



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PATRONES DE SUSTITUCION EN ALELOS DE GENES  
V DE INMUNOGLOBULINA: ANALISIS  
ESTRUCTURAL DE LA EVOLUCION DEL SITIO DE  
UNION AL ANTIGENO**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

**PRESENTA:**

**Q.F.B TANIA ROMO GONZALEZ DE LA PARRA**

m340077

2005

No basta abrir la ventana  
para ver los campos y el río  
No es bastante no ser ciego  
para ver los árboles y las flores.  
También es necesario no tener filosofía.  
Con filosofía no hay árboles: hay sólo ideas.  
Hay sólo una ventana cerrada, y todo el mundo afuera;  
y un sueño de lo que se podría ver si la ventana se abriera,  
que nunca es lo que se ve cuando se abre la ventana.

- Fernando Pessoa

Esté lo que esté en el centro del Mundo,  
me dio el mundo exterior como ejemplo de Realidad,  
y cuando digo "esto es real", aún de un sentimiento,  
lo veo sin querer en un espacio cualquiera del exterior,  
lo veo con una visión cualquiera fuera y ajeno a mí.  
Ser real quiere decir no estar dentro de mí.  
De mi persona de dentro no tengo noción de realidad.  
Sé que el mundo existe, pero no sé si existo.  
Estoy más seguro de la existencia de mi casa blanca  
que de la existencia interior del dueño de la casa blanca.  
Creo más en mi cuerpo que en mi alma,  
porque mi cuerpo se presenta en medio de la realidad.  
Y puede ser visto por otros,  
puede tocarse y estar de pie;  
pero mi alma sólo puede ser definida en términos de fuera.  
Existe para mí - en los momentos en que creo que efectivamente existe -  
por un préstamo de la realidad exterior del Mundo.  
Si el alma es más real  
que el mundo exterior, como tú, filósofo, dices,  
¿para qué el mundo exterior me fue dado como modelo de la realidad?  
Si es más cierto que yo siento  
que el existir las cosas que siento,  
¿para qué siento  
y para qué surge ese algo independiente de mí  
sin necesitar de mí para existir,  
siempre unido yo a mí mismo, siempre personal e intransferible?  
¿Para qué me muevo con los demás  
en un mundo en que nos entendemos y donde coincidimos  
si acaso ese mundo es el error y yo el que está en lo cierto?  
Si el Mundo es un error, es un error de todo el mundo.  
Y cada uno de nosotros es el error de cada uno de nosotros solamente.  
Cosa por cosa, el Mundo es más cierto.  
¿Pero por qué me interrogo sino porque estoy enfermo?  
En los días ciertos, en los días exteriores de mi vida,  
en mis días de perfecta lucidez natural,  
siento sin sentir que siento,  
veo sin saber que veo,  
y nunca el Universo es tan real como entonces,  
nunca el Universo está (no es cerca o lejos de mí, sino)  
tan sublimemente no-mío.  
Cuando digo "es evidente" ¿quiero acaso decir "soy yo el que lo veo"?  
Cuando digo "es verdad", ¿quiero acaso decir "es mi opinión"?  
Cuando digo "allí está" ¿quiero acaso decir "no está allí"?  
Y si esto es así en la vida, ¿por qué será diferente en la filosofía?  
Vivimos antes de filosofar, existimos antes de saberlo.  
Y el primer hecho merece al menos la primacía y el culto.  
Sí, antes de ser interior somos exterior.  
Por eso somos exterior esencialmente.  
Dices, filósofo enfermo, filósofo al fin, que esto es materialismo.  
Pero ¿cómo puede esto ser materialismo, si materialismo es una filosofía,  
y, si es una filosofía seria, siendo al menos mía, una filosofía mía,  
y esto ni siquiera es mío, ni siquiera soy yo?

- Fernando Pessoa

## **AGRADECIMIENTOS.**

A LA VIDA, que experimento con cada amanecer y de la que me despido cada noche. La que con su mazo frío forja y temple mis llamas ardientes. La que me regala al percibir una sonrisa, un abrazo, una caricia... La que con su amargura parda ha dado muerte a mis hábitos y me ha hecho descubrir con un nuevo aliento otra realidad en la cual vivir...

A MIS PADRES, que con sus opuestos han dado origen a esta interfase, en la que soy y no soy poetiza, filósofa, científica... Interfase en la que he crecido libre y llena de ataduras, las cuales han sido el señuelo para empezar mi búsqueda.

A MI HERMANA mi espejo dual, del que al inicio rehuí y rechace como mi propia naturaleza y sin embargo ahora recojo a pedazos para completar mis formas.

A MIS AMIGOS mis maestros, con los que he vivido las tormentas, los días de neblina y soledad pero también el amor, la compasión y la armonía.

A LOS AMORES, fugaces, tibios y de vez en vez ardientes... Llenos de ausencias y de compañías tiernas.

A MIS DUALIDADES:

ENRIQUE mi tutor y guía espiritual, con el que he crecido a través de la filosofía de las ideas y sus cantos poéticos, de la percepción de una naturaleza interior del mundo, de dar cabida al YO-CUERPO en la experimentación.

LARRALDE el Temaxtiani de la "ciencia por amor al arte", del reconocimiento del mundo no sólo en si mismo sino también en los ojos del otro, del arte de matizar para no caer en fanatismos, de asignarle también valor a la materia y las ideas.

## INDICE.

	Pág.
<b>0. Resumen</b>	3
<b>1. Introducción</b>	5
<b>2. Antecedentes</b>	9
<b>2.1 Estructura de las inmunoglobulinas</b>	9
<b>2.2 Mecanismo de reconocimiento molecular inmune</b>	12
2.2.1 Complementariedad química y geométrica	12
2.2.2 Restricciones estructurales de la diversificación	13
2.2.2.1 Estructuras y clases de estructura canónica	13
2.2.2.2 Longitudes de H3	16
2.2.2.3 Uso diferencial de aminoácidos por posición	18
2.2.2.4 Interfase VH:VL	19
2.2.2.5 Ajuste inducido	22
2.2.3 Restricciones genéticas de la diversificación	24
2.2.3.1 Distribución de la información en mapas bidimensionales	26
2.2.3.2 Uso preferencial de genes	28
<b>2.3 Procesos genéticos y evolutivos de la diversificación en las inmunoglobulinas</b>	30
2.3.1 Diversificación del repertorio	30
2.3.1.1 Diversificación somática	31
2.3.1.2 Diversificación germinal	33
2.3.1.2.1. Duplicación génica	33
2.3.1.2.2. Conversión génica germinal	34
2.3.1.2.3. Polimorfismo alélico	35
<b>2.4 Evolución molecular</b>	37
2.4.1 Cambios evolutivos en las secuencias de nucleótidos	38
2.4.2 Velocidad y patrones de sustitución	39
2.4.3 Polimorfismo en poblaciones	40
<b>3. Diseño Experimental</b>	42
<b>4. Metodología</b>	44
<b>4.1 Análisis evolutivo molecular en alelos de genes V de inmunoglobulina</b>	44

4.1.1	Construcción de la base de datos	44
4.1.2	Clasificación del tipo de reemplazo	45
4.1.3	Cálculo de la proporción R/S	45
<b>4.2</b>	<b>Análisis poblacional de los patrones de sustitución en genes VH de inmunoglobulina</b>	<b>46</b>
4.2.1	Selección de los genes a estudiar	46
4.2.2	Diseño de los cebadores ó “Primers”	47
4.2.3	Preparación del ADN genómico	47
4.2.4	Amplificación por RCP o “PCR” y secuenciación	48
<b>4.3</b>	<b>Análisis funcional-estructural de las sustituciones y sus implicaciones para el mecanismo de reconocimiento molecular inmune</b>	<b>49</b>
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Artículos de investigación</b>	<b>50</b>
5.1.1	Structural Analysis of Substitution Patterns in Alleles of Human Immunoglobulin VH Genes (A1)	
5.1.2	Substitution Patterns in Alleles of Immunoglobulin V Genes in Humans and Mice (A2)	
5.1.3	Novel Substitution Polymorphisms of Human Immunoglobulin VH Genes in Mexicans (A3)	
5.1.4	The Immunological Specificity: History, Settings, Metaphors and Phantoms (A4)	
<b>5.2</b>	<b>Principales resultados y discusión de la investigación</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos</b>	<b>77</b>
<b>8.1</b>	<b>Artículos en colaboración</b>	<b>77</b>
8.1.1	Host gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm	

## 0. RESUMEN

Las Inmunoglobulinas (Igs) junto con el Receptor de Células T (TCR) y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) constituyen sub-familias de proteínas que han sido asociadas con altas velocidades evolutivas. Adicionalmente, la eficacia del fenómeno de reconocimiento molecular inmune ha sido asociado con esta alta tasa de diversificación germinal y/o somática de sus genes. En las Igs la capacidad de reconocimiento es principalmente el producto de variaciones que modifican las características de su sitio de unión al antígeno y de las regiones que tienen influencia sobre éste; es decir, por variación en la forma general de dicho sitio y de la composición de aminoácidos en las asas hipervariables que lo conforman. Desde esta perspectiva, si las Igs tuvieran la alta proporción de mutaciones respecto al tiempo que se postula, el número de posibles sitios de unión al antígeno sería casi ilimitado. Sin embargo, a pesar de que la visión de la evolución rápida en las Igs es ampliamente aceptada, diversos estudios han mostrado que en la evolución de estos receptores convergen diversas y contradictorias fuerzas que aún no son plenamente entendidas. Más aún, las Igs no presentan una hipervariabilidad tan elevada y aleatoria como se había postulado, lo anterior debido a que operan restricciones tanto a nivel funcional como estructural. Por lo anterior es que en este trabajo exploramos las fuerzas que actúan en los procesos de diversificación de las Igs a través de estudiar algunos aspectos de la evolución molecular por variación alélica de los genes IgV y las consecuencias de estas alteraciones sobre las propiedades estructurales del sitio de unión al antígeno.

Encontramos que dentro de los procesos de variación evolutiva de las Igs, las fuerzas que operan en la evolución de estos genes son complejas. La información genética y estructural no está uniformemente distribuida, sino que existen preferencias para mutar sólo ciertos genes, sub-regiones y posiciones. Por lo que, los procesos de diversificación no sólo reflejan las diversas presiones selectivas y procesos de dinámica del ADN operando sobre los loci, los genes, las sub-regiones y las posiciones sino, que plantea la presencia de una cierta estrategia evolutiva para la diversificación de los genes de Ig. Más aún estas preponderancias a sustituir sólo ciertos atributos sobre los genes IgV pareciera ir de acuerdo a la función que estos desarrollan. No obstante, es importante considerar que la evolución de las Igs no ocurre por selección directa de genes individuales sino sobre el repertorio completo de genes, en los cuales la continua evolución direccional es producto de eventos de mutaciones que son regulados por retroalimentación dentro de una red genómica. Por lo que es más apropiado hablar de que las funciones son generadas y reguladas epigenéticamente. Dado lo anterior en el trabajo se plantea que los patrones y formas de organización de la información genética de las Igs observadas, no explican ni dan solución al problema de la diversidad de los Acs, ya que el fenómeno de reconocimiento se da cuando el Ag y el Ac se encuentra en un momento y contexto dado. Es decir, es importante distinguir entre el genos y el fenon que aunque son inseparables no son una consecuencia lineal sino que están mutuamente co-determinados dentro de una unidad dual geno-fenómica.

