpos anti- α Gal IgG pueden favorecer la supervivencia en la sangre de determinadas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* involucradas en sepsis. Dichos estudios describen que la unión de los anticuerpos anti- α Gal IgG a determinados epítomos presentes en la membrana bacteriana, como por ejemplo el LPS, conduce al bloqueo de la lisis que se produce por la vía alternativa del complemento sobre las bacterias (Hamadeh, 1992).

Para poder estudiar el efecto *in vivo* de los anticuerpos anti- α Gal se estableció un modelo de peritonitis y sepsis en ratones α Gal KO. Hay que destacar que los ratones que se utilizaron producen espontáneamente anticuerpos anti- α Gal después de unos meses de vida, sin necesidad de realizar ninguna inmunización, como ocurre con otras colonias de estos ratones. Esto permitió analizar el papel específico de los anticuerpos anti- α Gal mediante la administración exclusivamente del polímero GAS914, que incorpora antígenos α Gal, que neutraliza totalmente estos anticuerpos, tal como se había demostrado previamente tanto en ratones α Gal KO como en primates no humanos (Katopodis et al., 2002). La depleción de anticuerpos anti- α Gal se asoció con una mayor supervivencia tras la sepsis provocada por la CLP, siempre que los anticuerpos se neutralizaran antes de que se produjera la sepsis. Si la depleción de anticuerpos se realiza a partir de 12 horas después de realizar CLP no tiene ningún beneficio, sugiriendo que estos anticuerpos desempeñan un papel en la puesta en marcha de la respuesta inmunitaria de la sepsis, perdiendo funcionalidad una vez que esta ocurre.

También se investigó mediante *glycoarrays* el patrón de anticuerpos neutralizado por GAS914. La razón fue que dada la polireactividad de los anticuerpos anticarbohidrato existía

la posibilidad de que esta molécula tuviera un efecto que fuera más allá de los anticuerpos anti- α Gal. El resultado demostró que sólo fueron neutralizados los anticuerpos que reconocen el antígeno α Gal, tanto si se unen con glucosa (Glc) o acetilglucosamina (GlcNAc) en forma de trisacárido, también conocido como antígeno de Galili y que es el que se utiliza como antígeno en el GAS914, tetrasacárido o pentasacárido. Por lo tanto, el efecto beneficioso del GAS914 es consecuencia de la depleción específica de los anticuerpos anti- α Gal, no de un efecto sobre múltiples anticuerpos anticarbohidrato.

Estos resultados ayudarían a explicar estudios clínicos previos que demuestran un mayor riesgo de mortalidad en pacientes clínicos con altos niveles de anticuerpos anti- α Gal sujetos a diálisis (Pérez-Fontán et al., 2006). Además sugieren que la depleción de los anticuerpos anti- α Gal mediante GAS914 podría ser una “vacuna” para prevenir las sepsis causadas por microorganismos de la flora endógena y que afecta a numerosos pacientes hospitalizados por otras causas. Utilizar la palabra vacuna en este contexto parece apropiado si consideramos que la definición de la misma es la de preparados que mejoran la inmunidad contra una determinada enfermedad. El problema es que por primera vez se propone no la inducción de anticuerpos como estrategia para mejorar la inmunidad contra infecciones, si no la eliminación de los mismos. Mientras que la eliminación de anticuerpos de forma inespecífica o específica ha demostrado eficacia terapéutica en distintas enfermedades autoinmunes, nunca lo había hecho *in vivo* en el caso de infecciones. Sin embargo, existen abundantes resultados directos de estudios *in vitro* e indirectos de estudios *in vivo* que sugieren esta posibilidad.

La infección por el virus HIV-1 se asocia con la producción de numerosos anticuerpos que se unen a glicoproteínas virales, aunque no pueden neutralizar el virus. Desde hace años se conoce que estos anticuerpos pueden aumentar la infección por el HIV-1 (Robinson et al. 1988), por mecanismos que incluyen al complemento y sus receptores (Willey et al., 2011). De forma similar, en el caso de la infección por el virus Dengue la mayor gravedad observada en infecciones secundarias por otros serotipos del virus se ha atribuido a la presencia de anticuerpos no neutralizantes que actúan sobre antígenos que son la diana de los anticuerpos neutralizantes, y que favorecen la infección de células portadoras de receptores Fc (Dejnirattisai et al., 2010). Este fenómeno también ha sido descrito con el virus del sarampión (Iankov et al., 2006). En el caso de bacterias, la reemergencia de tosferina en los últimos años en personas vacunadas se ha atribuido a la infección por *Bordetella parapertussis*, que utiliza la reacción cruzada de los anticuerpos inducidos por la vacuna contra la *B. pertussis* para generar un LPS con unidades repetidas de antígeno O que la protege de estos anticuerpos

(Zhang et al., 2009). Este mecanismo sería similar al utilizado por las enterobacterias y *N. meningitidis* aisladas en la sangre con los anticuerpos anti- α Gal para causar sepsis (Hamadeh et al., 1992, 1995), y que nuestros estudios sugieren que pueden prevenirse mediante la eliminación de estos últimos.

Los anticuerpos anti- α Gal no son los únicos que intervendrían en la facilitación de la invasión sanguínea, y posiblemente en la translocación bacteriana, de microorganismos. Todas las bacterias aisladas en cálculos biliares infectados expresaron antígenos α Gal y P1 (Gal α 1,4 Gal), incluyendo gram positivas como el *E. faecalis* que además expresó también el antígeno de Forssman (Wetter y al., 1994). Esto sugiere que la exposición continua a anticuerpos naturales dirigidos contra antígenos glucídicos presentes en la pared bacteriana determina la emergencia de microorganismos endógenos que son capaces de evadir la citotoxicidad de estos anticuerpos, de forma similar a como ocurre con los tratamientos antibióticos. Análogamente a lo que ocurre con la aparición de infecciones por microorganismos resistentes a los antibióticos, la aparición de condiciones favorables para la diseminación de estos microorganismos (inmunosupresión, intervenciones quirúrgicas, etc.) permitiría el desarrollo de infecciones causadas por los mismos. En consecuencia la investigación clínica de la depleción de anticuerpos anti- α Gal para prevenir las infecciones causadas por estas bacterias no parece descabellada, particularmente si tenemos consideramos la inocuidad que ha demostrado el tratamiento con GAS914 en primates no humanos (Katopodis et al., 2002).

2.- Impacto de la inmunización xenogénica en la sepsis que se produce en la rata tras realizar una CLP

Para caracterizar el papel de los xenoanticuerpos en la sepsis se estableció un modelo de sepsis en rata Lewis macho por CLP, en el que se realizó una estimulación xenogénica previa mediante inyecciones de sangre de hámster. Se investigaron dos protocolos de xenoimmunización, uno para producir niveles de xenoanticuerpos anti-hámster con predominio de IgM y otro de IgG. La inmunización con SH d.a. generó una elevación preponderante de IgM, y menor de IgG en el día 5, mientras que la inmunización con SH s.a. determinó un aumento de IgG en el día 40 que fue notablemente inferior para IgM. Estos valores se correspondían con los que previamente relacionaban los xenoanticuerpos durante la primera semana de exposición a xenoantígenos con anticuerpos naturales, tanto de IgM como

de IgG, mientras los que se observaban a partir del día 15-20 se consideraban inducidos T-dependientes, particularmente las IgG (Cramer, 2000).

El impacto de estas inmunizaciones xenogénicas se investigó en un modelo de sepsis de baja gravedad, que implicaba ligar un 25% del ciego (~1 cm) y realizar posteriormente una doble punción con agujas estériles de 19G. Este modelo se asocia con una supervivencia de las ratas Lewis mayor del 80% a los 15 días de la CLP. La inducción previa de niveles elevados de xenoanticuerpos anti-hámster IgG no tuvo ningún impacto en la supervivencia de los animales tras la CLP. Por el contrario, la inducción de xenoanticuerpos IgM se asoció con una disminución estadísticamente significativa de la supervivencia de los animales, un 35,3% inferior a los controles. También se estudió el efecto que tenían los xenoanticuerpos producidos tras la exposición a xenoantígenos de una especie distante en la escala filogenética de la rata como es el cerdo. Se utilizaron los mismos protocolos de inmunización que con el hámster, obteniéndose un patrón de predominio de xenoanticuerpos anti-cerdo IgM e IgG a los 5 y 40 días, similar al presente con el hámster. El aumento de los xenoanticuerpos IgM e IgG en el día 5, tras el protocolo de inmunización con SC d.a., se asoció con un aumento de la mortalidad de la rata tras la CLP del 28,2% comparado con el grupo control. Aunque estos resultados no alcanzaron la significación estadística, como ocurrió con la inmunización con la sangre de hámster, es probable que sea consecuencia del menos número de animales incluido en el estudio, y que no pudo incrementarse por dificultades para obtener la sangre de cerdo utilizada como inmunógeno. Esto sugiere que mientras los xenoanticuerpos IgG inducidos no desempeñan ningún papel en la sepsis, el aumento de nivel de los xenoanticuerpos naturales, fundamentalmente IgM pero también IgG, tiene un efecto deletéreo en la sepsis, que es independiente de que la inmunización se realice con especies próximas o alejadas en la escala filogenética.

El análisis hematológico mostró que la estimulación xenogénica en el grupo SH d.a. producía un aumento significativo del número de leucocitos totales, neutrófilos y monocitos en el momento de la CLP, lo cual sugiere el desarrollo de un proceso inflamatorio sistémico, que no estaba presente en el grupo SH s.a. Otro parámetro que mostró diferencias significativas en comparación con los controles en el momento de la CLP en el grupo SH d.a., pero no en el SH s.a., fue el peso de los animales. Así, mientras las ratas control del grupo SH d.a. mostraron un aumento medio de peso del 9%, en las ratas inmunizadas el aumento fue sólo del 0,68%. Esta falta de aumento de peso durante la inmunización estuvo presente en todas las ratas que posteriormente fallecieron, ya que las que sobrevivieron a las sepsis

mostraron un aumento de peso del 6,6% que no mostró diferencias significativas con los controles.

Una posible explicación para esta pérdida de peso sería el aumento significativo de leptina que se observó en las ratas que fallecieron en el momento de la CLP, tanto en comparación con los niveles basales de estos animales, como con los niveles pre-CLP de los animales inmunizados que no murieron con la sepsis. La leptina es una hormona principalmente producida por los adipocitos, que actúa centralmente en el hipotálamo para regular el peso corporal y gasto energético, que también interviene como citocina en la respuesta inmunitaria celular. La evaluación de los niveles de leptina presentes en la sangre se ha propuesto como un biomarcador del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) o sepsis (Yousef et al., 2010). Además su presencia a niveles elevados se ha asociado con un aumento de la morbilidad y mortalidad de la sepsis, tanto en humanos como en modelos experimentales (Bercault et al., 2004; Shapiro et al., 2010).

La leptina fue una de las dos citocinas que mostró aumentos significativos tras la inmunización xenogénica comparados con los basales antes de la CLP en los animales que murieron por sepsis. La otra fue la TIMP-1, que también mostró aumentos significativos en los animales inmunizados que no murieron. Junto a estas dos citocinas que mostraron un aumento significativo, hubo otras 15 que también aumentaron en la pre-CLP, aunque las diferencias no alcanzaron una significación estadística. Este patrón de aumento de citocinas, que incluye tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, contrastó con el observado en los animales que no murieron por la sepsis tras la inmunización xenogénica o en los controles sin inmunización, en los que se observó una disminución del 85% y 56% de las 34 citocinas estudiadas, que fue estadísticamente significativa para 7 y 6 de ellas, respectivamente. Esto indica que la sepsis menos grave y que no se asocia con mortalidad utilizada en nuestro modelo se caracteriza por una disminución mayoritaria de citocinas, de forma similar a la que se ha descrito en la tolerancia a la endotoxina (West y Heagy, 2002; Biswas y Lopez-Collazo, 2009). Este perfil de disminución de citocinas también se observó en el momento de la CLP con la inmunización xenogénica en el grupo SH d.a. de ratas que no fallecieron, mientras que las ratas que fallecieron mostraron un patrón predominante de aumento de citocinas.

La inmunización xenogénica con SH d.a. induce niveles elevados de xenoanticuerpos IgM e IgG, aunque con predominio de los primeros, que pueden tener un doble efecto en ratas Lewis. Por un lado puede disminuir la respuesta proinflamatoria/antiinflamatoria, actuando como la exposición a dosis bajas de endotoxina e inducir una tolerancia a ésta última.

Esto confirmaría recientes estudios *in vitro* e *in vivo* que sugerían que la estimulación de células B-1, produce una modulación de la respuesta inflamatoria de los macrófagos expuestos a endotoxina caracterizada por una disminución de mediadores proinflamatorios (TNF- α e IL-6) y aumento de los antiinflamatorios (IL-10) (Barbeiro et al., 2011), aunque en nuestro caso esta citocina no demostró ningún papel. Por otro lado, la inmunización xenogénica también puede aumentar la respuesta proinflamatoria/antiinflamatoria y provocar un aumento de la mortalidad cuando se produce una sepsis.

Dado que los mecanismos de la tolerancia a la endotoxina no están clarificados, resulta difícil discernir qué factores pueden determinar un tipo u otro de respuesta tras una misma inmunización xenogénica. Como se ha indicado la leptina aumentó tras la inmunización xenogénica en los animales que fallecieron por la sepsis, que además presentaron una pérdida de peso durante la inmunización. Un mecanismo que podría explicar la distinta respuesta es la activación de distintos receptores TLR. Se ha demostrado que puede existir una competencia entre células B activadas por el TLR-4 y el TLR-9, y que la activación por el último receptor rompe la tolerancia a LPS generada por el primero (Crampton et al., 2010; Matheu et al., 2012). Otro elemento que podría influir en las diferentes respuestas es la presencia de niveles más bajos de la molécula de adhesión L-Selectina a nivel basal, en los animales que fallecieron por la sepsis tras la CLP. La L-Selectina soluble juega un papel en la disminución de la adhesión de los leucocitos al endotelio durante la respuesta inflamatoria, lo que disminuye el impacto a distancia de la sepsis (Ferri et al., 2001). Se ha demostrado tanto en modelos experimentales animales como en humanos que la disminución de la L-Selectina se asocia con un aumento de la morbilidad y mortalidad después del politraumatismo y la sepsis, mientras que el aumento de la misma actúa como protectora en estas condiciones (Ferri et al. 2002; Stengel et al. 2005; Ferri et al. 2009). La L-Selectina puede sufrir cambios fisiológicos en relación con el ritmo circadiano y disminuir con el ejercicio, lo que podría explicar los distintos niveles observado basalmente en nuestros animales, que condicionarían las respuestas ulteriores tras la inmunización xenogénica (Kurokawa et al., 1995; Goebel y Mills, 2000; Niehaus et al., 2002).

3.- Características de xenoanticuerpos presentes en la rata tras una inmunización xenogénica

El estudio de la presencia de bacterias en la sangre a las 48 horas de realizada la CLP en animales que no murieron por la sepsis, demostró el aislamiento de 2 bacterias provenientes de la flora intestinal: *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Desafortunadamente, la dificultad de controlar el momento de la muerte en las ratas que fallecieron no permitió la obtención de cultivos en estos animales. Los gérmenes se aislaron en el 40% de las ratas inmunizadas con sangre de hámster o controles, y en ninguna inmunizada con sangre de cerdo, en las que se investigó. Sin embargo, es particularmente relevante porque confirma la existencia de bacteriemia en ratas que no fallecieron por la sepsis, tanto si fueron expuestas a antígenos xenogénicos como si no lo fueron.