## 0. ABSTRACT

Together with the TCR and the MHC, the Igs constitute sub-families of proteins that have been associated with high evolutionary rates. In addition, the efficacy of the molecular immune recognition phenomenon has been associated with this high rate of germinal and/or somatic diversification of their genes. The capacity of recognition in Igs is mainly the product of variations that modify the characteristics of the antigen-binding site and of the regions influencing it, that is, through variation in the general form of that site and in the composition and amino acids in the hypervariable loops composing it. From this perspective, if the Igs possessed the high mutational rate in regard to the time postulated for them, the number of possible antigen-binding sites would be almost unlimited. However, even though the vision of rapid Ig evolutionary rate is widely accepted, various studies have demonstrated the convergence of diverse and contradictory forces, not yet entirely understood, in the evolution of these receptors. Moreover, owing to restrictions operating at both functional and structural levels, the hypervariability of Igs was found to be lower and less random than that postulated. In this work, therefore, we explored the forces acting on the diversification processes of Igs by studying some aspects of molecular evolution by allelic variation of IgV genes, as well as the consequences of these alterations on the structural properties of the antigen-binding site.

We found complex forces operating in the evolutionary variation processes of Ig genes. The genetic and structural information is not uniformly distributed; instead, there exist preferences for mutating only certain genes, sub-region and positions. Consequently, the diversification processes not only reflect the diverse selective pressures and DNA dynamics acting on loci, genes, sub-regions and positions, but also suggest the presence of a certain evolutionary strategy for the diversification of Ig genes. Besides, this preponderant tendency to substitute only certain attributes in IgV genes would seem to be in accord with the function that these perform. Nonetheless, it is important to consider that Ig evolution does not take place through the direct selection of individual genes, but rather from the complete repertoire of genes, the continuous directional evolution of these being the product of mutational events regulated by feedback within a genomic network. Thus, it is more appropriate to say that functions are generated and regulated epigenetically. In view of the foregoing, this work postulates that the patterns and forms for organizing genetic information from the Igs observed neither explain nor solve the problem of Ab diversification; the recognition phenomenon occurs when the Ag and the Ab meet at a given moment and in a given context. In other words, it is important to distinguish between “the geno” and “the phenon”, which, although inseparable, are not a lineal consequence but are mutually co-determined within a dual geno-phenomenological unity.

## 1. INTRODUCCIÓN

Se ha propuesto que la función primordial del sistema inmune de los vertebrados es la de interaccionar con el mismo, otros sistemas y el entorno (Varela y Coutinho 1991; Mazumdar 1995; Cohn y Langman 1996). Puesto que la variedad del mundo antigénico propio y ajeno es enorme, una maquinaria inmunológica eficaz debería estar provista con repertorios de receptores de gran diversidad capaces de contribuir eficientemente a su reconocimiento y procesamiento. De forma general se ha planteado que la diversidad en los organismos está determinada por sus genes (Behe 1996; Tauber y Podolsky 1997). Siguiendo esta misma línea, en particular dentro del sistema inmune la diversidad en el repertorio de anticuerpos (Acs) se ha propuesto es generada por procesos genéticos y somáticos (Max 1998). Es decir, en general los organismos mantienen grandes familias multigénicas con miembros muy diversos que codifican para numerosos dominios V. Esta diversidad es aumentada por mecanismos somáticos como la recombinación, unión imprecisa de segmentos génicos, hipermutación (Tonegawa 1983) y conversión génica (Becker y Knight 1990; McCormack y col. 1991); mecanismos que se describen a detalle en la siguiente sección. Mientras que los mecanismos que operan para diversificar el repertorio de Acs a nivel somático se han estudiado con gran detalle, poco se sabe de la diversificación del repertorio de Acs a nivel germinal. A lo más existen algunos estudios en los que a través de comparar los procesos de diversificación somática y germinal, han observado que es la diversidad de origen germinal la que a través de la evolución de sus genes ha moldeado la diversidad apropiada de sitios de unión al antígeno, siendo que la hipermutación somática se centra en mejorar el ajuste fino de la unión con sus ligandos (Tomlinson y col. 1996; Ramírez-Benítez y Almagro 2001). Este escaso entendimiento en

la diversificación germinal es debido en parte a que la configuración, composición y evolución de los segmentos génicos codificadores es muy compleja (Li y col. 2002). Sin embargo, la complejidad de los genomas no ha sido la única limitación para el estudio y el entendimiento de los mecanismos por diversificación germinal, sino también la aceptación y utilización de conceptos y/o modelos poco entendidos. Por ejemplo, dentro de las proteínas el MHC y las inmunoglobulinas (Igs), son los prototipos para estudiar la evolución rápida (Wilson y col. 1977; Kataoka y col. 1982; Perlmutter y col. 1985; Klein 1986; Klein y col. 1993), ya que se asumen altamente polimórficos. Esto último es producto principalmente de las observaciones generalizadas de que en ciertos genes se han encontrado numerosos alelos (2-70 con 11 alelos, 4-34 con 12 alelos y 3-30 con 18 alelos entre otros) (Olee y col. 1991; Campbell y col. 1992; Tomlinson y col. 1992; Weng y col. 1992; van Es y col. 1992). No obstante, algunos estudios presentan resultados que van en contradicción con esta lógica. Booker y Haughton (1994), encontraron que algunos genes de Igs presentan una velocidad evolutiva extremadamente baja. Así también los estudios filogenéticos en varias especies han mostrado que las familias de Ig se han mantenido bastante estables en el tiempo, siendo que es posible observar un moderado grado de similitud entre las secuencias de distintas especies (Andersson y Matsunaga 1995; Ota y col. 2000). Esto mismo es también válido para todas las familias multigénicas que unen antígenos (Litman y col. 1999). Considerando las evidencias que indican que en la evolución de las Igs convergen diversas y en ocasiones contradictorias fuerzas, resulta importante explorar más a fondo la naturaleza de los procesos de diversificación en estas proteínas. Esto ya que el conocer y entender el repertorio germinal, así como sus procesos de diversificación evolutiva, puede contribuir a comprender la presencia o ausencia de ciertos alelos o haplotipos, así como la expresión diferencial de genes V y su relación con

ciertas patologías (Milner y col. 1995). Como ya se mencionó anteriormente, mucho se habla de cuan polimórficos son los genes de Ig, sin embargo, son muy pocos los estudios en los que se evalúa el contenido de información genética y estructural de las secuencias en el marco de los procesos de evolución molecular. Es decir, en la mayoría de los estudios que analizan y comparan secuencias de Igs, la distancia evolutiva es considerada como una medida de la separación temporal y suponen tácitamente que las probabilidades de sustitución son uniformes e invariantes en todas las posiciones, tal como ha sido observado en los genes de proteínas invariantes o poco variables (Eigen y col. 1988). No obstante, es bien sabido que la diversificación en las regiones variables de las Igs no se distribuye de forma homogénea en todas las regiones y posiciones (Wu y Kabat 1970; Kirkham y Schroeder 1994). Desde este punto de vista, la variabilidad puede ir desde la total conservación en algunas posiciones hasta la hipervariabilidad en otras (Eigen y col. 1988). Más aún, visiones más cercanas a la complejidad biológica de las macromoléculas nos dicen que no todas las sustituciones de aminoácido en una proteína dada tienen el mismo impacto para la evolución (Zuckerandl 1976). Algunos autores han propuesto que para poder medir la significancia de una mutación para la evolución y poder usar la información posicional, es necesario analizar las secuencias de forma vertical en adición al análisis horizontal (Schneider y col. 1986; Berg y von Hippel 1988; Eigen y col. 1988; Lopez-Bueno y Moya 1992; Kuznetsov y Morozov 1996; Nieselt-Struwe 1997), y considerar diferentes categorías para las posiciones de acuerdo a la función que estas desarrollan (Zuckerandl 1976). Es decir, el estudio de los procesos de diversificación genética no sólo incluye la variación en las frecuencias alélicas o en la distancia entre los alelos, sino también el análisis de patrones en las sustituciones y de sus implicaciones a nivel estructural.

Hasta ahora, dentro de las mutaciones observadas en los genes de línea germinal de las Igs, se ha visto que los procesos de diversificación y selección promueven la variabilidad de los aminoácidos en el sitio de unión al antígeno y conserva los aminoácidos de las regiones de andamiaje o “frameworks” (FRs). Esta marcada conservación del FR está relacionada con su función de mantener el plegamiento del dominio, y consecuentemente conservar la estructura general del sitio de unión al antígeno (Tanaka y Nei 1989; Kirkham y Schroeder 1994; Vargas-Madrado y col. 1994; Tomlinson y col. 1996). No obstante, se ha visto que la variabilidad en los dominios V de las Igs no sólo se promueve en los CDRs (Regiones que Determinan la Complementariedad), siendo que algunos FRs son más susceptibles a procesos de diversificación y otros son altamente conservados (Kirkham y col. 1992). Existen evidencias que indican que estas diferencias de conservación pueden atribuirse a las distintas funciones que juegan estos sub-segmentos en el Ac (Kirkham y col. 1992, 1994). Más aún, a pesar de que en los Acs existe una marcada diferencia en los patrones evolutivos entre FRs y CDRs (Kabat 1978; Lara-Ochoa y col. 1995), dentro de cada región existen patrones de variación muy diversos por posición (Vargas-Madrado y col. 1994), lo cual se correlaciona con el tipo de función de cada residuo (en contacto, moduladores o compensadores) (Edelman y Gall 1969). Por ejemplo, en los CDRs se presentan posiciones hipervariables con elevada frecuencia de contacto con el antígeno (Padlan y col. 1995; MacCallum y col. 1996; Ramírez-Benítez y Almagro 2001), mientras otras posiciones altamente conservadas preservan la estructura del sitio de unión al antígeno (Chothia y Lesk 1987; Padlan 1990; Foote y Winter 1992; Vargas-Madrado y col. 1994).

Dentro de las regiones codificadoras la sustitución de aminoácidos permite crear alelos que implican variantes estructurales respecto al alelo principal. Este proceso permite explorar el espacio de sitios de unión al antígeno hacia una mejor adaptación respecto al

universo antigénico propio y extraño existente en un periodo evolutivo (Ota y col. 2000). Con todo, no existe una caracterización detallada de las implicaciones para el mecanismo de reconocimiento molecular inmune que genera el polimorfismo de sustitución. La mayoría de los estudios que evalúan el polimorfismo de sustitución, se centran en el cálculo de las frecuencias alélicas en una población (Sasso y col. 1990; van Dijk y col. 1991; Sasso y col. 1993; Cui y Li 1998). Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, esta no es la única forma de caracterizar el complejo proceso que implica la evolución por polimorfismo. El polimorfismo de un locus puede también ser caracterizado por el número de mutaciones por alelo (Li 1997), así como por la distribución y tipo de sustituciones a lo largo del gen (Eigen y col. 1988).

Dado lo anterior resulta de interés profundizar en la comprensión de las estrategias de evolución molecular en el repertorio de Acs, a través de una caracterización integral y detallada de los patrones de sustitución en alelos de genes V de Igs que considere sus particularidades funcionales. En este trabajo, nos planteamos estudiar algunos aspectos de la evolución molecular por variación alélica de los genes IgV y las consecuencias de estas alteraciones sobre las propiedades estructurales del sitio de unión al antígeno. Esto permitirá entender con más detalle las estrategias que utiliza el sistema inmune para crear repertorios diversos de Acs capaces de reconocer lo propio y lo ajeno con afinidad y especificidad adecuadas.

## **2. ANTECEDENTES**

### ***2.1. Estructura de las inmunoglobulinas***

Las Igs son complejos proteicos antígeno-específicos sintetizados por los vertebrados a través de las células B como Acs que reconocen y captan a los antígenos. Las Igs son

universo antigénico propio y extraño existente en un periodo evolutivo (Ota y col. 2000). Con todo, no existe una caracterización detallada de las implicaciones para el mecanismo de reconocimiento molecular inmune que genera el polimorfismo de sustitución. La mayoría de los estudios que evalúan el polimorfismo de sustitución, se centran en el cálculo de las frecuencias alélicas en una población (Sasso y col. 1990; van Dijk y col. 1991; Sasso y col. 1993; Cui y Li 1998). Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, esta no es la única forma de caracterizar el complejo proceso que implica la evolución por polimorfismo. El polimorfismo de un locus puede también ser caracterizado por el número de mutaciones por alelo (Li 1997), así como por la distribución y tipo de sustituciones a lo largo del gen (Eigen y col. 1988).

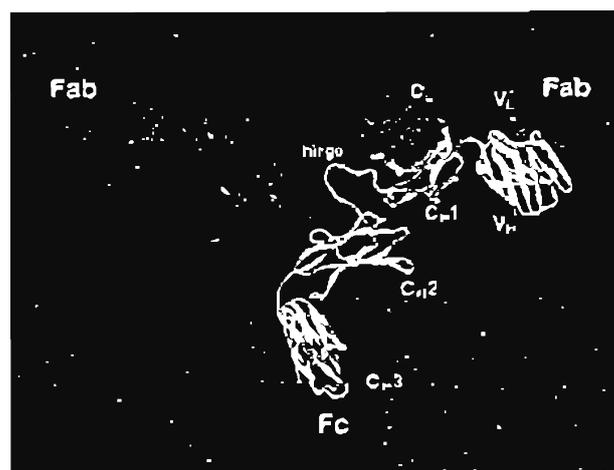
Dado lo anterior resulta de interés profundizar en la comprensión de las estrategias de evolución molecular en el repertorio de Acs, a través de una caracterización integral y detallada de los patrones de sustitución en alelos de genes V de Igs que considere sus particularidades funcionales. En este trabajo, nos planteamos estudiar algunos aspectos de la evolución molecular por variación alélica de los genes IgV y las consecuencias de estas alteraciones sobre las propiedades estructurales del sitio de unión al antígeno. Esto permitirá entender con más detalle las estrategias que utiliza el sistema inmune para crear repertorios diversos de Acs capaces de reconocer lo propio y lo ajeno con afinidad y especificidad adecuadas.

## **2. ANTECEDENTES**

### ***2.1. Estructura de las inmunoglobulinas***

Las Igs son complejos proteicos antígeno-específicos sintetizados por los vertebrados a través de las células B como Acs que reconocen y captan a los antígenos. Las Igs son

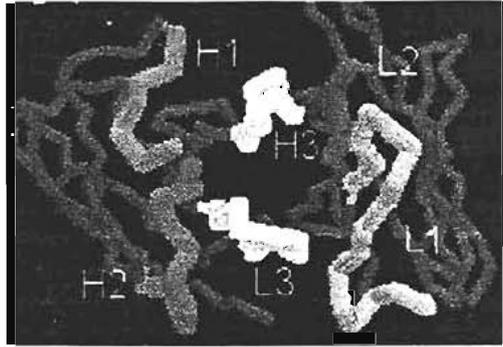
proteínas multiméricas que consisten de sub-unidades globulares arregladas en pares. La estructura básica de una Ig está formada por cuatro cadenas polipeptídicas; dos de ellas son cadenas pesadas (H), y las otras dos cadenas son ligeras (L) (Figura 1), designadas pesadas y ligeras debido a la longitud de sus cadenas (Day 1990). Ambas cadenas (L y H), están formadas por segmentos repetidos que se pliegan para formar una unidad compacta globular denominada dominio (Edelman y Gall 1969). Las cadenas L, constan de un dominio variable (VL) y uno constante (CL). Las cadenas H constan de un dominio variable (VH) y de tres a cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3, CH4) (Figura 1). Todos los dominios son unidos por enlaces disulfuro intracadena. A la región que une CH1 y CH2 a través de un enlace disulfuro se le denomina región bisagra (Amzel y Poljak 1979). Cada uno de los dominios de la Ig tiene estructuras homólogas. Es decir, cada dominio está formado por dos hojas  $\beta$  plegadas que se empaquetan cara a cara a través de un enlace disulfuro conservado. Para los dominios V, una de las hojas está formada por cuatro hebras  $\beta$  y la otra hoja está formada por 5 hebras  $\beta$ , todas las hebras corren antiparalelamente a lo largo de cada hoja (Amzel y Poljak 1979).



**Figura 1.** Estructura básica de una inmunoglobulina

En la figura se muestra la estructura cristalográfica de una inmunoglobulina completa. En azul y amarillo se encuentran representadas las cadenas pesadas (H) (constantes y variables) y en rojo las cadenas ligeras (L) (constantes y variables).

Los dominios constantes de la cadena pesada le proporcionan el isotipo a la Ig y son los responsables de las funciones inmunológicas efectoras. Los dominios variables pesados (VH) y ligeros (VL) se encuentran en el extremo amino terminal de cada cadena e interactúan para formar el superdominio variable. Este superdominio está involucrado en la interacción antígeno-anticuerpo y su extremo N-terminal varía de un anticuerpo a otro. Dentro del superdominio variable se encuentra el sitio de unión al antígeno, el cual está constituido por regiones hipervariables con una estructura de asa denominadas CDRs y FRs, que son zonas altamente conservadas (Wu y Kabat 1970). El sitio de unión al antígeno está compuesto por 6 asas hipervariables; 3 de VH y 3 de VL denominadas H1, H2, H3 y L1, L2, L3 respectivamente; y 8 FRs, 4 de cada dominio denominados FR1, FR2, FR3 y FR4 (Poljak y col. 1973). H1, H2 y H3 se localizan entre las posiciones 26 al 32, 52 al 56 y 96 al 101 y L1, L2 y L3 entre las posiciones 26 al 32, 50 al 52 y 91 al 96 (Figura 2). La variedad y el número de aminoácidos que forman las asas de una Ig es diferente entre una asa y otra. Así por ejemplo dentro de VH se pueden dar inserciones en 31a, 31b, 52a, 52b, 52c y 82a, 82b, 82c, mientras que en VL las inserciones se pueden localizar en 31a, 31b, 31c, 31d, 31e, 31f y 95a, 95b, 95c, 95d, 95e, 95f (Chothia y Lesk 1987). También como veremos más adelante la conformación que adquiere cada una de las asas puede variar de una Ig a otra en dependencia del número y la secuencia de aminoácidos (Chothia y Lesk 1987).

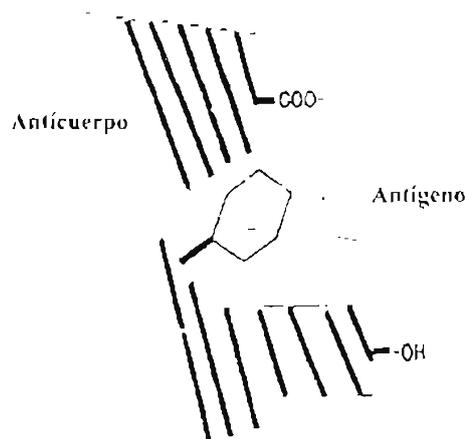


**Figura 2.** Sitio de unión al antígeno compuesto de 6 asas hipervariables (H1, H2, H3, L1, L2 y L3)  
 Estructura cristalográfica del sitio de unión al antígeno de una inmunoglobulina visto por arriba, en la que se distinguen las 6 asas hipervariables que lo integran H3 y L3 al centro y las demás en la periferia.

## 2.2. Mecanismo de reconocimiento molecular inmune

### 2.2.1. Complementariedad química y geométrica (modelo llave-cerradura)

El sitio de unión al antígeno es capaz de interactuar y reconocer antígenos con una gran especificidad. De forma general, bajo el modelo de la Llave-Cerradura, la especificidad entre un ligando y un receptor se encuentra determinada fundamentalmente por la complementariedad. La complementariedad del antígeno (Ag) y el Ac está dada por dos componentes: uno geométrico y otro químico (Figura 3) (Branden y Poljak 1995).



**Figura 3.** Complementariedad química y geométrica

Unión complementaria entre el par Ag-Ac, la región del anticuerpo en contacto con el Ag se encuentra subrayada.

Es decir, la unión entre el Ag y el Ac es el resultado de la interacción químico-molecular (composición química) de ambas partes. Dicha unión se da a través de interacciones de tipo débil tales como puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas. A pesar de que la composición química complementaria es esencial para que se de la interacción del par Ag-Ac, esta complementariedad química es fuertemente dependiente de la distancia interatómica. Por lo que aunado a la complementación de las interacciones débiles la unión necesitará de una geometría complementaria que permita el acercamiento óptimo. Como resultado de este acercamiento óptimo se posibilita la interacción química significativa (Pauling 1945).

Estudios estructurales en Acs, han reportado que dentro de los factores que repercuten en la complementariedad química y geométrica (propiedades intrínsecas) de estas proteínas se encuentran: 1) las longitudes y conformaciones de 5 de las 6 asas hipervariables (H3 es un caso particular), 2) la longitud y conformación de H3, 3) las posiciones en contacto con el Ag, 4) la disposición VH:VL y 5) los reajustes conformacionales del Ac en respuesta al Ag ó ajuste inducido; factores que serán descritos a continuación. Cabe destacar que a todos estos factores intrínsecos de la estructura del Ac debemos añadirle las particularidades del Ag reconocido (como la valencia) (Celis y col. 1977; Celis y Larralde 1978) y las circunstancias contextuales en las que ocurre la interacción (Romo-González y col. 2004 – A4).