La presencia de *E. faecalis* en los animales que fueron inmunizados puede considerarse de relativamente sorprendente. Previamente se ha demostrado que para generar sepsis polimicrobiana con predominancia de este microorganismo tras la CLP era necesario utilizar maniobras concretas, como el tratamiento de las ratas con Ciprofloxacina, que determina un aumento del crecimiento en la flora intestinal (Ravindranath et al., 2007). En condiciones normales la sepsis polimicrobiana que produce la CLP se asocia con una preponderancia de los organismos Gram negativos, tal como ocurrió en nuestro grupo control (Ravindranath et al., 2007). Esto sugiere que la inmunización xenogénica con sangre de hámster también modifica la preeminencia de microorganismos en la sepsis polimicrobiana tras la CLP.

Los anticuerpos anti-hámster presentes tras inmunización xenogénica, principalmente el isotipo IgM pero también la IgG, eran capaces de reconocer al *E. faecalis* pero no a la *E. coli*. De forma similar, los xenoanticuerpos anti-cerdo IgM e IgG también reaccionaron de forma cruzada con el *E. faecalis* pero no a la *E. coli*. Esta reacción de anticuerpos tras exposición a xenoantígenos con bacterias gram positivas como el *E. faecalis* es la primera vez que se describen. Previamente se había demostrado la reactividad de anticuerpos anti-Gal IgG humanos frente a diferentes bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, que son bacilos gram negativos (Galili et al., 1988). A pesar de la reactividad observada de los xenoanticuerpos inducidos frente a las bacterias, no se logra una protección del huésped frente a la sepsis. Por el contrario, de forma similar a lo que ocurre con los anticuerpos anti- α Gal en el ratón α Gal KO, la presencia de estos anticuerpos parece favorecer la sepsis y empeorar el pronóstico de la misma.

Como se ha indicado anteriormente, la respuesta xenogénica se considera que se dirige contra antígenos glucídicos expresados en células de otras especies (Cramer, 2000). Para determinar si las reacciones cruzadas observadas entre los xenoanticuerpos anti-hámster y anti-cerdo con bacterias estaba mediada por estos antígenos, se estudió el patrón de anticuerpos inducidos por cada inmunización en un *array* con 511 carbohidratos. Los anticuerpos IgG e IgM contra el disacárido GalNAc β 1-6GalNAc β , la ramnosa y melibiosa (Gal α 1-6Glc β), fueron los que mostraron los mayores aumentos con la inmunización con sangre de hámster. En la inmunización con sangre de cerdo los mayores aumentos fueron de los anticuerpos contra, el antígeno de Forsman (GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β), GalNAc β 1-6GalNAc β , Gal α 1-4GlcNAc β , galactosamina (GalNAc α), distintas formas del ácido acetil neuramínico, melibiosa, L-ramnosa. La incubación de los anticuerpos anti-hámster y anti-cerdo con melibiosa y ramnosa a concentraciones de 1 y 20 mM respectivamente, inhibieron la reacción cruzada de estos anticuerpos entre un 14% y un 77% con el *E. faecalis*. Los anticuerpos anti-cerdo a pesar de aumentar significativamente la reactividad con el antígeno de Forssman tras la inmunización xenogénica, no mostraron un efecto inhibitorio frente al disacárido de este antígeno. Hace unos años se demostró que los *E. faecalis* aislados en pacientes con colangitis expresaban el antígeno de Forssman, mientras que los que se aislaban en la flora intestinal no lo hacían (Wetter et al., 1994). Esto sugiere un potencial papel de los anticuerpos contra este antígeno en la translocación de estas bacterias, que nuestros estudios no han podido corroborar. El hecho de que no se aislara ninguna bacteria tras la CLP en los animales inmunizados con sangre de cerdo podría ser una posible explicación, ya que los anticuerpos anti-ramnosa y melibiosa estuvieron presentes tras la inmunización tanto con sangre de hámster como de cerdo. Otra posibilidad es que la utilización del disacárido del antígeno de Forssman no sea capaz de inhibir la reactividad de estos anticuerpos pero si el pentasacárido, como se ha demostrado previamente (Bovin et al., 2012).

La caracterización de los polisacáridos de la pared celular del *E. faecalis* ha demostrado la existencia predominante de tres polímeros, conteniendo uno de ellos hasta un 36% de ramnosa (Pazur et al., 1971; Hancock et Gilmore, 2002). Esto podría condicionar que el aumento de los anticuerpos contra este carbohidrato tras la inmunización xenogénica con sangre de hámster y cerdo tuviera un papel modulador de la infección por este organismo, favoreciendo la translocación bacteriana del mismo. No existe ninguna evidencia de la expresión del antígeno de melibiosa en la pared del *E. faecalis*, aunque sí que se ha descrito

en un *Streptococcus agalactiae* que causa la mastitis en el ganado bovino, considerándose que los anticuerpos anti-melibiosa de estos animales están relacionados con esta infección (Ni et al., 2000). Los anticuerpos anti-melibiosa, se consideran que forma parte de la reacción anti- α galactosil como los anti- α Gal, hasta el punto que estos últimos también reaccionan con la melibiosa aunque con una menor avidéz (Galili et al., 1985). La presencia de estos anticuerpos en distintas especies animales como vacas y pollos (Sugii y Hirota, 1990, 1993), ha llevado a considerar que tienen una función similar a los anti- α Gal en las mismas.

También se investigó la reacción cruzada de los xenoanticuerpos presentes tras la inmunización con sangre de hámster o cerdo con células de otras especies, tanto próximas como alejadas de la rata en la escala filogenética. Hasta el momento se había demostrado que la reacción cruzada de xenoanticuerpos tras la exposición a xenoantígenos se limitaba a especies próximas en la escala filogenética, como el conejo o el ratón en el caso de la rata (Yin et al., 1998), llegándose incluso a considerar inicialmente que estos anticuerpos eran polireactivos no relacionados con la respuesta inmunitaria xenogénica (Gannedahl y Tufveson, 1992). Nuestros resultados han demostrado que la xenoinmunización tanto por especies próximas en la escala filogenética de la rata como el hámster, o alejadas como el cerdo, produce xenoanticuerpos que reaccionan con linfocitos de distintas especies, tanto próximas (conejo) como alejadas en la escala filogenética (cerdo o humano), sin producir una autoreactividad. Estos resultados discrepan de los únicos publicados hasta el momento que evidenciaron una ausencia de reacción cruzada de xenoanticuerpos producidos por esplenocitos de cobaya (especie lejana en la escala filogenética de la rata) con especies próximas a la rata como el hámster o ratón (Ji et al., 2000). Una posible explicación a estas diferencias es el tipo celular utilizado en la xenoinmunización ya que se ha demostrado que los hematíes producen xenoanticuerpos desde el día uno de la exposición, mientras que tras la exposición a células mononucleares no están presentes hasta después del día 7 de la inmunización (Bersztel et al., 2006). Otra posibilidad, es que concretamente con la exposición a xenoantígenos de cobaya no se produzcan xenoanticuerpos que reaccionen de forma cruzada con células de otras especies, aspecto que nosotros no estudiamos.

Una reacción cruzada de xenoanticuerpos que ha sido especialmente estudiada, y que implica especialmente a los linfocitos, es la existente entre los antígenos de histocompatibilidad humanos (HLA) y porcinos (SLA). La razón es que cuando se consideró un primer ensayo clínico de xenotrasplante con órganos porcinos en humanos, los pacientes en lista de espera para un trasplante renal a los sensibilizados, algunos de ellos con niveles de

aloreactividad con los paneles de linfocitos (PRA) superiores al 80%, estuvieron entre los primeros candidatos por la dificultad que representa conseguir un injerto renal humano para los mismos. Distintos estudios demostraron que existe un reconocimiento del SLA por anticuerpos dirigidos contra el HLA, con una probabilidad mayor cuanto más elevado es el PARA (Oostingh et al., 2002; Díaz Varela et al., 2004). Sin embargo, la exposición de primates no humanos a antígenos SLA mediante el trasplante de diversos órganos sólidos no se ha asociado con una reactividad con el HLA (Key et al., 2004). Esto sugiere que la reacción cruzada de anticuerpos anti-HLA es consecuencia de secuencias homólogas filogenéticamente conservadas o un patrón común de selección de la región variable de los antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Gustafsson et al., 1990). Por el contrario, la respuesta anti-SLA está probablemente relacionada con la forma glicosilada de esta molécula y los antígenos glucídicos presentes en la misma (Chardon et al., 2000).

La reacción cruzada de los anticuerpos anti-hámster y anti-cerdo con células endoteliales también fue estudió de forma específica. El motivo es que previamente se había observado que, a diferencia de lo que ocurre con las inmunizaciones con sangre de hámster y cerdo en la rata, la inmunización con hematíes porcinos en primates no humanos producía xenoanticuerpos que reaccionaban de forma cruzada con células endoteliales humanas, pero no con linfocitos humanos (Máñez et al., 2009). Los resultados demostraron que los xenoanticuerpos anti-cerdo en la rata también reaccionan particularmente con células endoteliales humanas, ya que incluía niveles elevados de IgM e IgG, tanto en el protocolo de inmunización SC d.a. como en el SC s.a., mientras que sólo las IgM anti-hámster del protocolo SH d.a. reaccionaron de forma cruzada con estas células. Dado que este fenómeno también se observó tras la inmunización de ratones RIP-Tag2 con sangre de cerdo, se discute conjuntamente con éste en el siguiente apartado.

4.- Impacto de la inmunización xenogénica en la angiogénesis y tumorigénesis de ratones RIP-Tag2

La particular reacción cruzada de los xenoanticuerpos anti-cerdo IgG de la rata con las células endoteliales humanas, que incluía tanto anticuerpos naturales como inducidos, nos llevó a investigar un potencial efecto antiangiogénico en ratones RIP-Tag2, que desarrollan espontáneamente tumores angiogénicos de páncreas. Existían evidencias previas sugiriendo

que la inducción de anticuerpos xenogénicos policlonales IgG en ratones, mediante la inmunización con células endoteliales humanas, podía ser una inmunoterapia activa frente a distintos tumores murinos por un efecto antiangiogénico (Wei et al., 2000). El mecanismo inmunológico de esta reacción se consideró relacionado con la producción de anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), que se expresaba en células endoteliales de distintas especies. En nuestros estudios la inmunización con células endoteliales humanas también demostró la capacidad para disminuir la angiogénesis en ratones RIP-Tag2. Sin embargo, también se evidenció que la inmunización con sangre humana producía un efecto similar, que no estaba presente con la sangre de cerdo, lo que cuestionaba que fueran anticuerpos contra proteínas vinculadas con la angiogénesis las responsables del efecto antiangiogénico. Estas dudas fueron confirmadas por los estudios que demostraron que no existían cambios en el patrón de proteínas reconocidas por los xenoanticuerpos antes y después de la inmunización xenogénica. Además, los xenoanticuerpos presentes tras la inmunización con sangre humana también reconocían células tumorales no endoteliales y no exclusivamente estas últimas, lo que sugiere que los anticuerpos generados se dirigen contra carbohidratos expresados por las células endoteliales y tumorales.

Las células tumorales expresan en su superficie polisacáridos y carbohidratos que constituyen uno de los mecanismos más importantes que tienen estas células para evadir la vigilancia inmunológica (Monzavi-Karbassi et al., 2002; Xu et al., 2005). La razón parece ser que los carbohidratos tumorales, a diferencia de lo que ocurre con los bacterianos, son alteraciones de antígenos propios, con lo que el organismo no reacciona contra ellos. De ahí que aunque las vacunas contra antígenos glucídicos se consideran una excelente inmunoterapia contra el cáncer, de momento no ha producido éxitos clínicos (Slovin et al., 2005). Esto se debe en parte a la dificultad para romper la tolerancia contra los antígenos glucídicos tumorales, y también a la pobre inmunogenicidad que tienen los carbohidratos en general. La unión a péptidos y la utilización de adyuvantes han sido los mecanismos utilizados hasta el momento para mejorar la capacidad inmunogénica de los carbohidratos (Lucas et al., 2010). La utilización de antígenos unidos a hematíes es otro mecanismo que ha demostrado una mejoría de la respuesta inmunitaria humoral, consiguiendo en una sola inmunización respuestas iguales o superiores a las obtenidas con coadyuvantes (Murray et al., 2006). Esto sugiere que los hematíes xenogénicos combinan la presentación de antígenos glucídicos con la posibilidad de inducir una respuesta inmunitaria humoral sin necesidad de adyuvantes, tal

como hemos podido observar en nuestros estudios. El patrón de carbohidratos expresados difiere entre los hematíes de las distintas especies, de ahí que en el caso de tumores murinos sean las células humanas las que han demostrado una capacidad para producir xenoanticuerpos con capacidad antiangiogénica y antitumoral, la cual no está presente con las células porcinas.

La inmunización con sangre de cerdo demostró una vez más la capacidad de producir niveles elevados de xenoanticuerpos IgM e IgG que, aunque no reaccionaban con las células endoteliales o tumorales de los ratones RIP-Tag2, lo hacían con células endoteliales humanas. En nuestros estudios estos anticuerpos se generaron tanto en la rata y el ratón, y también existen evidencias de un fenómeno similar en primates no humanos (Máñez et al., 2009). Esto sugiere que los hematíes de cerdo producen xenoanticuerpos en distintas especies que reaccionan de forma cruzada específicamente con células endoteliales humanas. Los estudios de inhibición con aquellos carbohidratos que fueron reconocidos por los niveles más elevados de anticuerpos anti-cerdo en ratas mediante *glycoarray* no permitieron diferenciar ningún antígeno como posible responsable de esta reacción cruzada. Una posibilidad sería que el antígeno no estuviera relacionado con células endoteliales humanas en proliferación y tuviera que ver con la línea celular HMEC utilizada en las investigaciones. Se ha descrito la transmisión a líneas celulares humanas y de otras especies del ácido siálico glicolilneuramínico (NeuGc) a partir de los sueros animales utilizados para el mantenimiento de las mismas (Ghaderi et al., 2010). Sin embargo, los estudios de *glycoarray* en ratas no demostraron incrementos significativos en el reconocimiento de carbohidratos con este tipo de residuos tras la inmunización de ratas con sangre de cerdo. Tampoco las líneas endoteliales de rata utilizadas para investigar la autoreactividad, que también fueron expuestas a los mismos sueros de mantenimiento, fueron reconocidas por los xenoanticuerpos anti-cerdo. Esto sugiere que la reacción cruzada con células endoteliales humanas por xenoanticuerpos producidos en distintas especies tras la inmunización con hematíes de cerdo no está relacionada con el NeuGc. Independientemente de los antígenos reconocidos, nuestros estudios demuestran que la inmunización con hematíes de cerdo puede generar xenoanticuerpos que reconocen a las células endoteliales humanas y que podrían tener una potencial capacidad antiangiogénica en humanos.

CONCLUSIÓN

Las conclusiones de la presente tesis doctoral son:

Efecto de los anticuerpos anti- α Gal en la sepsis que se produce en ratones α Gal KO tras realizar una CLP

- Los ratones α Gal KO alcanzan espontáneamente elevados niveles de anticuerpos anti- α Gal que pueden ser inhibidos con la molécula GAS914.
- En ratones α Gal KO, la depleción de los anticuerpos anti- α Gal con GAS914, antes de realizar la CLP, conduce a una mayor supervivencia de la sepsis.
- En ratones α Gal KO, la depleción de los anticuerpos anti- α Gal con GAS914, 12 horas después de practicada la CLP, no mejora la supervivencia de la sepsis.