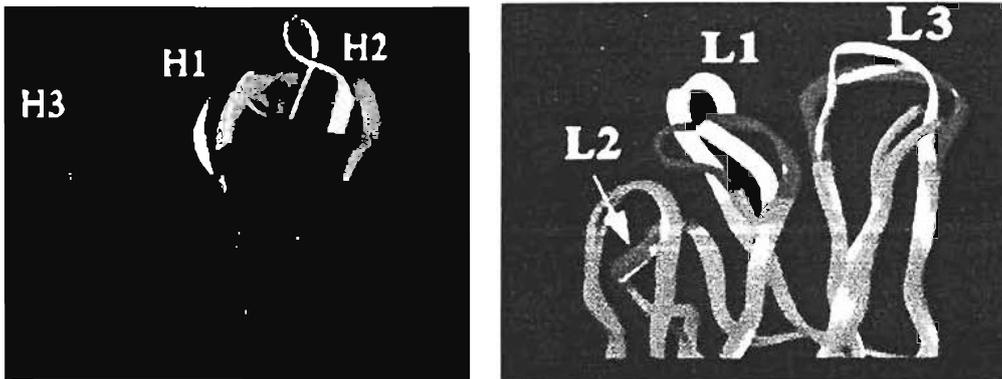
## ***2.2.2. Restricciones estructurales de la diversificación***

### ***2.2.2.1. Estructuras y clases de estructura canónica***

Dentro de las propiedades intrínsecas del Ac, el punto clave que determina la complementariedad y por lo tanto la especificidad es la topología y la composición y

distribución química. El principio central del plegamiento de proteínas indica que la conformación está determinada por la secuencia de aminoácidos (Anfinsen 1973). De acuerdo con esto, es posible relacionar la variación de secuencias en el extremo amino terminal con la diversidad de especificidades y afinidades en el suero (Kabat 1978). Esto debido a que la interacción Ag-Ac es resultado de la suma de un pequeño número de contactos, los cuales son producto: 1) de la conformación del sitio de unión generada por la longitud de los CDRs y 2) por la estructura fina generada por el tipo de cadena lateral en los residuos de los CDRs. Por lo que la variación en la secuencia de aminoácidos y la longitud en las seis asas hipervariables que contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno, son determinantes en la especificidad y afinidad (Martin y Rees 1989).

Sibanda y Thornton (1985) y Efimov (1984) analizando diversas proteínas describieron cómo las conformaciones de las asas de longitud corta y mediana dependían primariamente de la longitud y la presencia de determinados residuos. De acuerdo con esto Chothia y Lesk en 1987 estudiaron las conformaciones de las 6 asas hipervariables que integran el sitio de unión al antígeno, encontrando que el número de conformaciones determinada por las secuencias y la longitud de las asas hipervariables está limitada a tan sólo unas cuantas (Chothia y Lesk 1987). En la actualidad se han descrito diversos tipos de conformaciones para cinco de las seis asas hipervariables (5 de 6 asas debido a que el asa H3 es un caso particular), 3 tipos para H1, 4 tipos para H2, 5 tipos para L1, 1 tipo para L2 y 5 Tipos para L3, a estas conformaciones se les ha denominado estructuras canónicas (SC) (Figura 4) (Chothia y Lesk 1987). Un tipo de SC está determinado por el tamaño del asa y por la presencia de ciertos residuos en posiciones clave, tanto en las regiones del asa como en el FR (Chothia y Lesk 1987).



**Figura 4.** Tipos de estructuras canónicas (SC)

Del lado izquierdo en rojo se encuentran representados las asas del dominio VH y del lado derecho en naranja las de VL. Las variaciones conformacionales o tipos de SC de las asas tanto H como de L se designan en el ápice del asa con otro color.

El que en la actualidad se conozcan varios tipos de SC para cada una de las 5 asas hipervariables, hace posible la estimación del número total de clases de SC (CSC), entendiendo CSC como el producto de la combinación de las diversas conformaciones de las asas hipervariables (Vargas-Madrado y col. 1995). La estimación del número de combinaciones de las diversas conformaciones de las 5 asas hipervariables tomando en cuenta el número de tipos descritos para cada asa genera un total de 300 posibles CSC (Vargas-Madrado y col. 1995). Sin embargo, de las 300 posibles CSC sólo 29 han sido encontradas en los Ac; más aún, de estas 29 las más frecuentemente encontradas son 10 (Vargas-Madrado y col 1995). Esto sugiere, que el repertorio estructural de las Igs está restringido al uso preferencial de un pequeño número de combinaciones de SC en 5 de las 6 asas hipervariables que forman el sitio de unión al antígeno. Ya que las SC están presentes en la mayoría de las secuencias de Ig, se ha podido correlacionar ciertas combinaciones de SC con el tipo de Ag reconocido, esto puede observarse en el hecho de que 6 de las 10 CSC frecuentemente encontradas son preferencialmente específicas para un tipo de Ag (proteínas y haptenos), mientras que las otras 4 son multi-específicas (polisacáridos, ácidos nucleicos, antígenos de superficie, etc.) (Vargas-Madrado y col. 1995). De forma adicional

se ha observado que no todas las aspas hipervariables participan de igual forma para generar diversidad en el repertorio estructural. Vargas-Madrado y col. (1995) al estudiar el repertorio estructural más frecuente de las Igs, encontraron que son H2 y L1, variando su longitud y estructura, las responsables de los cambios conformacionales que permiten reconocer un Ag u a otro ya que H1, L2 y L3 generalmente aparecen en la misma conformación (tipo 1) (Tabla 1).

### Porcentajes de especificidad para cada clase

Clase de Estruct. Canónica	Porcentaje de la clase	Proteína	Superficie antigénica	Polisacárido	Ácido Nucleico	Peptido	Hapteno	Grupo
1-1-2-1-1	3.2	56	0	0	25	0	19	S
1-1-4-1-1	3.7	10	0	33	13	0	44	M
1-2-1-1-1	5.1	5	5	80	5	0	4	S
1-2-2-1-1	24.5	16	44	0	18	0	23	M
1-2-3-1-1	1.9	57	43	0	0	0	0	S
1-2-4-1-1	14.2	11	4	5	24	52	4	S
1-3-2-1-1	7.9	15	26	0	31	20	8	M
1-3-4-1-1	10	43	0	14	11	25	6	M
1-4-3-1-1	6.8	11	0	0	0	0	89	S
1-4-4-1-1	6.6	1	0	0	11	0	55	S
Otras	13.1	26	17	17	6	21	13	

Tabla 1. Distribución de las CSC y su correlación con la especificidad (Vargas-Madrado y col. 1995)

Se reporta para cada asa hipervariable el tipo de SC correspondiente. Adicionalmente, se señala el porcentaje de cada CSC con respecto al número total de secuencias analizadas. Tan sólo 10 clases más frecuentes son reportadas en detalle, las otras 19 se encuentran en la categoría de otras. Las CSC se clasificaron como específicas (S) o multiespecíficas (M).

#### 2.2.2.2. Longitudes de H3

Aunque las observaciones previas postulan que la diversidad del repertorio estructural de los Acs es fuertemente dependiente de la variación de H2 y L1, en algunos otros estudios se ha observado la importancia del papel que juega H3 en el reconocimiento. Esto es, se ha observado que H3 es una importante fuente de diversidad en los Acs ya que al estar justo en el centro del sitio de unión al antígeno y al mostrar mayor variabilidad en longitud (puede cambiar su longitud de 2 a >20 aminoácidos), secuencia y conformaciones que las otras 5

asas que integran el sitio de unión al antígeno (Morea y col. 1998), puede alterar las propiedades químicas y topológicas del sitio de unión al antígeno y por tanto el tipo de ligando a reconocer (Wu y col. 1993; Sanz 1991).

A pesar de esta gran variabilidad en H3, se ha observado mediante análisis conformacionales, que H3 muestra algunas regularidades (aunque menos claras que las observadas en las otras cinco asas) sobre todo en la zona proximal al FR (Martin y Thornton 1996; Shirai y col. 1996; Morea y col. 1998; Shirai y col. 1998), regularidades que son fuertemente dependientes del ambiente (Morea y col. 1998). Tales regularidades o restricciones se han observado tanto en la topología como en la composición química de esta asa en los diversos Acs. Por ejemplo, diversas evidencias han mostrado que la longitud de H3 se correlaciona con el tipo de Ag reconocido. Así los Acs que responden contra Ag grandes (virus, proteínas y ácidos nucleicos) tienen H3 más largas que los Acs que reconocen Ag pequeños (peptidos, carbohidratos y haptenos) (Vargas-Madrado y col. 1995; Johnson y Wu 1998; Collis y col. 2003). De igual forma, la utilización de aminoácidos dentro de esta asa no es al azar sino que se sesga hacia el uso de aminoácidos con características neutras e hidrofílicas como son la tirosina, glicina y serina. Además, se ha visto que esta distribución sesgada es de gran importancia para el mecanismo de reconocimiento ya que le confiere estabilidad (con prolina) o flexibilidad (con glicinas) al sitio de unión al antígeno lo cual influencia la especificidad y/o afinidad del Ac (Afonin y col. 2001; Zemlin y col. 2003). Cabe destacar que estas mismas restricciones en el uso de aminoácidos (como se verá en la siguiente sección) también han sido observadas en las otras cinco asas hipervariables (Vargas-Madrado y col. 1994).

Estas características permiten postular a H3 como el factor clave en la modulación de la forma del sitio de unión al antígeno (Vargas-Madrado y col 1995) y por tanto en la

determinación de la afinidad y especificidad del Ac (Tonegawa 1983; Chothia y col. 1989; Wilson y Stanfield 1993; Padlan 1994).

### *2.2.2.3. Uso diferencial de aminoácidos por posición*

Hasta ahora se ha analizado cómo la topología del sitio de unión al antígeno está limitada a un número pequeño de conformaciones, sin embargo, este no es el único factor que determina la complementariedad con el Ag. Otro componente que hace posible la interacción Ag-Ac es la participación de las cadenas laterales; las cuales determinan la superficie de contacto y la distribución de grupos químicos (Mian y col. 1991) que posibilitará la unión Ag-Ac. A este respecto, análisis de frecuencia de aminoácidos en los CDRs han mostrado que algunas posiciones son ocupadas por aminoácidos altamente conservados (Vargas-Madrado y col. 1994), los cuales se presume participan en mantener algunas características importantes ya sean estructurales o funcionales en las regiones de reconocimiento de las Igs (Edelman y Gall 1969; Kabat y col. 1977). Otras posiciones no son tan conservadas, en algunas de estas se observan sustituciones donde se intercambian aminoácidos con propiedades similares (Mian y col. 1991; Lim y Sauer 1989), y en otros casos se presenta hipervariabilidad restringida a 5-10 aminoácidos con propiedades físicoquímicas diferentes (Tabla 2) (Vargas-Madrado y col. 1994).

Por otra parte se observó que algunos residuos, que se encuentran en las asas interactuando frecuentemente con el epítopo y que por lo tanto podrían estar determinando la especificidad, son posiciones hipervariables (Padlan y col. 1995), aunque, como ya hemos mencionado, esta hipervariabilidad es acotada.

Porcentaje de composición

Sitio	Sitios Conservados	Sitios Hipervariables
<b>CDR-1</b>		
26	G98%	
27	E48%, A10%	
28	D27%, S27%	
29	Y76%, L11%	
30	E50%, S41%	
31	S48%, D25%	
32	Y65%, G11%	
33		Y32%+20,60%; W22%+17,60%; G21%+16,80%
34	A60%, L11%, A8%	
35		H26%+17,33%; S24%+16,55%; S20%+7,53%; E7%
<b>CDR-2</b>		
50		V20%+13,33%; R12%+2,45%; A19%+3,36%; A19%+3,11%; L9%+6,20%; W7%+6,00%
51	D8%	
52		N28%+18,29%; S17%+3,55%; A13%+9,82%; H12%+2,95%; D11%+8,12%; A8%+7,96%
52a	D56%, N15%, S10%	
52b	K87%	
53		L26%+13,72%; S21%+11,00%; A13%+7,47%; D9%+6,18%; A8%+1,28%
54		S27%+17,84%; G17%+11,37%; S13%+9,37%; D11%+10,20%
55	G61%, S14%, Y13%	
56		S23%+9,57%; A17%+12,31%; T16%+8,09%; G14%+5,64%; N9%+5,29%; D8%+5,54%
57	L76%, H6%	
58		N22%+15,26%; A19%+13,49%; K16%+11,79%; E10%+6,98%
59	V94%	
60	N68%, A21%, S12%	
61		F27%+17,67%; P28%+9,18%; D15%+9,83%; G14%+10,08%; A13%+6,14%
62		K49%+23,77%; S17%+17,37%; A9%+2,17%
63	F16%, V28%, L10%	
64	K77%, A9%	
65	G61%, S23%, D9%	
<b>CDR-3</b>		
95		D14%+13,85%; G14%+7,07%; S12%+2,63%; A10%+7,28%
96		V20%+13,60%; G17%+8,63%; R8%+1,00%; D6%+3,59%
97		Y33%+19,82%; G19%+9,66%; D6%+2,91%
98		Y36%+17,77%; G21%+10,60%; D6%+3,67%
99		L25%+12,05%; A18%+10,96%; S13%+2,70%
100		S20%+6,28%; G19%+7,99%; A13%+7,72%; D6%+2,71%; W4%+2,60%
100a		S25%+7,20%; G15%+6,74%; A12%+5,77%
100b	Y57%, A26%, W14%	
100c	L72%, A12%	
101	D76%, A17%	
102	Y72%, A17%	

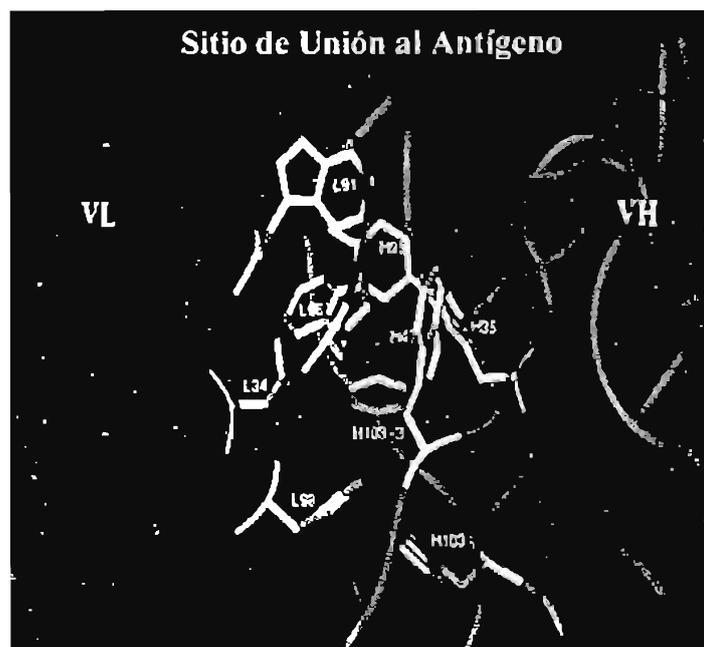
Tabla 2. Composición de los CDRs de la cadena pesada (Vargas-Madrado y col. 1994)

Se calculo el porcentaje de composición de los aminoácidos mas frecuentemente usados en cada posición de los CDRs. Los porcentajes de ocurrencia de los aminoácidos por posición se encuentra en la columna de la derecha y de la izquierda de acuerdo a si la posición es hipervariable o conservada de acuerdo al criterio de Kabat y col. (1991) y Chothia y Lesk (1987).

2.2.2.4. Interfase VH-VL

De lo anterior, hemos podido observar que la topología y composición química de las cadenas laterales que integran el sitio de unión al antígeno pueden ser determinantes en la especificidad. Sin embargo, aunque son las porciones más externas del sitio de unión al antígeno las que interactúan directamente en la unión, estas no son las únicas que influyen en la modulación de las propiedades de reconocimiento. Esto es, el plegamiento y por tanto la función que desarrolle dicha proteína es el resultado de sus propiedades como entidad completa. A este respecto, diversos estudios han reportado que la topología y por tanto la

distribución espacial de las cadenas laterales del sitio de unión al antígeno varía de acuerdo con la asociación dominio-dominio VH-VL (Chothia y col. 1985). Esto debido a que los cambios en la asociación VH-VL pueden modificar las posiciones relativas de las asas hipervariables. Lo anterior, ya que tales cambios pueden alterar a su vez la forma general del sitio de unión al antígeno, así como también la disposición de las cadenas laterales que interactúan directamente con el epítipo (Chang y col. 1985; Colman 1988; Stanfield y col. 1993). Las modificaciones de la asociación VH-VL son el producto de la sustitución de los residuos localizados en el interior de la interfase (Figura 5), ya que generan pequeños reajustes en la disposición relativa entre los dominios (Vargas-Madrado y Paz-García 2003).



**Figura 5.** Interfase VH:VL

En rojo se encuentra representado el dominio VH y en azul el VL. Las cadenas laterales de los residuos involucrados en la interfase se encuentran desplegadas. Los residuos de la zona proximal en blanco y aquellos que corresponden a la zona central en amarillo.

Las pequeñas variaciones en el empaquetado de los dominios VH:VL de diferentes Igs se ha atribuido al hecho de que los aminoácidos en contacto entre las interfases provienen también de los CDRs y no sólo de las regiones conservadas de los FRs (Davies y

col. 1975). Puesto que alrededor de un cuarto de la superficie de la interfase es resultado de la interacción de los CDRs (Chothia y col. 1985) y que las secuencias de estos varían considerablemente de un Ac a otro, hace que la interfase se pueda empaquetar de formas diversas (Colman 1988). Es decir la parte de la interfase que proviene de los residuos de los FRs invariantes que comprenden el 75% de la interfase se pueden acomodar de formas distintas en dependencia de las secuencias de los CDRs, los cuales contribuyen con el 25% restante (Colman 1988; Vargas-Madrado y Paz-García 2003). A través de este mecanismo es posible generar variaciones en el sitio de unión al antígeno dentro de motivos o formas básicas las cuales contribuyan en las propiedades de reconocimiento de los Acs (Chang y col. 1985; Banfield y col. 1997; Chatellier y col. 1996; Khalifa y col. 2000). Por ejemplo, los reemplazos L<sup>L36</sup>A y L<sup>L38</sup>A tienen un efecto mucho más drástico que aquellos en las posiciones homólogas de la cadena pesada (V<sup>H37</sup>A y Q<sup>H39</sup>A); mientras que las sustituciones de alanina en aquellas posiciones localizadas en el fondo del parátipe (F<sup>L98</sup>A y W<sup>H103</sup>A) decrecen drásticamente la energía de unión con el ligando (Chatellier y col. 1996).

Puesto que el acomodo de la interfase es fuertemente dependiente de la secuencia y disposición tanto de los FRs como de los CDRs, algunos grupos de investigación han tratado de determinar si al igual que en las asas hipervariables existen restricciones conformacionales. Es decir, si todos los acomodos son posibles o si existen preferencias hacia alguna disposición (Amit y col. 1986; Chothia y col. 1986; Sheriff y col. 1987). A este respecto, se ha observado que de entre las diversas posiciones relativas o acomodos de los CDRs de la cadena H y L dentro de las Igs sólo existen algunos. A estas familias de interfases VH-VL se les ha denominado interfases canónicas (Colman y col. 1988).

### 2.2.2.5 Ajuste inducido

Hasta aquí se han descrito aquellos atributos estructurales del Ac (o propiedades intrínsecas) que determinan el reconocimiento. Sin embargo, no podemos olvidar que la especificidad y la afinidad se construyen durante la confrontación del Ag con el Ac. Es decir, se crean en el momento en que un receptor se une a un ligando y no a otro(s), por lo que ambas partes son dependientes del grado de precisión del encaje de una molécula con la otra (Figura 6) (Day 1990).

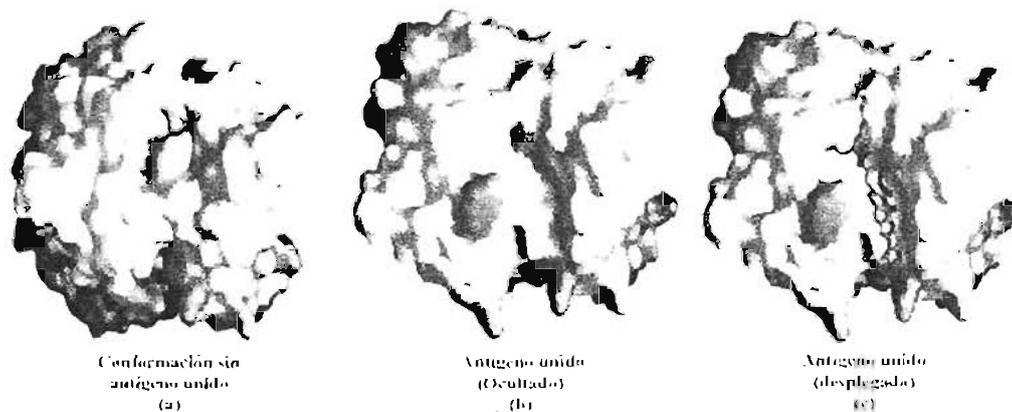


Figura 6. Ajuste inducido

Las variaciones conformacionales del Ac libre y producto del acomplejamiento con un Ag se muestran en las estructuras denominadas a, b y c. En (a) se muestra el Ac libre y en (b) y (c) acomplejado, el (c) se diferencia por estar el Ag expuesto.

A este respecto diversos estudios han reportado la existencia de cambios conformacionales, en los cuales se dan pequeños cambios en los ángulos de torsión de los dominios rearrreglados, producto del encuentro de un Ac con un Ag (Edmundson y col. 1974, 1984, 1987; Edmundson y Ely 1985; Colman 1988; Bhat y col. 1990; Herron y col. 1991; Rini y col. 1992). La contribución de los cambios conformacionales en el Ac o el Ag durante el acomplejamiento se han postulado como producto de: 1) las variaciones conformacionales en las asas que integran el sitio de unión al Ag (sobre todo en L3 y H3,

localizadas hacia el centro del sitio de unión al antígeno) (James y col. 2003), 2) de los cambios en las posiciones espaciales u orientaciones (movimientos de cuerpo rígido) de las mismas, las cuales son independientes de los cambios conformacionales que puedan presentarse en el transcurso de la reacción (Bajorath y col. 1995), 3) rotaciones de las cadenas laterales y 4) alteración en la disposición entre los dominios variable ligero y pesado (Vargas-Madrado y Paz-García 2003).

A pesar de que las influencias que ocurren durante el reconocimiento del par Ag-Ac son fundamentales, su especificidad no sólo incluye al par Ag-Ac como lo define van Regenmortel (1989), sino que la especificidad es producto del evento que conjuga al Ag-Ac dentro de una circunstancia del entorno, en un cierto espacio-tiempo y conectada a algún evento biológico discernible (Romo-González y col. 2004 – A4).