Impacto de la inmunización xenogénica en la sepsis que se produce en la rata Lewis tras realizar una CLP

- Las ratas inmunizadas con 3 inyecciones de sangre xenogénica en la misma semana, muestran en el día 5 un patrón de xenoanticuerpos en el que predominan las IgM sobre IgG.
- Las ratas que reciben 3 inyecciones de 1 ml de sangre xenogénica a intervalos de 15 días muestran en el día 40 un patrón de xenoanticuerpos en el que predominan las IgG sobre las IgM
- El modelo de sepsis tras CLP con aguja de 19G en rata Lewis es poco grave, con una supervivencia superior al 80%.
- La sepsis poco grave en rata Lewis en presencia de xenoanticuerpos con preeminencia de IgM se asocia con un agravamiento de la misma.
- La presencia de xenoanticuerpos con preeminencia de IgG no modifica la gravedad de la sepsis poco grave en rata Lewis.
- La inmunización xenogénica con sangre de hámster modifica los gérmenes aislados en la sangre tras CLP, pasando de un predominio de *E. coli* a *E. faecalis*.
- La sepsis por CLP poco grave en rata Lewis se asocia con un patrón de disminución de citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias.
- La inmunización xenogénica con sangre de hámster que genera predominantemente anticuerpos IgM puede inducir un patrón similar de disminución de citocinas, que no modifica la gravedad de la sepsis tras la CLP, o por el contrario un aumento de las mismas que se asocia con una mayor gravedad de la sepsis.
- Unos niveles basales inferiores de L-Selectina parecen determinar la respuesta de la inmunización xenogénica hacia un aumento de producción de citocinas, en la que la leptina desempeña un papel significativo.

Características de xenoanticuerpos presentes en la rata tras una inmunización xenogénica

- Los anticuerpos xenogénicos generados en la rata por la inmunización con sangre de hámster o de cerdo reaccionan de forma cruzada con *E. faecalis*, células de hámster o de cerdo, cuando no se han utilizado en la inmunización, así como células humanas y de conejo.
- Los xenoanticuerpos anti-cerdo muestran una particular reacción cruzada con las células endoteliales humanas.
- La inmunización de la rata con sangre de hámster o cerdo genera xenoanticuerpos contra múltiples antígenos glucídicos, con niveles más elevados y un mayor número de carbohidratos reconocidos por el subtipo IgG que por el IgM.
- No ha sido posible identificar ningún carbohidrato que sea responsable de la reacción cruzada de los xenoanticuerpos anti-hámster o anti-cerdo de la rata con células de otras especies.
- La melibiosa y ramnosa, parecen los responsables de la reacción cruzada de los xenoanticuerpos anti-hámster y anti-cerdo de la rata con *E. faecalis*.

Impacto de la inmunización xenogénica en la angiogénesis y tumorigénesis de ratones RIP-Tag2

- La xenoinmunización con células endoteliales o sangre humana, pero no la sangre porcina, produce xenoanticuerpos que reaccionan de forma cruzada con las células endoteliales y tumorales de ratones RIP-Tag2.
- Los xenoanticuerpo generados inhiben la angiogénesis tumoral en ratones RIP-Tag2.
- La xenoinmunización con sangre de cerdo en ratones induce xenoanticuerpos IgG que reaccionan de forma cruzada con células endoteliales humanas.

En el ámbito de las enfermedades infecciosas algunos anticuerpos naturales contra carbohidratos parecen favorecer la sepsis, por lo que la depleción de los mismos podría ser una nueva estrategia para prevenir la sepsis causada por enterobacterias. Por el contrario, la inmunización con hematíes xenogénicos inducen anticuerpos contra carbohidratos con efecto antiangiogénico y podría investigarse como inmunoterapia en el cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A K, Lichtman A H, Basic immunology. Functions and disorders of the immune system. W.B. Saunders, 2nd Edition, 2004.
- Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, Pryer NK, Cherrington JM. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2003^a; 2(5):471-478. [PubMed: 12748309]
- Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(6-7),1101–1110. [PubMed: 18243041]
- Adams JM, Cory S. Transgenic models of tumor development. *Science.* 1991; 254(5035):1161-1167. [PubMed: 1957168]
- Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb. Haemost.* 2009; 101(1),36–47. [PubMed: 19132187]
- Adjei AA, Jones JT, Riggs MW, Enriquez FJ. Evidence of thymus-independent local and systemic antibody responses to *Cryptosporidium parvum* infection in nude mice. *Infect Immun.* 1999; 67(8):3947–51. [PubMed: 10417160]
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(7):499–511. [PubMed: 15229469]
- Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.* 2002; 28(2):108-21. [PubMed: 11907653]
- Albrecht V, Hofer TP, Foxwell B, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock L. Tolerance induced via TLR2 and TLR4 in human dendritic cells: role of IRAK-1. *BMC Immunol.* 2008; 9:69. [PubMed: 19025640]
- Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol.* 2001; 11(1):15-23. [PubMed: 11243895]
- Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care.* 2002; 6(4):298–305. [PubMed: 12225603]
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; 29(7):1303-10. [PubMed: 11445675]
- Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med.* 2001; 29(7 suppl):S109-16. [PubMed: 11445744]
- Antal-Szalmás P. Evaluation of CD14 in host defence. *Eur J Clin Invest.* 2000; 30(2):167-179. [PubMed: 10651843]
- Autenrieth IB, Vogel U, Preger S, Heymer B, Heesemann J. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect Immun.* 1993; 61(6):2585–95. [PubMed: 8500896]
- Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today.* 2000; 21(9):418–20. [PubMed: 10953090]
- Baker PJ, Howe L, Garneau J, Roopenian DC. T cell knockout mice have diminished alveolar bone loss after oral infection with *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002; 34(1):45–50. [PubMed: 12208605]
- Balk RA. Pathogenesis and management of multiple organ dysfunction or failure in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Clin.* 2000; 16(2):337-352. [PubMed: 10768085]

- Barbeiro DF, Barbeiro HV, Faintuch J, Ariga SK, Mariano M, Popi AF, et al. B-1 cells temper endotoxemic inflammatory responses. *Immunobiology*. 2011; 216(3):302-308. [PubMed: 20817308]
- Baum M. The changing face of breast cancer--past, present and future perspectives. *Breast Cancer Res Treat*. 2002; 75 Suppl 1:S1-5; discussion S33-5. [PubMed: 12353817]
- Bay S, Fort S, Birikaki L, Ganneau C, Samain E, Coïc YM, et al. Induction of a melanoma-specific antibody response by a monovalent, but not a divalent, synthetic GM2 neoglycopeptide. *ChemMedChem*. 2009; 4(4):582-587. [PubMed: 19226501]
- Baz A, Carol H, Fernandez V, Mourglia-Ettlin G, Nieto A, Orn A, et al.. Echinococcus granulosus: induction of T-independent antibody response against protoscolex glycoconjugates in early experimental infection. *Exp Parasitol*. 2008; 119(4):460–6. [PubMed: 18585710]
- Bercault N, Boulain T, Kuteifan K, Wolf M, Runge I, Fleury JC. Obesity-related excess mortality rate in an adult intensive care unit: A risk-adjusted matched cohort study. *Crit Care Med*. 2004; 32(4):998-1003. [PubMed: 15071392]
- Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*. 1999; 284(5415):808-812. [PubMed: 10221914]
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001; 344(10):699–709. [PubMed: 11236773]
- Berns A. Cancer. Improved mouse models. *Nature*. 2001; 410(6832):1043-1044. [PubMed: 11323655]
- Bersztes A, Lorant T, Björkland A, Johnsson C, Tufveson G. Antibody responses to xenogenic antigens--a study in the mouse-to-rat system. *Tissue Antigens*. 2006; 68(6):483-488. [PubMed: 17176438]
- Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, Kajiji T, Del Fresno C, Yamamoto M, et al. Role for MyD88-independent, RIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *J. Immunol*. 2007; 179(6):4083–4092. [PubMed: 17785847]
- Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*. 2006; 107(5):2112-2122. [PubMed: 16269622]
- Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009; 30(10):475-487. [PubMed: 19781994]
- Bitsaktsis C, Nandi B, Racine R, MacNamara KC, Winslow G. T-Cell-independent humoral immunity is sufficient for protection against fatal intracellular ehrlichia infection. *Infect Immun*. 2007; 75(10):4933–41. [PubMed: 17664264]
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997; 121(1):235–243. [PubMed: 9228382]
- Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011; 306(23):2594-2605. [PubMed: 22187279]
- Borrow P, Tishon A, Lee S, Xu J, Grewal IS, Oldstone MB et al. CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8+ CTL response. *J Exp Med*. 1996; 183(5):2129–42. [PubMed: 8642323]
- Bovin N, Obukhova P, Shilova N, Rapoport E, Popova I, Navakouski M, et al. Repertoire of human natural anti-glycan immunoglobulins. Do we have auto-antibodies? *Biochim Biophys Acta*. 2012. [Epub ahead of print]. [PubMed: 22365885]

- Brooke MS. Conversion of immunological paralysis to immunity by endotoxin. *Nature*. 1965; 206(984):635–636. [PubMed: 4378605]
- Brouard S, Bouhours D, Sébille F, Ménoret S, Soullou JP, Vanhove B. Induction of anti-Forsman antibodies in the hamster-to-rat xenotransplantation model. *Transplantation*. 2000; 69(6):1193-1201. [PubMed: 10762226]
- Brun-Buisson C, Doyon F, Sollet JP, Cochard JF, Cohen Y, Nitenberg G. Prevention of intravascular catheter-related infection with newer chlorhexidine-silver sulfadiazine-coated catheters: a randomized controlled trial. *Intensive Care Med*. 2004; 30(5):837-43. [PubMed: 15060765]
- Bry L, Brenner MB. Critical role of T cell-dependent serum antibody, but not the gut-associated lymphoid tissue, for surviving acute mucosal infection with *Citrobacter rodentium*, an attaching and effacing pathogen. *J Immunol*. 2004; 172(1):433–41. [PubMed: 14688352]
- Buckley JM, Wang JH, Redmond HP. Cellular reprogramming by gram-positive bacterial components: a review. *J leukoc biol*. 2006; 80(4):731–741. [PubMed: 16885502]
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000; 407(6801):249-257. [PubMed: 11001068]
- Carrillo R, González JA. Inflamación-endotelio-coagulación en sepsis. *Conceptos actuales. Cir Ciruj*. 2002; 70: 433-44.
- Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16:545-68. [PubMed: 9597141]
- Casali P, Notkins AL: CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today*. 1989; 10(11): 364-368. [PubMed: 2482031]
- Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Cloëz-Tayarani I, Fitting C. Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. *J Endotoxin Res*. 2001; 7(2):85–93. [PubMed: 11521088]
- Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*. 2006; 10(5),233. [PubMed: 17044947]
- Cavaillon JM. “Septic Plasma”: an immunosuppressive milieu. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166(11):1417–1418. [PubMed: 12450929]
- Chardon P, Renard C, Gaillard CR, Vaiman M. The porcine major histocompatibility complex and related paralogous regions: a review. *Genet Sel Evol*. 2000; 32(2):109-128. [PubMed: 14736397]
- Chong AS, Ma LL, Yin D, Blinder L, Shen J, Williams JW. Tolerance of T-independent xeno-antibody responses in the hamster-to-rat xenotransplantation model is species-restricted but not tissue-specific. *Xenotransplantation*. 2000; 7(1):48-57. [PubMed: 10809057]
- Christou NV. Host-defence mechanisms in surgical patients: a correlative study of the delayed hypersensitivity skin-test response, granulocyte function and sepsis. *Can J Surg*. 1985; 28(1): 39-49. [PubMed: 3971221]
- Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2007; 20(4):345-52. [PubMed: 17609592]
- Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med*. 2009; 37(1):291-304. [PubMed: 19050640]
- Costa C, Zhao L, Decesare S, Fodor WL. Comparative analysis of three genetic modifications designed to inhibit human serum-mediated cytolysis. *Xenotransplantation*. 1999; 6(1):6-16. [PubMed: 10355728]

- Cramer DV. Natural antibodies and the host immune responses to xenografts. *Xenotransplantation*. 2000; 7(2):83-92. [PubMed: 10961291]
- Crampton SP, Voynova E, Bolland S. Innate pathways to B-cell activation and tolerance. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1183:58-68. [PubMed: 20146708]
- Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*. 2006; 27(8):352-7. [PubMed: 16807108]
- Dai WJ, Hemphill A, Waldvogel A, Ingold K, Deplazes P, Mossmann H, et al. Major carbohydrate antigen of *Echinococcus multilocularis* induces an immunoglobulin G response independent of alphabeta+ CD4+ T cells. *Infect Immun*. 2001; 69(10):6074–83. [PubMed: 11553545]
- Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest*. 1991; 99(1):169-175. [PubMed: 1984950]
- Davies A, Green C, Hutton J. 581 Severe sepsis: a European estimate of the burden of disease in ICU [oral presentation abstract from 14th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine, Geneva, Switzerland, 30 September-3 October 2001]. *Intensive Care Medicine*. 2001; 27(Suppl 2):S284. [PubMed: 11685318]
- Davies B, Cohen J. Endotoxin removal devices for the treatment of sepsis and septic shock. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(1):65-71. [PubMed: 21183148]
- Dawson CW, Ledgerwood AM, Rosenberg JC, Lucas CE. Anergy and altered lymphocyte function in the injured patient. *Am Surg*. 1982; 48(8):397–401. [PubMed: 7114609]
- Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*. 2010; 328(5979):745-748. [PubMed: 20448183]
- del Fresno C, García-Río F, Gómez-Piña V, Soares-Schanoski A, Fernández-Ruiz I, Jurado T, et al. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol*. 2009; 182(10):6494–6507. [PubMed: 19414804]
- del Fresno C, Gómez-Piña V, Lores V, Soares-Schanoski A, Fernández-Ruiz I, Rojo B, et al. Monocytes from cystic fibrosis patients are locked in an LPS tolerance state: down-regulation of TREM-1 as putative underlying mechanism. *PLoS One*. 2008; 3(7):e2667. [PubMed: 18628981]
- del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares-Schanoski A, Gómez-Piña V, González-León MC, Gómez-García L, et al. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res*. 2007; 13(1):39-52. [PubMed: 17621545]
- Díaz Varela I, Sánchez Mozo P, Centeno Cortés A, Alonso Blanco C, Valdés Cañedo F. Cross-reactivity between swine leukocyte antigen and human anti-HLA-specific antibodies in sensitized patients awaiting renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14(10):2677-2683. [PubMed: 14514748]
- Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR “homotolerance” versus “heterotolerance” on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol*. 2003; 170(1),508–519. [PubMed: 12496438]
- Draisma, A, Pickkers P, Bouw MP, van der Hoeven JG. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Crit. Care Med*. 2009; 37(4):1261–1267. [PubMed: 19242351]
- Escoll P, del Fresno C, García L, Vallés G, Lendínez MJ, Arnalich F, et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 311(2):465–472. [PubMed: 14592437]

- Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Peñuelas O, Lorente JA, Gordo F, et al. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med.* 2007; 35(5):1284-9. [PubMed: 17414725]
- Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(9):734-745. [PubMed: 17690708]
- Ferri LE, Chia S, Benay C, Giannias B, Christou NV. L-selectin shedding in sepsis limits leukocyte mediated microvascular injury at remote sites. *Surgery.* 2009; 145(4):384-391. [PubMed: 19303986]
- Ferri LE, Pascual J, Seely AJ, Chaudhury P, Christou NV. Soluble L-selectin attenuates tumor necrosis factor-alpha-mediated leukocyte adherence and vascular permeability: a protective role for elevated soluble L-selectin in sepsis. *Crit Care Med.* 2002; 30(8):1842-1847. [PubMed: 12163803]
- Ferri LE, Swartz D, Christou NV. Soluble L-selectin at levels present in septic patients diminishes leukocyte-endothelial cell interactions in mice in vivo: a mechanism for decreased leukocyte delivery to remote sites in sepsis. *Crit Care Med.* 2001; 29(1):117-122. [PubMed: 11176170]
- Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990; 49(2):186-196. [PubMed: 2199735]
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 1987; 235(4787):442-447. [PubMed: 2432664]
- Folkman J, Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285(21):1182-1186. [PubMed: 4938153]
- Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature.* 2007; 447(7147):972-978. [PubMed: 17538624]
- Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology.* 1997; 238(2):169-79. [PubMed: 9400590]
- Galili U, Anaraki F, Thall A, Hill-Balck C, Radic M. One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-gal antibody. *Blood.* 1993; 82(8):2485-93. [PubMed: 7691263]
- Galili U, Flechner I, Knyszynski A, Danon D, Rachmilewitz EA. The natural anti-alpha-galactosyl IgG on human normal senescent red blood cells. *Br J Haematol.* 1986; 62(2):317-324. [PubMed: 3947551]
- Galili U, Macher BA, Buehler J, Shohet SB. Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1----3)-linked galactose residues. *J Exp Med.* 1985; 162(2):573-582. [PubMed: 2410529]
- Galili U, Macher BA. Interaction between anti-Gal and human tumor cells: a natural defense mechanism? *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81(3):178-179. [PubMed: 2911082]
- Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB, Griffiss JM. Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun.* 1988; 56(7):1730-1707. [PubMed: 3290105]
- Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med.* 1984; 160(5):1519-1531. [PubMed: 6491603]
- Galili U. Conversion of tumors into autologous vaccines by intratumoral injection of α -Gal glycolipids that induce anti-Gal/ α -Gal epitope interaction. *Clin Dev Immunol.* 2011; 2011:134020. [PubMed: 22162709]
- Gannedahl G, Tufveson G. The impact of xenograft rejection on future grafting. *Transplant Proc.* 1992; 24(1):276-278. [PubMed: 1539281]

- Ganta RR, Cheng C, Wilkerson MJ, Chapes SK. Delayed clearance of Ehrlichia chaffeensis infection in CD4+ T-cell knockout mice. *Infect Immun*. 2004; 72(1):159–67. [PubMed: 14688093]
- Ghaderi D, Taylor RE, Padler-Karavani V, Diaz S, Varki A. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nat Biotechnol*. 2010; 28(8):863-867. [PubMed: 20657583]
- Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med*. 1972; 136(2):261-276. [PubMed: 5043412]
- Ginestà MM, Ribas Y, Mollevi DG, Vidal A, Máñez R, Figueras J, et al. Acute xenograft rejection, late xenograft rejection and long term survival xenografts in the hamster-to-rat heart transplantation model: histological characterisation under low-dose of FK506. *APMIS*. 2002; 110(10):737-45. [PubMed: 12583441]
- Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. *Immunology*. 1992; 76(1):20–23. [PubMed: 1321092]
- Goebel MU, Mills PJ. Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. *Psychosom Med*. 2000; 62(5):664-670. [PubMed: 11020096]
- González R, Charlemagne J, Mahana W, Avrameas S. Specificity of natural serum antibodies present in phylogenetically distinct fish species. *Immunology*. 1988; 63(1):31-6. [PubMed: 3338819]
- Goodman VL, Rock EP, Dagher R, Ramchandani RP, Abraham S, Gobburu JV, et al. Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(5):1367-1373: [PubMed: 17332278]
- Granucci F, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell biology. *Adv Immunol*. 2005; 88:193-233. [PubMed: 16227091]
- Greisman SE, Young EJ, Carozza FA Jr. Mechanisms of endotoxin tolerance. V. Specificity of the early and late phases of pyrogenic tolerance. *J Immunol*. 1969; 103(6):1223–1236. [PubMed: 4902894]
- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(5):361-370. [PubMed: 15122207]
- Guay HM, Mishra R, Garcea RL, Welsh RM, Szomolanyi-Tsuda E. Generation of protective T cell-independent antiviral antibody responses in SCID mice reconstituted with follicular or marginal zone B cells. *J Immunol*. 2009; 183(1):518–23. [PubMed: 19542462]
- Gustafsson K, Germana S, Hirsch F, Pratt K, LeGuern C, Sachs DH. Structure of miniature swine class II DRB genes: conservation of hypervariable amino acid residues between distantly related mammalian species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(24):9798-9802. [PubMed: 2124703]
- Hamadeh RM, Estabrook MM, Zhou P, Jarvis GA, Griffiss JM. Anti-Gal binds to pili of Neisseria meningitidis: the immunoglobulin A isotype blocks complement-mediated killing. *Infect Immun*. 1995; 63(12):4900-4906. [PubMed: 7591153]
- Hamadeh RM, Jarvis GA, Galili U, Mandrell RE, Zhou P, Griffiss JM. Human natural anti-Gal IgG regulates alternative complement pathway activation on bacterial surfaces. *J Clin Invest*. 1992; 89(4):1223-35. [PubMed: 1556184]
- Hammer C, Hingerle M. Development of preformed natural antibodies in gnotobiotic dogs and pigs, impact of food antigens on antibody specificity. *Transplant Proc*. 1992; 24(2):707-709. [PubMed: 1566492]

- Hanahan D, Christofori G, Naik P, Arbeit J. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenesis switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer*. 1996; 32A(14):2386-2393. [PubMed: 9059326]
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86(3):353-364. [PubMed: 8756718]
- Hanahan D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*. 1985; 315(6015):115-122. [PubMed: 2986015]
- Hancock LE, Gilmore MS. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(3):1574-1579. [PubMed: 11830672]
- Harvill ET, Osorio M, Loving CL, Lee GM, Kelly VK, Merkel TJ. Anamnestic protective immunity to *Bacillus anthracis* is antibody mediated but independent of complement and Fc receptors. *Infect Immun*. 2008; 76(5):2177-82. [PubMed: 18316379]
- Hasan R, Van den Bogaerde JB, Wallwork J, White DJ. Evidence that long-term survival of concordant xenografts is achieved by inhibition of antispecies antibody production. *Transplantation*. 1992; 54(3):408-13. [PubMed: 1412718]
- Hayashi EA, Akira S, Nobrega A. Role of TLR in B cell development: signaling through TLR4 promotes B cell maturation and is inhibited by TLR2. *J Immunol*. 2005; 174(11):6639-6647. [PubMed: 15905502]
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000; 408(6813):740-745. [PubMed: 11130078]
- Heyland DK, Hopman W, Coe H, Tranmer J, McColl MA. Long-term health-related quality of life in survivors of sepsis. Short Form 36: a valid and reliable measure of health-related quality of life. *Crit Care Med*. 2000; 28(11):3599-605. [PubMed: 11098960]
- Hodgking PD. Lymphocyte responses *in Vitro*. *Encyclopedia of Life Sciences* 2001, John Willey & Sons, Ltd. www.els.net
- Holst O, Müller-Loennies S. Microbial Polysaccharide Structures. *Comprehensive Glycoscience*, 2007; 1:123-179.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 348(2):138-150. [PubMed: 12519925]
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(11):813-22. [PubMed: 17039247]
- Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005; 24(Suppl 1):52-57. [PubMed: 16374373]
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350(23):2335-2342. [PubMed: 15175435]
- Iankov ID, Pandey M, Harvey M, Griesmann GE, Federspiel MJ, Russell SJ. Immunoglobulin g antibody-mediated enhancement of measles virus infection can bypass the protective antiviral immune response. *J Virol*. 2006; 80(17):8530-8540. [PubMed: 16912303]
- Iñigo J, Sendra JM, Díaz R, Bouza C, Sarría-Santamera A. Epidemiology and costs of severe sepsis in Madrid. A hospital discharge study. *Med Intensiva*. 2006; 30(5):197-203. [PubMed: 16938192]
- Ji P, Xia GL, Waer M. Absence of cross-reactivity between xenoantibodies directed against concordant or discordant xenoantigens in rats. *Transplant Proc*. 2000; 32(5):861. [PubMed: 10936246]

- Katapodis AG, Warner RG, Duthaler RO, Streiff MB, Bruelisauer A, Kretz O, et al. Removal of anti-Gal α 1,3Gal xenoantibodies with an injectable polymer. *J Clin Invest*. 2002; 110(12):1869-1877. [PubMed: 12488437]
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*. 2006; 13,816–825. [PubMed: 16410796]
- Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth Analg*. 2001; 92(5):1322–1326. [PubMed: 11323370]
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. 2000; 21(3):505-515. [PubMed: 10688871]
- Key T, Schuurman HJ, Taylor CJ. Does exposure to swine leukocyte antigens after pig-to-nonhuman primate xenotransplantation provoke antibodies that cross-react with human leukocyte antigens? *Xenotransplantation*. 2004; 11(5):452-456. [PubMed: 15303982]
- Kim KD, Zhao J, Auh S, Yang X, Du P, Tang H, et al. Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat Med*. 2007; 13(10):1248-1252. [PubMed: 17891146]
- Komori K, Fuchimoto Y, Morikawa Y, Obara H, Kawachi S, Tanabe M, et al. The role of graft and host accommodation in a hamster-to-rat cardiac transplantation model. *Transplantation*. 2008; 85(1):112-117. [PubMed: 18192920]
- Kuang DM, Wu Y, Chen N, Cheng J, Zhuang SM, Zheng L. Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. *Blood*. 2007; 110(2),587–595. [PubMed: 17395778]
- Kurokawa Y, Shinkai S, Torii J, Hino S, Shek PN. Exercise-induced changes in the expression of surface adhesion molecules on circulating granulocytes and lymphocytes subpopulations. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1995; 71(2-3):245-252. [PubMed: 7588696]
- Kwon AH, Qiu Z, Nagahama H, Kaibori M, Kamiyama Y. Fibronectin suppresses apoptosis and protects mice from endotoxic shock. *Transplant Proc*. 2004; 36(8):2432–2435. [PubMed: 15561270]
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002; 295(5557):1089-1092. [PubMed: 11778012]
- Lee BO, Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Hartson L, Makris M, Sprague F, et al. CD4 T cell-independent antibody response promotes resolution of primary influenza infection and helps to prevent reinfection. *J Immunol*. 2005; 175(9):5827–38. [PubMed: 16237075]
- Lehner MD, Ittner J, Bundschuh DS, van Rooijen N, Wendel A, Hartung T. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect Immun*. 2001; 69(1):463-471. [PubMed: 11119538]
- León P, Redmond HP, Shou J, Daly JM. Interleukin 1 and its relationship to endotoxin tolerance. *Arch Surg*. 1992; 127(2):146-151 [PubMed: 1311550]
- Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell*. 2004; 116(2 Suppl):S67-S69. [PubMed: 15055586]
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003; 29(4):530-8. [PubMed: 12664219]
- Liles WC. Immunomodulatory approaches to augment phagocyte-mediated host defense for treatment of infectious diseases. *Semin Respir Infect*. 2001; 16(1):11–7. [PubMed: 11309708]

- Liu YY, Lee CH, Dedaj R, Zhao H, Mrabat H, Sheidlin A et al. High-molecular-weight hyaluronan—a possible new treatment for sepsis-induced lung injury: a preclinical study in mechanically ventilated rats. *Crit Care*. 2008; 12(4):R102. [PubMed: 18691420]
- Logtenberg T. Properties of polyreactive natural antibodies to self and foreign antigens. *J Clin Immunol*. 1990; 10(3):137-40. [PubMed: 1694859]
- Lopez T, Hanahan D. Elevated levels of IGF-1 receptor convey invasive and metastatic capability in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2002; 1(4):339-353. [PubMed: 12086849]
- Lucas AH, Rittenhouse-Olson K, Kronenberg M, Apicella MA, Wang D, Schreiber JR, Taylor CE. Carbohydrate Moieties as Vaccine Candidates: meeting summary. *Vaccine*. 2010; 28(4):1121-1131. [PubMed: 18579261]
- Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005; 6(12):1182–1190. [PubMed: 16369557]
- Mages J, Dietrich H, Lang R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology*. 2007; 212(9-10):723-737. [PubMed: 18086374]
- Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Hüser N, et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock*. 2004; 21(6):505-511. [PubMed: 15167678]
- Maloy KJ, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Interferon gamma-producing gammadelta T cell-dependent antibody isotype switching in the absence of germinal center formation during virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(3):1160–5. [PubMed: 9448302]
- Máñez R, Blanco FJ, Diaz I, Centeno A, Lopez-Pelaez E, Hermida M, et al. Removal of bowel aerobic gram-negative bacteria is more effective than immunosuppression with cyclophosphamide and steroids to decrease natural alpha-galactosyl IgG antibodies. *Xenotransplantation*. 2001; 8(1):15-23. [PubMed: 11208187]
- Máñez R, Lopez-Pelaez E, Centeno A, Herrera JM, Juffe A, Domenech N, et al. Transgenic expression in pig hearts of both human decay-accelerating factor and human membrane cofactor protein does not provide an additional benefit to that of human decay-accelerating factor alone in pig-to-baboon xenotransplantation. *Transplantation*. 2004; 78(6):930-933. [PubMed: 15385816]
- Máñez R, Moscoso I, Costa C, Centeno A, Lopez-Pelaez E, Domenech N. Xenoantibodies to non- α gal antigens in baboons do not target pig proteins. *Xenotransplantation*. 2009; 16:381.
- Marie C, Cavaillon JM, Losser MR. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*. 1996; 125(6): 520–521. [PubMed: 8779480]
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003; 348(16):1546-54. [PubMed: 12700374]
- Matheu MP, Su Y, Greenberg ML, Blanc CA, Parker I, Scott DW, et al. Toll-like receptor 4-activated B cells out-compete Toll-like receptor 9-activated B cells to establish peripheral immunological tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(20):E1258-1266. [PubMed: 22511718]
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296(5566):301-5. [PubMed: 11951032]
- McKisic MD, Barthold SW. T-cell-independent responses to *Borrelia burgdorferi* are critical for protective immunity and resolution of lyme disease. *Infect Immun*. 2000; 68(9):5190–7. [PubMed: 10948143]

- Meakins JL, Pietsch JB, Bubenick O, Kelly R, Rode H, Gordon J, et al. Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg.* 1977; 186(3):241–250. [PubMed: 142452]
- Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J. Immunol.* 2000; 164(11):5564–5574. [PubMed: 10820230]
- Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(1):327-337. [PubMed: 12538485]
- Miller CL, Baker CC. Changes in lymphocyte activity after thermal injury. The role of suppressor cells. *J Clin Invest.* 1979; 63(2): 202–210. [PubMed: 155076]
- Minanov OP, Itescu S, Neethling FA, Morgenthau AS, Kwiatkowski P, Cooper DK, et al. Anti-GaL IgG antibodies in sera of newborn humans and baboons and its significance in pig xenotransplantation. *Transplantation.* 1997; 63(2):182-186. [PubMed: 9020315]
- Misas M, Hernández A, Iraola M D, La disfunción orgánica múltiple un síndrome de relevancia en nuestra práctica. Aspectos etiológicos y fisiopatológicos-I. *Electron J Biomed.* 2005; 2:23-38.
- Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol.* 1995; 13:665-692. [PubMed: 7612238]
- Monneret, G. Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohé J, Bienvenu J, et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol. Lett.* 2004; 95(2):193–198. [PubMed: 15388260]
- Monzavi-Karbassi B, Cunto-Amesty G, Luo P, Kieber-Emmons T. Use of surrogate antigens as vaccines against cancer. *Hybrid Hybridomics.* 2002; 21(2):103-109. [PubMed: 12031099]
- Munford RS, Pugin J. Normal response to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(2):316–321. [PubMed: 11179099]
- Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J. Clin. Invest.* 1991; 88(5):1747–1754. [PubMed: 1939659]
- Munoz C, Misset B, Fitting C, Blériot JP, Carlet J, Cavaillon JM. Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21(9):2177–2184. [PubMed: 1889462]
- Murray AM, Pearson IF, Fairbanks LD, Chalmers RA, Bain MD, Bax BE. The mouse immune response to carrier erythrocyte entrapped antigens. *Vaccine.* 2006; 24(35-36):6129-6139. [PubMed: 16765492]
- Nduka OO, Parrillo JE. The pathophysiology of septic shock. *Crit Care Clin.* 2009; 25(4):677-702, vii [PubMed: 19892247]
- Ni Y, Powell R, Turner DD, Tizard I. Specificity and prevalence of natural bovine anti-alpha galactosyl (Gal α 1-6Glc or Gal α 1-6Gal) antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7(3):490-496. [PubMed: 10799466]
- Niehaus GD, Ervin E, Patel A, Khanna K, Vanek VW, Fagan DL. Circadian variation in cell-adhesion molecule expression by normal human leukocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002; 80(10):935-940. [PubMed: 12450059]
- Nosanchuk JD, Rosas AL, Casadevall A. The antibody response to fungal melanin in mice. *J Immunol.* 1998; 160(12):6026–31. [PubMed: 9637518]