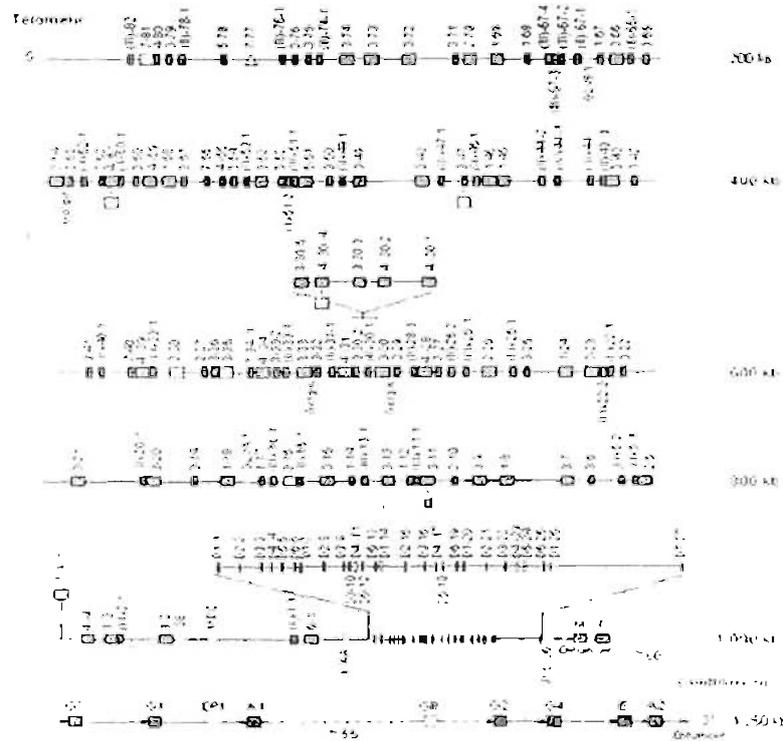
De todo lo anterior se hace evidente que el sitio de unión al antígeno de las Igs, presenta patrones estructurales y/o funcionales que determinarán de acuerdo a cierta estrategia evolutiva la complementariedad química y geométrica (Vargas-Madrado y col. 1994, Lara-Ochoa y col. 1995). Esto es, el que el pequeño número de formas existentes en las regiones de reconocimiento sean capaces de contener la gran variedad de Ags propios y ajenos, el que estas formas estén controladas por el tamaño del asa y residuos clave y que la complementariedad química es controlada a través de la variabilidad e hipervariabilidad sesgada de los aminoácidos en la superficie del sitio de reconocimiento, indican la existencia de una importante fuerza evolutiva no sólo en términos de restricciones estructurales, sino también en términos de propiedades de reconocimiento actuando sobre los genes que codifican el repertorio de Ac. Lo anterior es consistente con el conjunto de observaciones realizadas por nuestro grupo y que indican la existencia de una correlación

entre la evolución del repertorio estructural de Acs, la evolución de sus genes (Vargas-Madrado y col. 1995; Almagro y col. 1997; Vargas-Madrado y col. 1997) y su uso (Schroeder y col. 1995; Brezinschek y col. 1995; Davidkova y col. 1997); correlaciones que se describen a continuación.

### ***2.2.3. Restricciones genéticas de la diversificación***

El locus de las Igs está compuesto por múltiples genes, los de región variable de cadena pesada ( $V_H$ , D y  $J_H$ ), los de región variable de cadena ligera ( $V_K$ - $J_K$  y  $V_\lambda$ - $J_\lambda$ ) y los de la región constante ( $C_H$  y  $C_L$ ); los cuales han evolucionado para generar un repertorio de línea germinal diverso (Pascual y Capra 1991). Análisis de homología entre los segmentos génicos V han revelado que estos pueden ser agrupados en familias discretas. Los segmentos  $V_H$  que tienen una similitud del 80% o más son considerados dentro de la misma familia, mientras que aquellos con una similitud del 70% o menos entre ellos forman diferentes familias (Kodaira y col. 1986; Lee y col. 1987; Shen y col. 1987; Berman y col. 1988). La nomenclatura de estos sub-grupos o familias se basa en el orden de su descubrimiento (Pascual y Capra 1991; Matsuda y Honjo 1996). Así por ejemplo los segmentos  $V_H$  pueden ser clasificados en 7 familias,  $V_{H1}$ - $V_{H7}$ , criterio que ha sido corroborado por la construcción de un árbol filogenético que agrupa todos los genes funcionales localizados en la región 3' 0.8-Mb del locus  $V_H$  (Haino y col. 1994). Lo mismo ocurre con los segmentos  $V_K$  y  $V_\lambda$  los cuales constan de 7 y 11 familias respectivamente. El locus principal de humano  $V_H$  tiene una longitud de 1250 kb y contiene aproximadamente 95 segmentos, mientras que  $V_K$  y  $V_\lambda$  tienen una longitud de 1820 y 1050 kb y contienen aproximadamente 76 y 74 segmentos, respectivamente. A pesar de que los miembros de las

diferentes familias están dispuestas a través de los loci, no todos los segmentos V son funcionales o activos para el repertorio de Ac (Figura 7). Por ejemplo de los 95 segmentos  $V_H$  sólo 51 son considerados funcionales (Tomlinson y col. 1992). Dentro de estos genes los que aportan mayor número para el repertorio de Ac son los de la familia  $V_H3$ , seguido por las familias  $V_H1$  y  $V_H4$  ya que las familias  $V_H2$ ,  $V_H5$ ,  $V_H6$  y  $V_H7$  sólo contribuyen con un pequeño número (Cook y Tomlinson 1995).



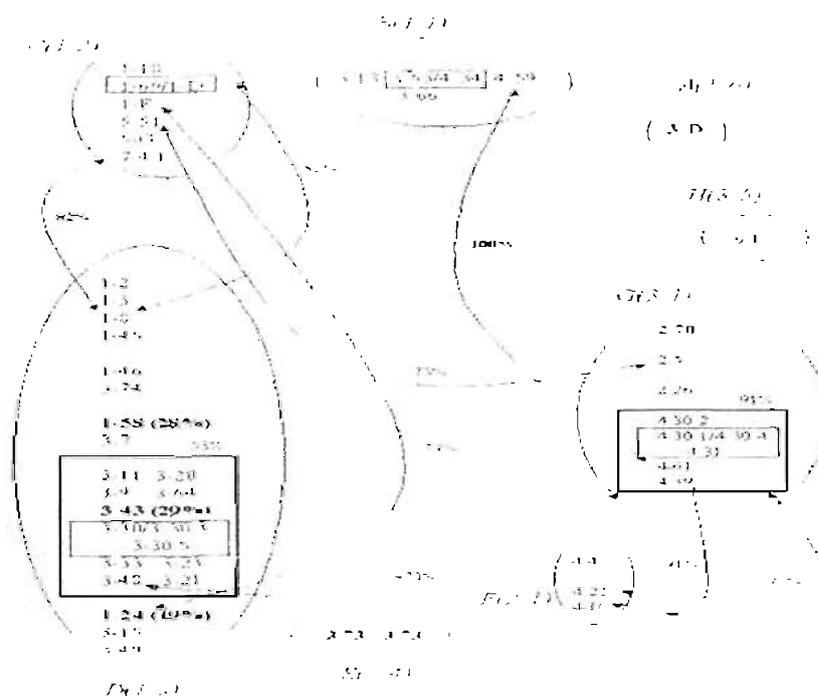
**Figura 7.** Mapa del locus  $V_H$  de inmunoglobulinas humanas

En verde se representan los genes  $V_H$  funcionales, en amarillo los ORF y en rojo los pseudogenes. En azul los genes  $D_H$  y  $C_H$

Estas evidencias postulan que no todos los genes ni todas las familias son de igual importancia para el repertorio de Acs ya que sólo se han seleccionado algunos para ser funcionales y no todas las familias se diversifican con la misma intensidad. Estas mismas fuerzas heterogéneas que moldean el repertorio genético de los Acs han sido observadas a muy diversos niveles (genéticos y estructurales) como veremos más adelante.



Por lo que la expresión diferencial de genes o grupos de genes puede estar asociada a cambios en las propiedades de reconocimiento de los Acs (Pascual y Capra 1991). A este respecto Vargas-Madrado y Paz-García. (2001) correlacionaron las propiedades de reconocimiento con el tipo de Acs que pueden ser codificados y expresados por sus genes. Lo anterior mediante la clasificación de las secuencias de Ig según criterios estructurales que consideran la información más relevante para las propiedades estructurales que median el reconocimiento (tales como tipo de conformación que adoptan las asas hipervariables o patrón de variabilidad de los residuos para cada posición, etc.). Esta clasificación dio pie a la creación de mapas de identidad (Figura 8) que ayudan a identificar algunos aspectos de la evolución molecular de los genes IgV, así como genes individuales y grupos de genes con características especiales en términos de los atributos que determinan las propiedades de reconocimiento de los Acs (Vargas-Madrado y Paz-García 2001). Esto es de gran utilidad sobre todo para el entendimiento del uso preferencial de genes IgV, que como veremos en la siguiente sección, se ha observado que ocurre en el repertorio de Acs.



**Figura 8.** Mapa Bidimensional del locus VH (Vargas-Madrado y Paz-García 2001).

En esta figura se encuentran agrupados dentro de círculos ovales los genes que codifican para la misma CSC. Los genes con alta identidad (>70%) se han agrupado dentro de rectángulos con líneas gruesas y aquellos genes idénticos con líneas delgadas. Los genes o grupos de genes que presentan alta identidad han sido conectados con flechas y su porcentaje de identidad es reportado cerca de cada línea.

### 2.2.3.2. *Uso preferencial de genes*

Como vimos anteriormente no todas las familias de genes de Igs contienen el mismo número de genes, siendo que, por ejemplo en el locus  $V_H$  de humano la complejidad por número de genes es como sigue  $V_{H3} > V_{H1} > V_{H4} > V_{H2} > V_{H5} > V_{H6} > V_{H7}$  (Pascual y Capra 1991; Cook y Tomlinson 1995). Siguiendo esta lógica, si cada segmento de genes tiene la misma oportunidad de experimentar rearrreglos para formar una unidad de transcripción VDJ funcional, entonces el repertorio expresado debe reflejar fielmente la composición de la línea germinal. Sin embargo, esta complejidad genómica ya sea a nivel de familias  $V_H$  y/o genes individuales puede o no ser reflejada en el repertorio de Acs. Más aún, la complejidad es dependiente de diversos factores que aún no están bien determinados (Schroeder y col. 1995; Brezinschek y col. 1995; Davidkova y col. 1997). A este respecto, se ha observado que a lo largo de la vida del humano casi todas las familias  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  son utilizadas (Guigou y col. 1990, Schroeder y col. 1995). No obstante, entre repertorios fetales y adultos existen notables diferencias que son especialmente vistas tanto en el uso de genes individuales  $V_H$ , como en la diversificación de H3 (Kearney y col. 1989; Coutinho 1989; Freitas y col. 1991; Sanz 1991; Thomas-Vaslin y col. 1991; Viale y col. 1993; Feeney 1992; Malanchere y col. 1995; Mouthon y col. 1995; Nobrega y col. 1996; Schroeder y col. 2001; Zemlin y col. 2002). Por ejemplo, en los repertorios fetales, existe una mayor frecuencia en el uso de los genes V3-23, V3-30.3 y de V6-1 que en los adultos (Davidkova y col. 1997; Lacroix-Desmazes y col. 1998). Ahora bien, específicamente en

cuanto al uso de genes  $V_H$  en los repertorios de Acs en adultos, los múltiples estudios llevados a cabo en individuos caucásicos sanos, muestran que no existe un consenso en cuanto a si el repertorio refleja o no la complejidad genómica de las familias  $V_H$ . Mientras que ciertos estudios muestran que algunos individuos expresan un uso similar a la complejidad genómica (mostrando inclusive una distribución relativamente estable en el tiempo en un mismo individuo) (Guigou 1990, Huang y col. 1992; Kraj 1995; Demaison y col. 1995; van Dijk-Hard y Lundkvist 2002); otros estudios muestran a individuos que preferentemente expresan algunas familias  $V_H$  (Zouali y Theze 1991; Huang y col. 1992; Davidkova y col. 1997). Por ejemplo  $V_{H5}$ ,  $V_{H6}$  y  $V_{H7}$  que representan a las familias más pequeñas, se ha visto que su distribución es transitoria con respecto al tiempo, ya que después de 11 meses, regresa a ser similar a la complejidad genómica (Huang y col. 1992; Huang y Stollar 1993). Por otro lado, lo que se evidencia más claramente entre los diversos estudios es que todos los individuos muestran un uso preferente de genes  $V_H$  individuales (Huang y Stollar 1993; Stewart y col. 1993; Klein y col. 1994; Brezinschek y col. 1995; Suzuki y col. 1995; Davidkova y col. 1997), algunos de los cuales su expresión es estable en el tiempo ( $V3-23$ ,  $V4-34$ ,  $V4-59$  y  $V3-30$ ) (Suzuki y col. 1995; Huang y col. 1992).

Resumiendo, el locus V de las Igs está compuesto por múltiples genes los cuales han evolucionado para generar un repertorio de línea germinal diverso. La evolución de los genes Ig se refleja en su agrupamiento en familias y clanes de genes y ha sido moldeada a través de presiones selectivas como las observadas sobre la variabilidad de diversos factores estructurales ya mencionados. El hecho de que en distintos niveles estructurales (dominios, sub-regiones, posiciones, etc.) se observe una diversidad restringida y estrechamente correlacionada con la evolución y diversificación de los genes, sugiere la

existencia de estrategias en la evolución de los repertorios de receptores específicos del sistema inmune. Puesto que todas las estrategias que están operando en el reconocimiento y su expresión en los patrones observados a distintos niveles en la estructura del Ac son el producto de los eventos evolutivos ocurridos a nivel genético (Rothenfluh y col. 1995), el estudio de los mecanismos que generan la diversidad ya sea a nivel evolutivo (variación en los genes de línea germinal, evolución de mecanismos de rearreglo, etc.), o a nivel somático (rearreglo, edición, hipermutación, etc.) en el repertorio nos permitirá interpretar más claramente los resultados obtenidos en los estudios estructurales y funcionales descritos.

A continuación describimos brevemente el panorama general de los mecanismos genéticos que se han reportado participan en la diversificación del repertorio de Igs.

### ***2.3. Procesos genéticos y evolutivos de la diversificación en las Igs***

#### ***2.3.1. Diversificación del Repertorio***

La diversidad en el repertorio de Acs es generada por procesos genéticos y somáticos (Max 1998). Es decir, en general los organismos mantienen grandes familias multigénicas con miembros muy diversos que codifican para numerosos dominios V. Esta diversidad es aumentada por mecanismos somáticos como la recombinación, unión imprecisa de segmentos génicos, hipermutación (Tonegawa 1983) y conversión génica (Becker y Knight 1990; McCormack y col. 1991). Es decir, es la diversidad de origen germinal la que a través de la evolución de sus genes ha moldeado la diversidad apropiada de sitios de unión al antígeno, siendo que la hipermutación somática se centra en mejorar el ajuste fino de la unión con sus ligandos (Tomlinson y col. 1996; Ramírez-Benítez y Almagro 2001). Tales fuerzas y mecanismos se describen a continuación.

### *2.3.1.1. Diversificación Somática*

Los mecanismos que operan para diversificar el repertorio de Acs a nivel somático se han estudiado con gran detalle. De forma general se ha planteado que la diversidad somática está dada por dos mecanismos: la recombinación de los segmentos génicos de línea germinal y la diversificación somática de estos genes. Tales mecanismos implican primordialmente 4 formas de diversificación de las secuencias de Igs, 3 de estas son consecuencia de la recombinación de los genes de la línea germinal que permiten generar los dominios variables de las Igs, mientras que la cuarta es un proceso mutacional o de conversión génica que ha sido descrita ampliamente sobre todo en humano y ratón durante el proceso de maduración (Tonegawa 1983). Adicionalmente a las sustituciones asociadas a estos cuatro mecanismos, recientemente se ha reportado que también existen procesos de inserción y eliminación de tripletes alterando las secuencias de Ig (Wilson y col. 1998; Miura y col. 2003), así como procesos de edición de un receptor de células B pre-existente. En este último, los segmentos génicos de región variable, tanto de la cadena L como de la cadena H, pueden ser cambiados y reemplazados por un nuevo receptor B. La mayoría de las evidencias de estos eventos provienen de sistemas en los cuales genes recombinados o preformados ( $VDJ_H$  o  $VJ_L$ ) son reemplazados por otro (Stiernholm y Berinstein 1994; Fanning y col. 1998; Retter y Nemazee 1998).

La primera fuente de diversificación implica entonces que hay múltiples copias de los segmentos génicos V, D y J, cada uno de los cuales pueden contribuir en la generación de una región variable de la Ig. Por lo que muy diversas regiones variables pueden construirse a través de la combinación de estos segmentos. Puesto que hay aproximadamente 40 genes funcionales  $V_k$  y 5  $J_k$  lo que da un total de 200 diferentes

regiones  $V_{\kappa}$ , y si adicionalmente existen alrededor de 29 genes funcionales  $V_{\lambda}$  y 4  $J_{\lambda}$  lo que da un total de 116 regiones  $V_{\lambda}$ , se ha estimado que alrededor de 316 diferentes cadenas ligeras pueden ser construidas. Por su parte en la cadena pesada, se ha estimado que existen 51 genes funcionales  $V_H$ , aproximadamente 27 segmentos  $D_H$  y 6  $J_H$ ; esto da un total de alrededor de 8,000 diferentes regiones  $VH$  (Janeway y Travers 1997).

Una segunda fuente de diversidad combinatoria proviene del apareamiento de las diversas combinaciones posibles de las regiones  $VH$  y  $VL$  que forman el sitio de unión al antígeno. Se ha propuesto que en teoría  $2.5 \times 10^6$  diferentes moléculas de anticuerpo pueden ser generadas. Sin embargo, no todas las regiones  $VH$  se aparean exitosamente con las regiones  $VL$ , esto hace que el número probable se reduzca (Janeway y Travers 1997).

Diversidad adicional es introducida durante el proceso de recombinación a través de la unión imprecisa de los segmentos  $VDJ$  mediante la adición de nucleótidos  $P$ ,  $N$ ,  $D-D$  y con los cambios de marco de lectura, así como también a través la hipermutación somática la cual introduce mutaciones puntuales en los genes rearrreglados (Janeway y Travers 1997). Este último se asocia con el fenómeno de maduración de la afinidad, proceso que promueve el aumento de la unión con el Ag. La hipermutación somática ocurre cuando las células B responden a un estímulo antigénico. Los genes de región C de las Igs y otros genes expresados en las células B no son afectados, mientras que todos los genes rearrreglados de la región V experimentan mutación, aún si resultan en rearrreglos no productivos y no son expresados (Janeway y Travers 1997). Estudios de los patrones de sustitución en estos genes producto de la hipermutación somática han mostrado que a pesar de que las mutaciones se distribuyen en toda la región V, estas no son completamente al azar. Dentro del exón V es posible observar ciertos "hotspots" de mutación que indica la preferencia de

motivos cortos característicos de 4 ó 5 nucleótidos así como ciertas estructuras secundarias características (Jolly y col. 1996; Milstein y col. 1998; Papavasiliou y Schatz 2000; Pavlov y col. 2002; Boursier y col. 2004; Rogozin y Diaz 2004). Dentro de las regiones más frecuentemente hipermutadas se encuentran los CDRs (Jolly y col. 1996; Milstein y col. 1998). Adicionalmente a la recombinación y la hipermutación se encuentra la conversión génica somática (Weill y Reynaud 1996), cuyo mecanismo se describe más adelante.

#### *2.3.1.2. Diversificación Germinal*

A pesar de todas estas evidencias que postulan la importancia de la diversidad somática para el repertorio de Acs, se ha propuesto que la fuente de diversidad en el repertorio ontogénico de Acs es creada a partir de los genes de la línea germinal, al generar repertorios de Acs de una mayor o menor afinidad y especificidad por cierto Ag. Desde esta perspectiva los genes de línea germinal de las Igs proveerán a través de procesos evolutivos que introducen cambios en su secuencia, la capacidad de reconocer al universo antigénico (propio y ajeno) volviendo apto o adaptable al sistema inmune. Dentro de estos procesos evolutivos se encuentran la duplicación génica, la conversión génica germinal y el polimorfismo alélico. Tales procesos se describen a continuación.

##### 2.3.1.2.1. Duplicación génica

Como se ha ilustrado en previos análisis filogenéticos muchas duplicaciones han ocurrido en los genes V durante la evolución (Ota y Nei 1994, 1995; Matsuda y Honjo 1996; Matsuda y col. 1998; Sitnikova y Nei 1998). La primera duplicación de estos segmentos génicos generó los linajes de las familias VH y VL aproximadamente hace 350 y 470 millones de años. La duplicación de los genes V ha proveído las oportunidades para la

creación de nuevas variantes que, junto con la mutación y la selección, las fijan o eliminan dependiendo de la naturaleza de los productos (Tanaka y Nei 1989; Sitnikova y Nei 1998). La continua duplicación genera que en muchas instancias los segmentos de genes V sean funcionalmente redundantes. Sin embargo, el que las mutaciones sobre los genes duplicados son en su mayoría deletereas hace que finalmente este proceso cree una gran abundancia de pseudogenes entre los loci de genes V.

Considerando la continua generación de genes por duplicación y la remoción de estos del genoma, la evolución de los segmentos génicos V puede pensarse como un proceso dinámico en el cual el repertorio está constantemente sujeto a cambios (Rothenfluh y col. 1995; Ota y col. 2000). Este tipo de proceso evolutivo ha resultado en la expansión y contracción de las familias génicas y eventualmente en su homogenización o evolución concertada (Ota y col. 2000) al mismo tiempo que se promueve el desarrollo de singularidades de algunos de sus miembros (Vargas-Madrado 1997; Vargas-Madrado y Paz-García 2001).