- O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, Ngai TJ, Louie SG, Yee KW et al., SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*. 2003; 101(9):3597-3605. [PubMed: 12531805]
- Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, et al. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*. 1999; 286(5447):2156-9. [PubMed: 10591647]
- Ogawa H, Rafiee P, Heidemann J, Fisher PJ, Johnson NA, Otterson MF, et al. Mechanisms of endotoxin tolerance in human intestinal microvascular endothelial cells. *J Immunol*. 2003; 170(12):5956-5964. [PubMed: 12794122]
- Oostingh GJ, Davies HF, Tang KC, Bradley JA, Taylor CJ. Sensitisation to swine leukocyte antigens in patients with broadly reactive HLA specific antibodies. *Am J Transplant*. 2002; 2(3):267-273. [PubMed: 12096790]
- Opal SM, Glück T. Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med*. 2003; 31(Suppl. 1):S57-S64. [PubMed: 12544978]
- Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis*. 1999; 180(5):1584-1589. [PubMed: 10515819]
- Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttrop N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost*. 2009; 102:1103-9. [PubMed: 19967140]
- Parangi S, Dietrich W, Christofori G, Lander ES, Hanahan D. Tumor suppressor loci on mouse chromosomes 9 and 16 are lost at distinct stages of tumorigenesis in a transgenic model of islet cell carcinoma. *Cancer Res*. 1995; 55(24):6071-6076. [PubMed: 8521395]
- Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg*. 2001; 88(1):22-30. [PubMed: 11136305]
- Pazur JH, Anderson JS, Karakawa WW. Glycans from streptococcal cell walls. Immunological and chemical properties of a new diheteroglycan from *Streptococcus faecalis*. *J Biol Chem*. 1971; 246(6):1793-1798. [PubMed: 4993959]
- Pérez-Fontán M, Lueiro F. Escherichia coli peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis: a serious problem that may get worse. *Perit Dial Int*. 2006; 26(2):174-177. [PubMed: 16623419]
- Perl TM, Dvorak L, Hwang T, Wenzel RP. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *JAMA*. 1995; 274:338-45. [PubMed: 7609265]
- Piot P, Coll Seck AM. International response to the HIV/AIDS epidemic: planning for success. *Bull World Health Organ*. 2001; 79(12):1106-12. [PubMed: 11799442]
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998; 282(5396):2085-8. [PubMed: 9851930]
- Pone EJ, Zan H, Zhang J, Al-Qahtani A, Xu Z, Casali P. Toll-like receptors and B-cell receptors synergize to induce immunoglobulin class-switch DNA recombination: relevance to microbial antibody responses. *Crit Rev Immunol*. 2010; 30(1):1-29. [PubMed: 20370617]
- Pridmore AC, Wyllie DH, Abdillahi F, Steeghs L, van der Ley P, Dower SK, et al. A lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via toll-like receptor (TLR) 2 but not via TLR4/MD2. *J Infect Dis*. 2001; 183(1):89-96. [PubMed: 11076707]

- Pritts T, Hungness E, Wang Q, Robb B, Hershko D, Hasselgren PO. Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia-role of transcription factors and regulation by the stress response. *Am J Surg*. 2002; 183(4): 372-83. [PubMed: 11975924]
- Quan CP, Berneman A, Pires R, Avrameas S, Bouvet JP. Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. *Infect Immun*. 1997; 65(10):3997-4004. [PubMed: 9316998]
- Ravindranath TM, Goto M, Iqbal O, Florian-Kujawski M, Hoppensteadt D, Hammadeh R, et al. Plasma thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and tissue factor pathway inhibitor changes following sepsis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2007; 13(4):362-368. [PubMed: 17911187]
- Rayhane N, Fitting C, Lortholary O, Dromer F, Cavaillon JM. Administration of endotoxin associated with lipopolysaccharide tolerance protects mice against fungal infection. *Infect Immun*. 2000; 68(6):3748-3753. [PubMed: 10816541]
- Remick DG. Cytokine therapeutics for the treatment of sepsis: why has nothing worked? *Curr Pharm Des*. 2003; 9(1):75-82. [PubMed: 12570677]
- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 2008; 4(1):31-36. [PubMed: 19131954]
- Robinson WE Jr, Montefiori DC, Mitchell WM. Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Lancet*. 1988; 1(8589):790-794. [PubMed: 2895317]
- Ross JR, Kirk AD, Ibrahim SE, Howell DN, Baldwin WM3rd, Sanfilippo FP. Characterization of human anti-porcine "natural antibodies" recovered from ex vivo perfused hearts--predominance of IgM and IgG2. *Transplantation*. 1993; 55(5):1144-50. [PubMed: 8497896.]
- Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Mühlradt PF, Takeda K, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol*. 2000; 165(12):7096-7101. [PubMed: 11120839]
- Sato S, Takeuchi O, Fujita T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int. Immunol*. 2002; 14(7):783-791. [PubMed: 12096038]
- Scappaticci FA, Contreras A, Boswell CA, Lewis JS, Nolan G. Polyclonal antibodies to xenogeneic endothelial cells induce apoptosis and block support of tumor growth in mice. *Vaccine*. 2003;21(19-20):2667-77. [PubMed: 12744904]
- Schietinger A, Philip M, Schreiber H. Specificity in cancer immunotherapy. *Semin Immunol*. 2008; 20(5):276-285. [PubMed: 18684640]
- Séveno C, Coulon F, Haspot F, Mérieau E, Renaudin K, Martinet B, et al. Induction of regulatory cells and control of cellular but not vascular rejection by costimulation blockade in hamster-to-rat heart xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2007; 14(1):25-33. [PubMed: 17214702]
- Sha Z, Compans RW. Induction of CD4(+) T-cell-independent immunoglobulin responses by inactivated influenza virus. *J Virol*. 2000; 74(11):4999-5005. [PubMed: 10799573]
- Shann F. Heterologous immunity and the nonspecific effects of vaccines: a major medical advance? *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23(6): 555-8. [PubMed: 15194839]
- Shapiro NI, Khankin EV, Van Meurs M, Shih SC, Lu S, Yano M, et al. Leptin exacerbates sepsis-mediated morbidity and mortality. *J Immunol*. 2010; 185(1):517-24. [PubMed: 20519646]
- Slovin SF, Keding SJ, Ragupathi G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunol Cell Biol*. 2005; 83(4):418-428. [PubMed: 16033538]
- Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26:261-292. [PubMed: 18370922]

- Stengel D, Bauwens K, Keh D, Gerlach H, Ekkernkamp A, Tauber R, et al. Prognostic value of an early soluble L-selectin (sCD62L) assay for risk assessment in blunt multiple trauma: a metaanalysis. *Clin Chem*. 2005; 51(1):16-24. [PubMed: 15550474]
- Sugii S, Hirota Y. Identification and characterization of the major carbohydrate-binding proteins in chicken serum as immunoglobulins. *J Vet Med Sci*. 1993; 55(1):125-128. [PubMed: 8461405]
- Sugii S, Hirota Y. Isolation and hemagglutinating activities of bovine immunoglobulins reactive with melibiose. *Nihon Juigaku Zasshi*. 1990; 52(5):939-945. [PubMed: 2280503]
- Szomolanyi-Tsuda E, Brien JD, Dorgan JE, Garcea RL, Woodland RT, Welsh RM. Antiviral Tcell-independent type 2 antibody responses induced in vivo in the absence of T and NK cells. *Virology*. 2001; 280(2):160–8. [PubMed: 11162830]
- Szomolanyi-Tsuda E, Seedhom MO, Carroll MC, Garcea RL. T cell-independent and T cell-dependent immunoglobulin G responses to polyomavirus infection are impaired in complement receptor 2-deficient mice. *Virology*. 2006; 352(1):52–60. [PubMed: 16733062]
- Ueda Y, Liao D, Yang K, Patel A, Kelsoe G. T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J Immunol*. 2007; 178(6):3593-3601. [PubMed: 17339456]
- Van Dyke T, Jakcs T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell*. 2002; 108(2):135-144. [PubMed: 11832204]
- Van Oss CJ. “Natural” versus regular antibodies. *Protein J*. 2004; 23(6):357. [PubMed: 15517982]
- VanCott JL, McNeal MM, Flint J, Bailey SA, Choi AH, Ward RL. Role for T cell-independent B cell activity in the resolution of primary rotavirus infection in mice. *Eur J Immunol*. 2001; 31(11):3380–7. [PubMed: 11745356]
- Vaugelade J, Pinchinat S, Guiella G, Elguero E, Simondon F. Non-specific effects of vaccination on child survival: prospective cohort study in Burkina Faso. *BMJ*. 2004; 329(7478):1309. [PubMed: 15550402]
- Vincent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173(3):256-63. [PubMed: 16239619]
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006; 34(2):344-53. [PubMed: 16424713]
- Vlad AM, Finn OJ. Glycoprotein tumor antigens for immunotherapy of breast cancer. *Breast Dis*. 2004; 20:73-79. [PubMed: 15687709]
- Vodovotz Y, Chow CC, Bartels J, Lagoa C, Prince JM, Levy RM et al. In silico models of acute inflammation in animals. *Shock*. 2006; 26(3):235-44. [PubMed: 16912648]
- Volk HD, Reinke P, Döcke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol*. 2000; 74:162–177. [PubMed: 10608087]
- Vollmers HP, Brändlein S. Natural antibodies and cancer. *J Autoimmun*. 2007; 29(4):295-302. [PubMed: 17826951]
- Wang H, Zhu S, Ward MF, Gong J, Sama AE. Hyperglycemia aggravates endotoxin-induced high mobility group box 1 protein release: yet another reason not to be too sweet. *Crit Care Med*. 2008; 36(8):2475–2476. [PubMed: 18664811]
- Wei YQ, Wang QR, Zhao X, Yang L, Tian L, Lu Y, et al. Immunotherapy of tumors with xenogeneic endothelial cells as a vaccine. *Nat Med*. 2000; 6(10):1160-1166. [PubMed: 11017149]
- Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol*. 1993; 10(4):302-313. [PubMed: 7511250]

- West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med.* 2002; 30(1 Suppl):S64-73. [PubMed: 11782563]
- Wetter LA, Hamadeh RM, Griffiss JM, Oesterle A, Aagaard B, Way LW. Differences in outer membrane characteristics between gallstone-associated bacteria and normal bacterial flora. *Lancet.* 1994; 343(8895):444-448. [PubMed: 7905954]
- Weycker D, Akhras KS, Edelsberg J, Angus DC, Oster G. Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2003; 31(9):2316-23. [PubMed: 14501962]
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004; 64(19):7099-7109. [PubMed: 15466206]
- Willey S, Aasa-Chapman MM, O'Farrell S, Pellegrino P, Williams I, Weiss RA, et al. Extensive complement-dependent enhancement of HIV-1 by autologous non-neutralising antibodies at early stages of infection. *Retrovirology.* 2011; 8:16. [PubMed: 21401915]
- Witjes JA. Bladder carcinoma in situ in 2003: state of the art. *Eur Urol.* 2004; 45(2):142-6. [PubMed: 14733997]
- Xu Y, Sette A, Sidney J, Gendler SJ, Franco A. Tumor-associated carbohydrate antigens: a possible avenue for cancer prevention. *Immunol Cell Biol.* 2005; 83(4):440-448. [PubMed: 16033540]
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000; 407(6801):242-248. [PubMed: 11001067]
- Yin D, Ma LL, Blinder L, Shen J, Sankary H, Williams JW, et al. Induction of species-specific host accommodation in the hamster-to-rat xenotransplantation model. *J Immunol.* 1998; 161(4):2044-2051. [PubMed: 9712078]
- Yousef AA, Amr YM, Suliman GA. The diagnostic value of serum leptin monitoring and its correlation with tumor necrosis factor-alpha in critically ill patients: a prospective observational study. *Crit Care.* 2010; 14(2):R33. [PubMed: 20230641]
- Zhang X, Rodríguez ME, Harvill ET. O antigen allows *B. paraptussis* to evade *B. pertussis* vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies. *PLoS One.* 2009; 4(9):e6989. [PubMed: 19750010]

ANEXOS

Anexo 1. Glycoarray (versión 4.2) del Consortium for Functional Glycomics.

Número	Estructura de carbohidrato
1	Gal α -Sp8
2	Glc α -Sp8
3	Man α -Sp8
4	GalNAc α -Sp8
5	GalNAc α -Sp15
6	Fuc α -Sp8
7	Fuc α -Sp9
8	Rha α -Sp8
9	Neu5Ac α -Sp8
10	Neu5Ac α -Sp11
11	Neu5Ac β -Sp8
12	Gal β -Sp8
13	Glc β -Sp8
14	Man β -Sp8
15	GalNAc β -Sp8
16	GlcNAc β -Sp0
17	GlcNAc β -Sp8
18	GlcN(Gc) β -Sp8
19	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc α -Sp8
20	GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-4)(GlcNAc β 1-6)GlcNAc-Sp8
21	[3OSO ₃][6OSO ₃]Gal β 1-4[6OSO ₃]GlcNAc β -Sp0
22	[3OSO ₃][6OSO ₃]Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
23	[3OSO ₃]Gal β 1-4(Fuc α 1-3)[6OSO ₃]Glc-Sp0
24	[3OSO ₃]Gal β 1-4Glc β -Sp8
25	[3OSO ₃]Gal β 1-4[6OSO ₃]Glc β -Sp0
26	[3OSO ₃]Gal β 1-4[6OSO ₃]Glc β -Sp8
27	[3OSO ₃]Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -Sp8
28	[3OSO ₃]Gal β 1-3GalNAc α -Sp8
29	[3OSO ₃]Gal β 1-3GlcNAc β -Sp0
30	[3OSO ₃]Gal β 1-3GlcNAc β -Sp8
31	[3OSO ₃]Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-Sp0
32	[3OSO ₃]Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -Sp8
33	[3OSO ₃]Gal β 1-4[6OSO ₃]GlcNAc β -Sp0
34	[3OSO ₃]Gal β 1-4[6OSO ₃]GlcNAc β -Sp8
35	[3OSO ₃]Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
36	[3OSO ₃]Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
37	[3OSO ₃]Gal β -Sp8
38	[4OSO ₃][6OSO ₃]Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
39	[4OSO ₃]Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
40	6-H ₂ PO ₃ Man α -Sp8
41	[6OSO ₃]Gal β 1-4Glc β -Sp0
42	[6OSO ₃]Gal β 1-4Glc β -Sp8
43	[6OSO ₃]Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
44	[6OSO ₃]Gal β 1-4[6OSO ₃]Glc β -Sp8
45	Neu5Ac α 2-3[6OSO ₃]Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
46	[6OSO ₃]GlcNAc β -Sp8
47	[9NAc]Neu5Ac α -Sp8
48	[9NAc]Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8

Número	Estructura de carbohidrato
49	Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
50	Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp13
51	GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
52	GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp13
53	Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
54	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -N(LT)AVL
55	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
56	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp13
57	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α -Sp9
58	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -Sp9
59	Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -Sp8
60	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α -Sp8
61	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α -Sp14
62	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Sp0
63	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Sp9
64	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -Sp8
65	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -Sp10
66	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -Sp0
67	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -Sp8
68	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -Sp0
69	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -Sp0
70	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -Sp0
71	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -Sp8
72	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
73	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
74	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
75	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
76	Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc β -Sp0
77	Fuc α 1-2Gal β -Sp8
78	Fuc α 1-3GlcNAc β -Sp8
79	Fuc α 1-4GlcNAc β -Sp8
80	Fuc β 1-3GlcNAc β -Sp8
81	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β -Sp0
82	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -Sp0
83	[3OSO3]Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc-Sp0
84	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
85	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
86	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4Glc β -Sp0
87	GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -Sp8
88	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -Sp8
89	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -Sp18
90	GalNAc α 1-3GalNAc β -Sp8
91	GalNAc α 1-3Gal β -Sp8
92	GalNAc α 1-4(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
93	GalNAc β 1-3GalNAc α -Sp8
94	GalNAc β 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -Sp8
95	GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
96	GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -Sp0
97	GalNAc β 1-4GlcNAc β -Sp0

Número	Estructura de carbohidrato
98	GalNAc β 1-4GlcNAc β -Sp8
99	Gal α 1-2Gal β -Sp8
100	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GlcNAc β -Sp0
101	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GlcNAc β -Sp8
102	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -Sp0
103	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -Sp8
104	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc-Sp0
105	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4Glc β -Sp0
106	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β -Sp8
107	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β -Sp18
108	Gal α 1-3(Gal α 1-4)Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
109	Gal α 1-3GalNAc α -Sp8
110	Gal α 1-3GalNAc α -Sp16
111	Gal α 1-3GalNAc β -Sp8
112	Gal α 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -Sp8
113	Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -Sp0
114	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
115	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -Sp0
116	Gal α 1-3Gal β -Sp8
117	Gal α 1-4(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
118	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
119	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
120	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -Sp0
121	Gal α 1-4GlcNAc β -Sp8
122	Gal α 1-6Glc β -Sp8
123	Gal β 1-2Gal β -Sp8
124	Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -Sp0
125	Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
126	Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β -Sp0
127	Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β -Sp8
128	Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc-Sp8
129	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6GalNAc α -Sp8
130	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -Sp8
131	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-Sp14
132	Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α -Sp8
133	Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α -Sp14
134	Gal β 1-3(Neu5Ac β 2-6)GalNAc α -Sp8
135	Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β -Sp10
136	Gal β 1-3GalNAc α -Sp8
137	Gal β 1-3GalNAc α -Sp14
138	Gal β 1-3GalNAc α -Sp16
139	Gal β 1-3GalNAc β -Sp8
140	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -Sp0
141	Gal β 1-3GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Sp0
142	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β -Sp8
143	Gal β 1-3Gal β -Sp8
144	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
145	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -Sp10
146	Gal β 1-3GlcNAc β -Sp0
147	Gal β 1-3GlcNAc β -Sp8
148	Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -Sp0

Número	Estructura de carbohidrato
149	Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp8
150	Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-4Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp0
151	Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-4Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-4Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp0
152	Galβ1-4[6OSO3]Glcβ-Sp0
153	Galβ1-4[6OSO3]Glcβ-Sp8
154	Galβ1-4GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
155	Galβ1-4GalNAcβ1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
156	Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp8
157	Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
158	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp0
159	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
160	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
161	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Sp0
162	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Sp8
163	Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp8
164	Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAcα-Sp8
165	Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-Sp14
166	Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
167	Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
168	Galβ1-4Glcβ-Sp0
169	Galβ1-4Glcβ-Sp8
170	GlcNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
171	GlcNAcα1-6Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
172	GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNAcα-Sp8
173	GlcNAcβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAcα-Sp8
174	GlcNAcβ1-3(GlcNAcβ1-6)Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
175	GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp8
176	GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
177	GlcNAcβ1-3Galβ-Sp8
178	GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
179	GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
180	GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
181	GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Sp0
182	GlcNAcβ1-4-MDPLys
183	GlcNAcβ1-4(GlcNAcβ1-6)GalNAcα-Sp8
184	GlcNAcβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
185	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4β-Sp8
186	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp8
187	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp8
188	GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-Sp8
189	GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp8
190	GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
191	GlcNAcβ1-6Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
192	Glcα1-4Glcβ-Sp8
193	Glcα1-4Glcα-Sp8
194	Glcα1-6Glcα1-6Glcβ-Sp8
195	Glcβ1-4Glcβ-Sp8
196	Glcβ1-6Glcβ-Sp8
197	G-ol-Sp8
198	Glcα-Sp8
199	Glcβ-Sp8

Número	Estructura de carbohidrato
200	GlcA β 1-3Gal β -Sp8
201	GlcA β 1-6Gal β -Sp8
202	KDN α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -Sp0
203	KDN α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
204	Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3Man α -Sp9
205	Man α 1-2Man α 1-3(Man α 1-2Man α 1-6)Man α -Sp9
206	Man α 1-2Man α 1-3Man α -Sp9
207	Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
208	Man α 1-2Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
209	Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3(Man α 1-2Man α 1-3(Man α 1-2Man α 1-6)Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
210	Man α 1-3(Man α 1-6)Man α -Sp9
211	Man α 1-3(Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-6)Man α -Sp9
212	Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
213	Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
214	Man β 1-4GlcNAc β -Sp0
215	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc-Sp0
216	[3OSO3]Gal β 1-4(Fuca1-3)[6OSO3]GlcNAc-Sp8
217	Fuca1-2[6OSO3]Gal β 1-4GlcNAc-Sp0
218	Fuca1-2Gal β 1-4[6OSO3]GlcNAc-Sp8
219	Fuca1-2[6OSO3]Gal β 1-4[6OSO3]Glc-Sp0
220	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -Sp8
221	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -Sp14
222	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -Sp0
223	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -Sp0
224	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -Sp0
225	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -Sp0
226	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α -Sp8
227	Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -Sp8
228	Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
229	Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4GlcNAc β -Sp8
230	Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -Sp0
231	Neu5Ac α 2-3(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -Sp0
232	Neu5Ac α 2-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α -Sp8
233	Neu5Ac α 2-3GalNAc α -Sp8
234	Neu5Ac α 2-3GalNAc β 1-4GlcNAc β -Sp0
235	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3[6OSO3]GlcNAc-Sp8
236	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β -Sp8
237	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -Sp0
238	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4)GlcNAc β -Sp8
239	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3[6OSO3]GalNAc α -Sp8
240	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α -Sp8
241	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α -Sp14
242	Neu5Ac α 2-3Gal β -Sp8
243	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -Sp0
244	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -Sp0
245	Fuca1-2[6OSO3]Gal β 1-4Glc-Sp0
246	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -Sp0
247	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -Sp8
248	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[6OSO3]GlcNAc β -Sp8

Número	Estructura de carbohidrato
249	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)[6OSO3]GlcNAcβ-Sp8
250	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp0
251	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp0
252	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp8
253	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3Galβ-Sp8
254	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
255	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
256	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
257	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
258	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
259	Fuca1-2Galβ1-4[6OSO3]Glc-Sp0
260	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-Sp0
261	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-Sp8
262	Neu5Acα2-6GalNAcα-Sp8
263	Neu5Acα2-6GalNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp0
264	Neu5Acα2-6Galβ1-4[6OSO3]GlcNAcβ-Sp8
265	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
266	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
267	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp0
268	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
269	Neu5Acα2-6Galβ1-4Glcβ-Sp0
270	Neu5Acα2-6Galβ1-4Glcβ-Sp8
271	Neu5Acα2-6Galβ-Sp8
272	Neu5Acα2-8Neu5Acα-Sp8
273	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-Sp0
274	Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ-Sp0
275	Neu5Acβ2-6GalNAcα-Sp8
276	Neu5Acβ2-6Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
277	Neu5Gca2-3Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ-Sp0
278	Neu5Gca2-3Galβ1-3GlcNAcβ-Sp0
279	Neu5Gca2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp0
280	Neu5Gca2-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
281	Neu5Gca2-3Galβ1-4Glcβ-Sp0
282	Neu5Gca2-6GalNAcα-Sp0
283	Neu5Gca2-6Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
284	Neu5Gca-Sp8
285	Galβ1-3(Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAcα-Sp14
286	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ-Sp0
287	Galβ1-4(Fuca1-3)[6OSO3]GlcNAc-Sp0
288	Galβ1-4(Fuca1-3)[6OSO3]Glc-Sp0
289	Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ-Sp0
290	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ-Sp0
291	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ-Sp0
292	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ-Sp0
293	[3OSO3][4OSO3]Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
294	[6OSO3]Galβ1-4[6OSO3]GlcNAcβ-Sp0
295	6-H2PO3Glcβ-Sp10
296	Galβ1-3(Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6)GalNAcα-Sp14
297	Galβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
298	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp12

Número	Estructura de carbohidrato
299	Galβ1-4GlcNAcβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4GlcNAc-Sp0
300	Galβ1-4GlcNAcβ1-3(GlcNAcβ1-6)Galβ1-4GlcNAc-Sp0
301	Galβ1-4GlcNAcα1-6Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
302	Galβ1-4GlcNAcβ1-6Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
303	GalNAcβ1-3Galβ-Sp8
304	GlcAβ1-3GlcNAcβ-Sp8
305	GlcNAcβ1-2Manα1-3(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp12
306	GlcNAcβ1-3Man-Sp10
307	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp10
308	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp12
309	HOOC(CH ₃)CH-3-O-GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp10
310	Manα1-6Manβ-Sp10
311	Manα1-6(Manα1-3)Manα1-6(Manα1-3)Manβ-Sp10
312	Manα1-2Manα1-2Manα1-3(Manα1-2Manα1-6(Manα1-3)Manα1-6)Manα-Sp9
313	Manα1-2Manα1-2Manα1-3(Manα1-2Manα1-6(Manα1-2Manα1-3)Manα1-6)Manα-Sp9
314	Neu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAcα-Sp14
315	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp12
316	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp12
317	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp12
318	Neu5Acα2-8Neu5Acβ-Sp17
319	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-8Neu5Acβ-Sp8
320	Neu5Gcβ2-6Galβ1-4GlcNAc-Sp8
321	Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp19
322	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp12
323	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp12
324	Fucα1-3(Galβ1-4)GlcNAcβ1-2Manα1-3(Fucα1-3(Galβ1-4)GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp20
325	Neu5Ac(9Ac) _a 2-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
326	Neu5Ac(9Ac) _a 2-3Galβ1-3GlcNAcβ-Sp0
327	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ-Sp0
328	Neu5Acα2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ-Sp0
329	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
330	Galα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Sp0
331	GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Sp0
332	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
333	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
334	Neu5Acα2-3-Galβ1-3(Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-6)GalNAc-Sp14
335	GlcNAcα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
336	GlcNAcα1-4Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
337	GlcNAcα1-4Galβ1-3GlcNAcβ-Sp0
338	GlcNAcα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Sp0
339	GlcNAcα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-Sp0
340	GlcNAcα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
341	GlcNAcα1-4Galβ1-3GalNAc-Sp14
342	Manα1-3(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp12
343	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp12

Número	Estructura de carbohidrato
344	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp12
345	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp12
346	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp12
347	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp12
348	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp12
349	GlcNAcβ1-2Manα1-3(GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-Sp22
350	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-Sp22
351	Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-Sp22
352	[6OSO3]GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-β-Sp0
353	KDNα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAc-Sp0
354	KDNα2-6Galβ1-4GlcNAc-Sp0
355	KDNα2-3Galβ1-4Glc-Sp0
356	KDNα2-3Galβ1-3GalNAcα-Sp14
357	Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3(Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp20
358	Fuca1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Fuca1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp20
359	Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-2Manα1-3(Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp20
360	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp20
361	Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp12
362	Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-Sp22
363	Neu5Acα2-6GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp21
364	Neu5Acα2-6GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp21
365	Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3(Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc-Sp21
366	Galβ1-4GlcNAcβ1-2(Galβ1-4GlcNAcβ1-4)Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp21
367	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp20
368	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp20
369	Galα1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galα1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp20
370	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3(GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp20
371	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp20
372	Fuca1-2Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-2Manα1-3(Fuca1-2Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp19
373	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14
374	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14
375	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
376	(GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp12
377	Galβ1-3GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4Glc-Sp0
378	Galβ1-3GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAc-Sp0
379	Galβ1-3GlcNAcβ1-3(Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glcβ-Sp0
380	Galβ1-3GlcNAcβ1-3(Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc-Sp21
381	Fuca1-2Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc-Sp21
382	Fuca1-2Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-3(Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc-Sp21
383	Galβ1-3GlcNAcβ1-3(Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc-Sp21
384	Galβ1-4GlcNAcβ1-2(Galβ1-4GlcNAcβ1-4)Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp21

Número	Estructura de carbohidrato
385	GlcNAcβ1-2(GlcNAcβ1-4)Manα1-3(GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp21
386	Fuca1-2Galβ1-3GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4Glcβ-Sp0
387	Fuca1-2Galβ1-3GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
388	Galβ1-3GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
389	Neu5Acα2-3(GalNAcβ1-4)Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
390	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
391	Galα1-3Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galα1-3Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp19
392	Galα1-3Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galα1-3Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp19
393	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp12
394	GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp12
395	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
396	Fuca1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
397	Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
398	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
399	Galα1-4Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galα1-4Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp19
400	Galα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-LVANKT
401	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
402	Galβ1-3GlcNAcβ1-6Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
403	Galβ1-3GlcNAcα1-6Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0
404	GalNAcβ1-3Galα1-6Galβ1-4Glcβ-Sp8
405	GlcNAcβ1-6(GlcNAcβ1-3)GalNAcα-Sp14
406	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4(Fuca1-3)Glcβ-Sp21
407	Neu5Acα2-6Galβ1-3GlcNAcβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc-Sp21
408	Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glcβ-Sp0
409	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glcβ-Sp0
410	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
411	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
412	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ-Sp0
413	Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3GalNAcα-Sp14
414	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14
415	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14
416	Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-Sp22
417	Fuca1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Fuca1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-Sp22
418	GlcNAcβ1-2Manα1-3(GlcNAcβ1-2(GlcNAcβ1-6)Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp19
419	Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14
420	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14
421	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14
422	Galα1-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14
423	Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3(Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-Sp22
424	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-Sp22
425	Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-3GlcNAcβ1-2(Galβ1-3GlcNAcβ1-6)Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Sp19
426	Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc-Sp21
427	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuca1-3GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc-Sp21
428	GlcNAcβ1-2Manα1-3(GlcNAcβ1-4)(GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp21
429	GlcNAcβ1-4(GlcNAcβ1-2)Manα1-3(GlcNAcβ1-4)(GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp21

Número	Estructura de carbohidrato
430	GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-4)(GlcNAc β 1-6)(GlcNAc β 1-2)Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-Sp21
431	GlcNAc β 1-4(GlcNAc β 1-2)Man α 1-3(GlcNAc β 1-4)(GlcNAc β 1-6)(GlcNAc β 1-2)Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-Sp21
432	Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-4)(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-Sp21
433	Gal β 1-4GlcNAc β 1-4(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-3(GlcNAc β 1-4)(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-Sp21
434	Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-4)(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-Sp21
435	Gal β 1-4GlcNAc β 1-4(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-3(GlcNAc β 1-4)(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-Sp21
436	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc-Sp10
437	Gal β 1-4Gal β -Sp10
438	Gal β 1-6Gal β -Sp10
439	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β -Sp8
440	GalNAc β 1-6GalNAc β -Sp8
441	[6OSO3]Gal β 1-3GlcNAc β -Sp0
442	[6OSO3]Gal β 1-3[6OSO3]GlcNAc-Sp0
443	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-2(Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-4)Man α 1-3(Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
444	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-2(Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-4)Man α 1-3(Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-2)Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp12
445	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc-Sp14
446	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6GalNAc-Sp14
447	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6GalNAc-Sp14
448	Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α -Sp0
449	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc-Sp14
450	Gal α 1-3Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal α 1-3Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc-Sp14
451	GalNAc α 1-3Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(GalNAc α 1-3Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc-Sp14
452	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Sp0
453	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β -Sp0
454	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -Sp22
455	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-2Man α 1-6(Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -Sp22
456	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β -4Glc-Sp21
457	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -Sp22
458	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp19
459	Gal β 1-4GlcNAc β -(OCH ₂ CH ₂) ₆ NH ₂
460	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α -Sp8
461	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β -Sp8
462	Glc α 1-6Glc α 1-6Glc α 1-6Glc β -Sp10
463	Glc α 1-4Glc α 1-4Glc α 1-4Glc β -Sp10
464	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)GalNAc α -Sp14
465	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-2Man α 1-6(Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -6AA
466	Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-2Man α 1-6(Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -Sp19
467	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-6(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2)Man α 1-6(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp19
468	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-2)Man α 1-6(GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -6AA
469	Gal β 1-3GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GlcNAc β 1-4)(Gal β 1-3GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Sp21
470	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -Sp21

Número	Estructura de carbohidrato
471	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα-Sp0
472	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
473	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
474	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3)GalNAcα-Sp14
475	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-6AA
476	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6(Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-6AA
477	Manα1-6(Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-Sp19
478	Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-2)Manα1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAcβ-6AA
479	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-6(GlcNAcβ1-4)(Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-Sp21
480	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc-Sp21
481	Galβ1-3GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
482	Galα1-3Galβ1-3GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
483	Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
484	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
485	[3OSO3]Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAc-Sp0
486	Neu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GlcNAcβ1-3(Fuca1-3(Galβ1-4)GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc-Sp21
487	Fuca1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
488	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
489	Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-2Manα-Sp0
490	[6OSO3](Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ-Sp0
491	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
492	Fuca1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα-Sp0
493	(Fuca1-2)Galβ1-3[6OSO3]GlcNAcβ-Sp0
494	[6OSO3](Fuca1-2)Galβ1-3[6OSO3]GlcNAcβ-Sp0
495	Neu5Acα2-6GalNAcβ1-4[6OSO3]GlcNAcβ-Sp8
496	GalNAcβ1-4[6OSO3](Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp8
497	[3OSO3]GalNAcβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-Sp8
498	(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-6(Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3)GalNAcα-Sp14
499	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-6GalNAcα-Sp14
500	GlcNAcβ1-2(GlcNAcβ1-4)Manα1-3(GlcNAcβ1-4)[GlcNAcβ1-2(GlcNAcβ1-6)Manα1-6]Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Sp21
501	Galβ1-4GlcNAcβ1-2(Galβ1-4GlcNAcβ1-4)Manα1-3(GlcNAcβ1-4)[Galβ1-4GlcNAcβ1-2(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Manα1-6]Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Sp21
502	Galβ1-3GlcNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-Sp8
503	Galβ1-3[6OSO3]GlcNAcβ-Sp8
504	[4OSO3][6OSO3]GalNAcβ1-4GlcNAc-Sp8
505	[6OSO3]GalNAcβ1-4GlcNAc-Sp8
506	[3OSO3]GalNAcβ1-4[3OSO3]GlcNAc-Sp8
507	GalNAcβ1-4[6OSO3]GlcNAc-Sp8
508	[3OSO3]GalNAcβ1-4GlcNAc-Sp8
509	[4OSO3]GalNAcβ-Sp10
510	Galβ1-4[6PO3]GlcNAcβ-Sp0
511	[6PO3]Galβ1-4GlcNAcβ-Sp0

Número	Estructura de carbohidrato
Sp0	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Sp8	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Sp9	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Sp10	NHCOCH_2NH
Sp11	$\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{-p-NHCOCH}_2\text{NH}$
Sp12	Asparagine
Sp13	Glycine
Sp14	Threonine
Sp15	Serine
Sp16	PNP ($\text{OC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$)
Sp17	$\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$
Sp18	$\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$
Sp19	EN or NK
Sp20	GENR
Sp21	$\text{N}(\text{CH}_3)\text{-O}(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$
Sp22	NST
Sp23	$(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$
MDPLys	Mur-L-Ala-D-iGln β -(CH_2) ₄ NH ₂

Anexo 2. Glycoarray del Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry.

Número	Estructura o nombre común
1	Fuca-sp3
2	Gal α -sp3
3	Fórmula no disponible
4	GalNAc α 1-OSer
5	GalNAc α -sp3
6	GalNAc β -sp3
7	Glc α -sp3
8	Glc β -sp2
9	Fórmula no disponible
10	GlcNAc β -sp3
11	GlcNAc β -sp2
12	GlcNAc β -sp7
13	GlcNAc β -sp8
14	Fórmula no disponible
15	HOCH ₂ (HOCH) ₄ CH ₂ NH ₂
16	Man α -sp3
17	Man α -sp4
18	Man β -sp3
19	ManNAc β -sp4
20	Rha α -sp3
21	Gal β -sp4
22	GlcNAc β -sp4
23	GalNAc β -sp4
24	GlcNAc α -sp3
25	GalNAc β -sp10
26	Rha β -sp4
27	3,6-Me ₂ Glc
37	3-O-Su-Gal β -sp3
38	3-O-Su-GalNAc β -sp3
40	4-O-Su-GalNAc β -sp4
43	Fórmula no disponible
44	Fórmula no disponible
45	GlcA β -sp3
46	Fórmula no disponible
46	Fórmula no disponible
47	6-H ₂ PO ₃ Man α -sp3
48	Neu5Ac α -sp3
49	Neu5Ac α -sp9
50	Neu5Ac β -sp3
51	Fórmula no disponible
52	Neu5Gc α -sp3
53	Fórmula no disponible
54	9-NAc-Neu5Ac α -sp3
55	3-O-Su-GlcNAc β -sp3
71	Fuca1-2Gal β -sp3
72	Fuca1-3GlcNAc β -sp3
73	Fuca1-4GlcNAc β -sp3
74	Fuc β 1-3GlcNAc β -sp3

Número	Estructura o nombre común
75	Gal α 1-2Gal β -sp3
76	Gal α 1-3Gal β -sp3
77	Gal α 1-3GalNAc β -sp3
78	Fórmula no disponible
79	Gal α 1-3GalNAc α -sp7
80	Gal α 1-3GlcNAc β -sp3
81	Gal α 1-4GlcNAc β -sp3
82	Fórmula no disponible
83	Fórmula no disponible
84	Gal β 1-2Gal β -sp3
85	Gal β 1-3GlcNAc β -sp3
86	Gal β 1-3GlcNAc β -sp2
87	Gal β 1-3Gal β -sp3
88	Gal β 1-3GalNAc β -sp3
89	Gal β 1-3GalNAc α -sp3
90	Gal β 1-3GalNAc α -sp7
92	Gal β 1-4Glc β -sp2
93	Gal β 1-4Glc β -sp4
94	Gal β 1-4Gal β -sp4
95	Fórmula no disponible
96	Gal β 1-4GlcNAc β -sp2
97	Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
98	Fórmula no disponible
99	Gal β 1-4GlcNAc β -sp8
100	Gal β 1-6Gal β -sp4
101	GalNAc α 1-3GalNAc β -sp3
102	GalNAc α 1-3Gal β -sp3
103	GalNAc α 1-3GalNAc α -sp3
104	Fórmula no disponible
105	GalNAc β 1-3GalNAc β -sp3
106	GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3
107	GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp2
109	Fórmula no disponible
110	Glc α 1-4Glc β -sp3
111	Glc β 1-4Glc β -sp4
112	Glc β 1-6Glc β -sp4
113	GlcNAc β 1-3GalNAc α -sp3
114	Fórmula no disponible
115	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Asn
116	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp3
117	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp4
118	GlcNAc β 1-6GalNAc α -sp3
119	Fórmula no disponible
120	Man α 1-3Man β -sp4
121	Fórmula no disponible
122	Fórmula no disponible
123	Fórmula no disponible
124	Fórmula no disponible
125	Fórmula no disponible
126	Fórmula no disponible
127	Fórmula no disponible

Número	Estructura o nombre común
128	Fórmula no disponible
129	Fórmula no disponible
130	Fórmula no disponible
131	Fórmula no disponible
132	Gal β 1-3GalNAc α -sp5
133	Fórmula no disponible
134	Fórmula no disponible
135	Fórmula no disponible
136	Fórmula no disponible
137	Fórmula no disponible
138	Fórmula no disponible
139	Gal β 1-4Glc α -sp3
140	Gal α 1-3GalNAc(fur) β -sp3
141	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp3
142	GlcNAc α 1-3GalNAc β -sp3
143	Fuc α 1-2(3-O-Su)Gal β -sp3
144	Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp2
145	Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp3
146	Fórmula no disponible
147	Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3
148	GalNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp2
149	GlcNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp2
150	3-O-Su-Gal β 1-3GalNAc α -sp3
151	6-O-Su-Gal β 1-3GalNAc α -sp3
152	3-O-Su-Gal β 1-4Glc β -sp2
153	6-O-Su-Gal β 1-4Glc β -sp2
154	3-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β -sp3
155	3-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β -sp2
156	3-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2
157	3-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
158	4-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2
159	4-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
160	6-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β -sp2
161	6-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β -sp3
162	6-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2
163	6'-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
164	GlcA β 1-3GlcNAc β -sp3
165	GlcA β 1-3Gal β -sp3
166	GlcA β 1-6Gal β -sp3
167	GlcNAc β 1-4-[HOOC(CH ₃)CH]-3-O-GlcNAc β -sp4
168	GlcNAc β 1-4Mur-L-Ala-D-i-Gln-Lys
169	Neu5Aca2-3Gal β -sp3
170	Neu5Aca2-6Gal β -sp3
171	Neu5Aca2-3GalNAc α -sp3
173	Neu5Ac β 2-6GalNAc α -sp3
174	Neu5Gca2-6GalNAc α -sp3
175	Fórmula no disponible
176	Fórmula no disponible
177	3-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3
178	6-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β -sp2
179	6-O-Su-Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp2

Número	Estructura o nombre común
180	6-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2
181	3,4-O-Su2-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
182	3,6-O-Su2-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
183	4,6-O-Su2-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
184	4,6-O-Su2-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
186	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-sp3
187	Fórmula no disponible
188	Fórmula no disponible
189	3,6-O-Su2-Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2
190	Galβ1-4-(6-P)GlcNAcβ-sp2
191	6-P-Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
192	GalNAcβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3
193	3-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3
194	6-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3
195	6-O-Su-GalNAcβ1-4-(3-O-Ac)GlcNAcβ-sp3
196	3-O-Su-GalNAcβ1-4(3-O-Su)-GlcNAcβ-sp3
197	3,6-O-Su2-GalNAcβ1-4-GlcNAcβ-sp3
198	4,6-O-Su2-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3
199	4,6-O-Su2-GalNAcβ1-4-(3-O-Ac)GlcNAcβ-sp3
200	4-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3
201	3,4-O-Su2-GalNAcβ1-4-GlcNAcβ-sp3
202	Fórmula no disponible
203	Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2
204	4-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp2
205	Neu5Acα2-6GalNAcβ-sp3
206	Neu5Gcα2-3Gal-sp3
207	Fórmula no disponible
215	Fuα1-2Galβ1-3GlcNAcβ-sp3
216	Fuα1-2Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
217	Fórmula no disponible
219	Fórmula no disponible
220	Galα1-3Galβ1-4Glcβ-sp2
221	Galα1-3Galβ1-4Glcβ-sp4
222	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
223	Galα1-4Galβ1-4Glcβ-sp2
224	Galα1-4Galβ1-4Glcβ-sp3
225	Galα1-4Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
226	Galα1-3(Fuα1-2)Galβ-sp3
227	Galα1-3(Fuα1-2)Galβ-sp5
228	Fórmula no disponible
229	Fórmula no disponible
231	Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAcα-sp3
232	Galβ1-4GlcNAcβ1-6GalNAcα-sp3
233	Galβ1-3(Fuα1-4)GlcNAcβ-sp3
234	Fórmula no disponible
235	GalNAcα1-3(Fuα1-2)Galβ-sp3
236	GalNAcα1-3(Fuα1-2)Galβ-sp5
237	Fórmula no disponible
238	GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ-sp3
239	GalNAcβ1-3(Fuα1-2)Galβ-sp3
240	(Glcα1-4)3β-sp4

Número	Estructura o nombre común
241	(Glc α 1-6) β -sp4
242	GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2
243	GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
245	Fórmula no disponible
246	GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -sp3
247	GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -sp3
248	Fórmula no disponible
249	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2
250	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
251	GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp2
252	GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp4
253	GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2
254	GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α -sp3
255	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α -sp3
256	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α -sp3
258	Man α 1-6(Man α 1-3)Man β -sp4
259	Gal β 1-4(Gal β 1-3)GlcNAc β -sp3
260	Fórmula no disponible
261	Fórmula no disponible
262	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal-sp4
263	(GalNAc β -PEG2) β -DD
264	Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
265	Gal β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
266	Gala1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
267	GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3
268	GlcNAc β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc β -sp3
287	3-O-Su-Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β -sp3
288	3-O-Su-Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -sp3
289	Neu5Ac α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc α -sp3
290	Neu5Ac α 2-6(Gala1-3)GalNAc α -sp3
291	Neu5Ac β 2-6(Gal β 1-3)GalNAc α -sp3
292	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -sp3
293	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp3
294	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4
295	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β -sp2
296	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β -sp4
297	Fórmula no disponible
298	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
299	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3
300	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
301	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp8
302	Fórmula no disponible
303	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
304	Neu5Gc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
305	Neu5Gc β 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
306	9-NAc-Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3
307	KDN α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp2
308	KDN α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2
309	Neu5Ac α 2-6(Neu5Ac α 2-3)GalNAc α -sp3
310	Fórmula no disponible
313	4-O-Su-Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3

Número	Estructura o nombre común
314	Fórmula no disponible
315	Neu5Aca2-3Galβ1-4-(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3
317	Neu5Aca2-3Galβ1-3-(6-O-Su)GalNAcα-sp3
318	Neu5Aca2-6Galβ1-4-(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3
319	Fórmula no disponible
320	4-O-Su-Neu5Aca2-3-(6-O-Su)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
321	(Neu5Aca2-8)3-sp3
322	(Neu5Aca2-8)3β-sp3
323	Neu5Aca2-6Galβ1-3GlcNAc-sp3
324	Neu5Aca2-6Galβ1-3(6-O-Su)GlcNAc-sp3
325	Fórmula no disponible
326	Fórmula no disponible
327	Fórmula no disponible
328	Fórmula no disponible
329	Fórmula no disponible
330	Fórmula no disponible
331	Neu5Gca2-3Galβ1-3GlcNAcβ-sp3
332	Fórmula no disponible
333	Neu5Aca2-3Galβ1-3(6-O-Su)GlcNAc-sp3
334	Neu5Gca2-3Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAc-sp3
335	Neu5Aca2-3Galβ1-3-(6-O-Su)GlcNAc-sp3
359	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ-sp3
360	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
361	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
362	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GalNAcα-sp3
363	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GalNAcβ-sp3
364	Galα1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-sp3
365	Galα1-4(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
366	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ-sp3
367	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
368	GalNAcα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
369	GalNAcα1-4(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
371	Fuca1-2Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ-sp3
372	Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-sp3
373	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ-sp3
374	Galα1-3(Galα1-4)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
375	Galα1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
376	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4
377	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ-sp2
378	Galβ1-3GlcNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
379	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
380	Galβ1-3GlcNAcα1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
381	Galβ1-3GlcNAcβ1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
382	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ-sp3
383	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4
384	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
385	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3
386	Galβ1-4GlcNAcα1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
387	Galβ1-4GlcNAcβ1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2
388	Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-sp3
389	GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ-sp3

Número	Estructura o nombre común
390	(Glc α 1-4) β -sp $_4$
391	(Glc α 1-6) β -sp $_4$
392	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α -sp $_3$
394	Fórmula no disponible
395	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β -sp $_2$
396	(GlcNAc β 1)3-3,4,6-GalNAc α -sp $_3$
397	Fórmula no disponible
398	Fórmula no disponible
399	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp $_2$
400	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp $_3$
401	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp $_3$
402	Fórmula no disponible
403	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp $_2$
419	3-O-SuGal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp $_3$
420	4-O-SuGal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp $_3$
421	GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-3)Gal β 1-4Glc β -sp $_2$
422	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β -sp $_3$
423	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp $_3$
425	Fórmula no disponible
426	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -sp $_3$
427	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -sp $_4$
428	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)(6-O-Su-)GlcNAc β -sp $_3$
429	Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp $_3$
430	4-O-Su-Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp $_3$
431	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(2-O-Su-Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp $_3$
432	Fórmula no disponible
433	Neu5Ac α 2-6(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3)GalNAc α -sp $_3$
434	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp $_4$
435	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(2-O-Su-Fuc α 1-3)(6-O-Su-)GlcNAc β -sp $_3$
436	4-O-Su-Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)(6-O-Su-)GlcNAc β -sp $_3$
437	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β -sp $_3$
479	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp $_4$
480	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp $_2$
481	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp $_4$
483	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp $_3$
485	Gal β 1-4GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp $_3$
486	Gal β 1-4GalNAc β 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp $_3$
488	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)GalNAc α -sp $_3$
489	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc β -sp $_2$
490	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β -sp $_2$
492	(Glc α 1-6) β -sp $_4$
493	(GlcNAc β 1-4) β -sp $_4$
495	Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-3)Man β -sp $_4$
496	Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp $_4$
497	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp $_4$
498	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp $_3$
499	Fórmula no disponible
501	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp $_4$
502	(Glc α 1-6) β -sp $_4$
503	(GlcNAc β 1-4) β -sp $_4$
504	(A-GN-M)2-3,6-M-GN-GN β -sp $_4$

Número	Estructura o nombre común
505	(GN-M)2-3,6-M-GN-GN β -sp4
506	Araf6
527	Neu5Aca2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2
528	Neu5Aca2-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-3Gal β -sp3
529	Neu5Aca2-6(Gal β 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4
530	(Neu5Aca2-3Gal β 1)2-3,4-GlcNAc β -sp3
531	Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp2
532	Neu5Aca2-8Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3Gal β 1-4Glc β -sp2
533	Neu5Aca2-8Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp2
534	Fórmula no disponible
535	Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc-sp4
536	Neu5Aca2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4
537	Neu5Aca2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4
538	Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4
539	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4
540	Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-6(Neu5Ac2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4
541	Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-6(Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4
542	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4
543	Fuca1-2Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc β -sp4
624	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4)8-NH2-ol
625	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4)11-12-NH2-ol
626	(Sia2-6A-GN-M)2-3,6-M-GN-GN-NH2-ol
627	(Sia2-6A-GN-M)2-3,6-M-GN-GN β -sp4
628	(Sia2-3A β -4GN β -2M α)2-3,6-M β -4GN β -4GN β -sp4
800	GlcNAca1-4GlcNAc β -sp3
801	GalNAca1-3GalNAc(fur) β -sp3
900	H-(Gly)6-NH2 Gly6-amida, lineal
902	BovS10G (Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-NH2)
903	Péptido SYPH-3: ASGAKEEAEKKAAEQRALLC
904	Péptido CMV: TPTPVNPSTAPAPAPTPTFAC
1001	<i>Salmonella entérica</i> O28deAc
1002	<i>Salmonella entérica</i> O47deAc
1003	<i>Salmonella entérica</i> O16deAc
1004	<i>Salmonella entérica</i> O13
1005	<i>Salmonella entérica</i> O28
1006	<i>Salmonella entérica</i> O16
1007	<i>Salmonella entérica</i> O17
1008	<i>Salmonella entérica</i> O67
1009	<i>Salmonella entérica</i> O58
1010	<i>Salmonella entérica</i> O41
1011	<i>Salmonella entérica</i> O62
1012	<i>Salmonella entérica</i> O60
1013	<i>Salmonella entérica</i> O18
1014	<i>Salmonella entérica</i> O59
1015	<i>Salmonella entérica</i> O42
1016	<i>Salmonella entérica</i> O52
1017	<i>Salmonella entérica</i> O11
1018	<i>Salmonella entérica</i> O51
1019	<i>Salmonella entérica</i> O44
1020	<i>Salmonella entérica</i> O21
1021	<i>Salmonella entérica</i> O57

Número	Estructura o nombre común
1022	<i>Salmonella entérica</i> O56
1023	<i>Salmonella entérica</i> O38
1024	<i>Cronobacter sakazakii</i> G2356 O2
1025	<i>Cronobacter sakazakii</i> G2592 O7
1026	<i>Cronobacter sakazakii</i> G2594 O4
1027	<i>Cronobacter sakazakii</i> G2726 O3
1201	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O11
1202	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O15
1203	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O44
1204	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O49
1205	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O51
1206	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O52
1207	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O57
1208	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O58
1209	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O71
1210	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O73
1211	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O85
1212	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O95
1213	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O99
1214	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O108
1215	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O112ab
1216	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O118
1217	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O119
1218	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O123
1219	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O125
1220	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O127
1221	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O130
1222	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O148
1223	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O150
1224	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O151
1225	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O161
1226	<i>E. coli</i> O-polisacáridos específicos O168
1230	O-PS de <i>E. coli</i> O10a,O10b
1231	<i>E. coli</i> O12
1232	<i>E. coli</i> O14
1233	<i>E. coli</i> O19ab
1234	<i>E. coli</i> O27
1235	<i>E. coli</i> O36
1236	<i>E. coli</i> O37
1238	<i>E. coli</i> O41
1239	<i>E. coli</i> O54
1240	<i>E. coli</i> O62
1241	<i>E. coli</i> O81
1401	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O1(F4)
1402	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O10ac(F5)
1403	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O11ab
1404	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O13ab
1405	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O13ac
1406	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O14
1407	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O15
1408	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O2abc

Número	Estructura o nombre común
1409	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O2ac
1410	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O2ac(F3)
1412	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O2adf
1413	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O3(Habs 3)
1416	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O4ac
1418	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O9ad
1501	<i>Proteus genomospecies</i> 11B-r
1601	<i>Proteus mirabilis</i> 12B-r
1602	<i>Proteus mirabilis</i> 1B-m
1603	<i>Proteus mirabilis</i> 3B-m
1605	<i>Proteus mirabilis</i> O11
1606	<i>Proteus mirabilis</i> O13
1607	<i>Proteus mirabilis</i> O16
1608	<i>Proteus mirabilis</i> O23
1609	<i>Proteus mirabilis</i> O28
1610	<i>Proteus mirabilis</i> O31
1611	<i>Proteus mirabilis</i> O33
1613	<i>Proteus mirabilis</i> O38
1614	<i>Proteus mirabilis</i> O3ac
1615	<i>Proteus mirabilis</i> O58
1616	<i>Proteus mirabilis</i> O6
1617	<i>Proteus mirabilis</i> O60
1618	<i>Proteus mirabilis</i> OE
1701	<i>Proteus pinneri</i> 107
1702	<i>Proteus pinneri</i> 113
1704	<i>Proteus pinneri</i> 28
1705	<i>Proteus pinneri</i> 31
1706	<i>Proteus pinneri</i> 40
1707	<i>Proteus pinneri</i> 75
1801	<i>Proteus vulgaris</i> 32/57 O17
1803	<i>Proteus vulgaris</i> O19ab
1804	<i>Proteus vulgaris</i> O22
1806	<i>Proteus vulgaris</i> O4
1807	<i>Proteus vulgaris</i> O46
1808	<i>Proteus vulgaris</i> O65
1809	<i>Proteus vulgaris</i> OX19
1810	<i>Proteus vulgaris</i> TG251
2001	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 10
2002	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 12
2003	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 14
2004	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 15
2005	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 16
2006	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 17
2007	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 18
2008	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 2
2009	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 6
2010	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 7
2011	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 8
2012	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo 9
2013	<i>Shigella boydii</i> O-polisacáridos específicos tipo X
2101	<i>Shigella dysenteriae</i> O-polisacáridos específicos tipo 1

Número	Estructura o nombre común
2102	<i>Shigella dysenteriae</i> O-polisacáridos específicos tipo 11
2103	<i>Shigella dysenteriae</i> O-polisacáridos específicos tipo 3
2104	<i>Shigella dysenteriae</i> O-polisacáridos específicos tipo 4
2105	<i>Shigella dysenteriae</i> O-polisacáridos específicos tipo 7
2106	<i>Shigella dysenteriae</i> O-polisacáridos específicos tipo 8
2106	<i>Shigella dysenteriae</i> O-polisacáridos específicos tipo 8
2107	<i>Shigella dysenteriae</i> O-polisacáridos específicos tipo 9
2201	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo 2a
2202	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo 2b
2203	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo 3a
2204	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo 3b
2205	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo 4a
2206	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo 4b
2207	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo 5a
2208	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo 5b
2209	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo 6
2210	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo 6b
2211	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo X
2212	<i>Shigella flexneri</i> O-polisacáridos específicos tipo Y
2501	<i>Streptococcus equi</i> sp. Hyaluronic acid sodium salt (Biochemika)
2601	LPS de <i>Acetobacter methanolicus</i>
3001	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zymozan A
3301	Laminaria hyperborea Laminarin
3302	B5-2 Laminaran
3401	Barley bGlucan
9001	Scleroglucan (CarboMer,Inc. #4,00043)
9002	Curdlan (CarboMer,Inc. #4,00040)
9003	Chitosan alto peso molecular
9004	A-Heptasaccharide-APD-HSA, Isosep61/12, 1168-282 (T.Boren's lab)
9005	Stefan Oscarsson (T.Boren's lab)
9006	Lacto-N-fucopentaose I-APD-HSA (H type1), Isosep61/02, 2168-264 (T.Boren's lab)
9007	2'-fucosyllactose-ADP-BSA (H terminal), Isosep60/55 (T.Boren's lab)
9008	H-terminal II-APE-BSA (2'fucosyllactosamine), Isosep60/54, 2088-159 (T.Boren's lab)
9009	Lacto-N-neotetraose-ADP-HSA (lactosamin), Isosep60/72, 2168-27 (T.Boren's lab)
9010	Lacto-N-tetraose-ADP-HSA, Isosep60/97, 4168-274 (T.Boren's lab)
9011	Lacto-N-difucohexaose I-ADP-HSA, Isosep61/08, 9042-082 (T.Boren's lab)
9012	Sialyl-Lea-APD-HSA (19-9 antigen, Sialyl-Lea), Isosep60/69, 643-060 (T.Boren's lab)
9013	6'-Sialyllactose-ADP-HSA, Isosep60/93, 2168-270 (T.Boren's lab)
9014	3'-Sialyllactose-ADP-HSA, Isosep60/67, 3116-190 (T.Boren's lab)
9015	Tri-Lex-APE-HSA, Isosep61/56, 2116-252 (T.Boren's lab)
9016	Lacto-N-fucopentaose III-ADP-HSA (LNF III-HSA), Isosep61/04 (T.Boren's lab)
9017	A-Trisaccharide-APE-HSA, Isosep60/66 (T.Boren's lab)
9018	A-Hexasaccharide-APD-HSA, Isosep61/60 (T.Boren's lab)
9019	Lacto-N-fucopentaose II-APD-HSA, Isosep61/03, 2168-280 (T.Boren's lab)
9020	SO3-Lea-Sq-HSA Isosep61/12, 1168-282 (T.Boren's lab)
9021	SO3-Lea-15atom-HSA
9022	a1-3,a1-6-mannotriose-BSA
9023	Sia-Lex-BSA(NPG1403)
9024	Sia-Lex-BSA(NPG0403)
9025	Sia-di-Lex
9031	(GN β -2M α)2-3,6(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6

Número	Estructura o nombre común
9032	(A β -4GN β -2M α)2-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9033	(Sia α -3A β -4GN β -2M α)2-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9034	(Sia α -6A β -4GN β -2M α)2-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9035	[GN β -2M α (GN β)2-4,2M α]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9036	[A β -4GN β -2M α (A β -4GN β)2-4,2M α]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9037	[Sia α -3A β -4GN β -2M α (Sia α -3A β -4GN β)2-4,2M α]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9038	[Sia α -6A β -4GN β -2M α (Sia α -6A β -4GN β)2-4,2M α]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9039	[(GN β)2-6,2M α GN β -2M α]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9040	[(A β -4GN β)2-2,6M α (A β -4GN β -2M α)]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9041	[(Sia α -3A β -4GN β)2-2,6M α (Sia α -3A β -4GN β -2M α)]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9042	[(Sia α -6A β -4GN β)2-2,6M α (Sia α -6A β -4GN β 2M α)]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9043	[(GN β)2-6,2M α]2-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9044	[(A β -4GN β)2-6,2M α (A β -4GN β)2-4,2M α]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9045	[(Sia α -3A β -4GN β)2-6,2M α (Sia α -3A β -4GN β)2-4,2M α]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9046	[(Sia α -6A β -4GN β)2-6,2M α (Sia α -6A β -4GN β)2-4,2M α]-6,3(GN β -4)M β -4GN β -4GN β -sp6
9047	COMP17
9048	COMP18
9049	COMP19
9050	COMP20

Número	Estructura de carbohidrato
Sp2	-O(CH ₂) ₂ NH ₂
Sp3	-O(CH ₂) ₃ NH ₂
Sp4	-NHCOCH ₂ NH ₂
Sp5	-O(CH ₂) ₃ NH-CO(CH ₂) ₅ NH ₂
Sp6	-N(Me)O(CH ₂) ₃ NH ₂
Sp7	-OC ₆ H ₄ -p-NH ₂
Sp8	-(OCH ₂ CH ₂) ₆ NH ₂
Sp9	-OCH ₂ C ₆ H ₄ -p-NHCOCH ₂ NH ₂
Sp0	otros espaciadores: Asn, Ser, C2Et; etc.
Asn: Asparagina	NH-CO-CH ₂ CH(COOH)NH ₂
Ser: Serina	-OCH ₂ CH(COOH)NH ₂
C2Et	-O(CH ₂) ₂ NH ₂

Abreviaturas

A = Gal	R = Rha	LN = N-acetil lactosamina
AN = GalNAc	M = Man	Malt = maltosa
Ch = chito	MN = ManNAc	OS = oligosacárido
F = L-Fuc	S = Sia = Neu5Ac α	Tn = GalNAc α
G = Glc	U = ácido urónico	i = iso
Gc = glicolil	Su = sulfato	P = fosfato
GN = GlcNAc β	Lac = lactosa	

Anexo 3. Resúmenes y capítulo de libro publicados.

- Pérez-Cruz M, Máñez R, Mestre M, Costa C. Effects of the xenogeneic immune responses in a rat model of sepsis. *Inflammation Research*. 2011; 60(Supl 1):S163-164. [PubMed: 21647836]
- Pérez-Cruz M, Máñez R, Costa C. Rat elicited anti-carbohydrate xenoantibodies crossreact with cells of multiple species and bacteria. *Xenotransplantation*. 2011; 18(5):274-275. [PubMed: 21923866]
- Sommaggio R, Pérez-Cruz M, Costa C. Protocol of xenotransplantation. Cellular studies for in vitro modeling of immune responses (Chapter 7), *Molecular Biological Methods* New York city. 2012; 885:91-103. [PubMed: 22565992]