#### 2.3.1.2.2. Conversión génica germinal

Adicionalmente a la duplicación, en la diversificación del repertorio germinal encontramos la conversión génica germinal. El mecanismo de conversión génica fue primero observado en la diversificación del repertorio de genes V a nivel somático en gallina (Reynaud y col. 1987; Thompson y Neiman 1987) y conejo (Becker y Knight 1990). La conversión génica ocurre en cis, es direccional y es dependiente de la homología de los segmentos. La conversión génica incluye los eventos sin plantilla, principalmente a través de mutaciones puntuales que ocurren frecuentemente en el borde del segmento convertido. Es un proceso

medianamente exacto que implica el uso de fragmentos de longitud variable de más de 10 y menos de 100 pares de bases (pb) (Reynaud y col. 1987; McCormack y Thompson 1990).

A través de este mecanismo se pudo explicar por qué los pseudogenes se conservaban en el genoma, al estar comprometidos con la funcionalidad del repertorio sirviendo como donadores de secuencia durante la conversión génica. Esto, ya que muchos de los pseudogenes conservados pueden ser aceptores o donadores de conversión de genes de línea germinal, fenómeno que se ha planteado contribuye no sólo a la diversificación somática sino a la diversidad de tipo germinal (Haino y col. 1994; Kodaira y col. 1986). Puesto que los pseudogenes son los que tienen más altas proporciones de mutación, el que existan este tipo de mecanismos ha promovido que las mutaciones “prohibidas” por selección para los genes funcionales sean introducidas en el genoma suministrándole nuevas características a los genes de línea germinal (Li 1997). Sin embargo, la conversión génica germinal no sólo ha permitido la diversificación del material genómico, sino también, se ha visto que promueve la homogenización o evolución concertada del genoma (Perlmutter y col. 1985) y/o la corrección de las mutaciones errantes introducidas por los pseudogenes (Rothenfluh y col. 1995).

#### 2.3.1.2.3. Polimorfismo Alélico

Finalmente, además de la duplicación y la conversión génica germinal dentro de los procesos que diversifican los genes de línea germinal encontramos el polimorfismo alélico. En las regiones V de las inmunoglobulinas (Ig) humanas, se han observado dos tipos de polimorfismo afectando el repertorio de línea germinal; uno es el polimorfismo de sustitución de nucleótidos y el otro es el polimorfismo de inserción/eliminación de segmentos génicos (Cook y Tomlinson 1995). A este respecto diversos estudios han

reportado que existen marcadas diferencias en el polimorfismo de inserción/eliminación entre las distintas regiones del locus IghV. Estas diferencias parecieran estar relacionadas con la función que el segmento génico juega para el repertorio (Li y col. 2002). Así para el caso del locus IghV, en las regiones I y II se ha observado polimorfismo que implica la inserción o eliminación de varios genes (Cui y Li 1998; Pramanik y Li 2002), en contraste con la región III para la cual no han sido encontradas este tipo de variaciones (Cui y Li 1997, 2000) (ver Figura 7). No obstante, se ha observado en estudios de correlación entre polimorfismo de inserción/eliminación y patologías que este tipo de variaciones tiene poca influencia sobre la propensión hacia ciertas patologías (Pargent y col 1991; Schaible y col. 1993).

Procesos similares tienen lugar en el polimorfismo de sustitución, donde se observa que los loci ubicados en las regiones más distantes a  $J_H$  presentan alto grado de polimorfismo de sustitución (genes 1-12L, 1-6/1-69, 1-3/1-68, 1-12R y 4-11/DP-66) (Cui y Li 1997, 2000). En contraste los genes localizados en las porciones próximas a  $J_H$  son altamente conservados (Cook y col. 1994). Por lo que las diferencias en el polimorfismo de sustitución no sólo ocurren en dependencia de la localización física del segmento génico en el locus IghV. A este respecto en diversos estudios se ha observado que dentro de las regiones codificadoras de cada locus, existen también fragmentos en los que se favorece o restringe la diversificación (Cook y Tomlinson 1995; Milner y col. 1995).

A pesar de todos estos hallazgos, no existe dentro del polimorfismo de sustitución una caracterización detallada de sus implicaciones para el mecanismo de reconocimiento molecular inmune. Esto debido a que la mayoría de los estudios que evalúan el polimorfismo de sustitución, se centran en el cálculo de las frecuencias alélicas en una población. Dado lo anterior es que resulta de interés profundizar en la comprensión de las

estrategias de evolución molecular en el repertorio de Acs por polimorfismo de sustitución y es por ello que en este trabajo nos proponemos estudiar algunos aspectos de la evolución molecular de los genes V, así como de los mecanismos de diversificación que operan durante la evolución y las consecuencias de estas alteraciones sobre las propiedades estructurales del sitio de unión al antígeno.

#### ***2.4 Evolución molecular***

Dentro de las regiones codificadoras la sustitución de aminoácidos permite crear alelos que implican variantes estructurales respecto al alelo principal. Este proceso permite explorar el espacio de sitios de unión al antígeno hacia una mejor adaptación respecto al universo antigénico existente en un periodo evolutivo (Ota y col. 2000). Con todo, no existe una caracterización detallada de las implicaciones para el mecanismo de reconocimiento molecular inmune que genera el polimorfismo de sustitución. La mayoría de los estudios que evalúan el polimorfismo de sustitución como se mencionó anteriormente, se han centrado en el cálculo de las frecuencias alélicas en una población (Sasso y col. 1990; van Dijk y col. 1991; Sasso y col. 1993; Cui y Li 1998). Sin embargo, esta no es la única forma de caracterizar el complejo proceso que implica la evolución por polimorfismo. El polimorfismo de un locus puede ser caracterizado no sólo por el número y frecuencia de alelos, sino también por el número de mutaciones por alelo (Li 1997), así como por la distribución y tipo de sustituciones a lo largo del gen (Eigen y col. 1988). Es decir, una caracterización integral y detallada de los patrones de sustitución en alelos de genes V de Igs, que considere sus particularidades funcionales es también de utilidad para la comprensión de las estrategias evolutivas de diversificación.

Puesto que las herramientas que evalúan la evolución molecular son muy diversas a continuación exploraremos las más importantes y de relevancia para nuestros propósitos.

#### *2.4.1. Cambios evolutivos en las secuencias de nucleótidos*

Un proceso básico en la evolución de las secuencias de ADN es el cambio de nucleótidos con el tiempo. De forma general, el análisis de este proceso evolutivo ha sido a través de la comparación de dos o más secuencias codón por codón y clasificando cada diferencia de acuerdo al tipo de sitio donde ocurrió el cambio. En el caso que se de una sola sustitución en los codones analizados, la diferencia es rápidamente inferida; sin embargo, puede darse el caso que difieran en más de un nucleótido. En este caso, se necesita considerar todas las mínimas posibilidades evolutivas.

La comparación de dos o más secuencias homologas implica la identificación y la localización de las eliminaciones, inserciones y sustituciones que pudieron haber ocurrido. A este proceso se le denomina alineamiento de secuencias y consiste en una serie de apareamientos de nucleótidos con base en tres criterios: i) emparejamiento de bases concordantes, ii) emparejamiento de bases no concordantes y iii) emparejamiento de una base con la secuencia y un hueco “gap” en la otra.

Este proceso evolutivo de cambios de nucleótidos en el tiempo ha sido ampliamente estudiado ya que se ha planteado es esencial: i) para el entendimiento del mecanismo evolutivo del ADN y ii) porque los cambios de nucleótido en las secuencias son usados tanto para la estimación de las velocidades evolutivas como para la reconstrucción de la historia evolutiva de los organismos (Li 1997). Por estas razones diversos modelos han sido propuestos para estudiar este proceso (Jukes y Cantor 1969; Kimura 1980, 1981; Holmquist y Pearl 1980; Kaplan y Risko 1982; Lanave y col. 1984). Dentro de los modelos más

simples podemos encontrar: i) el modelo de un parámetro de Jukes y Cantor (1969), que asume que la sustitución ocurre al azar entre los cuatro tipos de nucleótido y ii) el modelo de dos parámetros de Kimura (1980), el cual considera que las transiciones son más frecuentes que las transversiones. Más recientemente se ha postulado un tercer modelo denominado de matrices, en el que se postula que los cuatro tipos de cambios de nucleótido no ocurren en la misma proporción (Li 1997). Cabe destacar que aunque estos tres modelos son los más importantes, en la actualidad existen numerosas variaciones (alrededor de 56 modelos) las cuales han sido agrupadas en el programa Modeltest. Este programa es de gran utilidad ya que selecciona el modelo de sustitución nucleotídica que más se ajusta a los datos (<http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>).

A pesar de que este tipo de modelos han sido de gran utilidad en el análisis de las secuencias, el que la sustitución de un nucleótido por otro tome miles o millones de años, y por tanto la variación no pueda ser observada dentro de la vida de un organismo, dichos modelos no tienen sentido sino es a la luz de la evolución en un rango de tiempo y en un espacio dado. Esto ha implicado la creación y utilización de diversos modelos y algoritmos que analizan parámetros y características del material genético mucho más complejas que la simple estimación de las proporciones de cambio en cada uno de los nucleótidos. Dichas herramientas las exploraremos a continuación.

#### ***2.4.2. Velocidad y patrones de sustitución***

Para detectar sustituciones de nucleótidos en secuencias de ADN, se utiliza la comparaciones entre las secuencias con una ancestral (Li 1997). El número de sustituciones entre dos o más secuencias permite estimar las proporción de evolución, la divergencia y reconstruir árboles filogenéticos.

El número de sustituciones nucleotídicas entre dos secuencias ( $K$ ) se expresa en términos del número total de sustituciones dividido entre el número de nucleótidos comparados entre las dos secuencias ( $K = N/L$ ) y la velocidad de sustitución es el número de sustituciones por sitio por año ( $r = K/(2T)$ ).

Para la estimación de la velocidad de sustitución existen diversos modelos y su utilización irá de acuerdo a la longitud de la secuencia, el valor de  $K$ , y la divergencia entre las secuencias analizadas. Así por ejemplo, si  $K$  es menor a 0.5 el método a utilizar por la simplicidad será el Jukes-Cantor (1969) y Kimura-Ota (1972); mientras que para las secuencias largas el método de Gojobori y col. (1982) de las matrices es el más indicado y para secuencias con alta divergencia el método a utilizar es el de Tajima y Nei (1984).

Dado que la velocidad de sustitución varía entre secuencias codificadoras y no codificadoras, los métodos para analizar uno y otro tipo de región consideran estas variaciones en la construcción de sus modelos y algoritmos. Puesto que dentro de nuestro estudio sólo consideramos las regiones codificadoras, centraremos nuestra atención en este tipo de metodologías.

Lo primero que salta a la luz en los análisis de las secuencias codificadoras es que en la mayoría de estos métodos son tratadas por separado las sustituciones reemplazantes y silentes; además de que las secuencias de iniciación y terminación son excluidas de los análisis ya que rara vez cambian con el tiempo. Dentro de estas metodologías el análisis de la proporción de sustituciones reemplazantes/silentes o índice de reemplazamiento (IR) bajo el modelo de cambio genético por mutación puntual aleatoria, proporciona una poderosa herramienta para determinar el tipo de presión selectiva que está operando sobre posiciones o sub-regiones específicas de genes (Jukes y King 1979, Shlomchik y col. 1987). Característica que resulta muy adecuada para los objetivos del presente estudio.

### *2.4.3. Polimorfismo en poblaciones*

El grado y los mecanismos que mantienen la variabilidad genética en las poblaciones son los propósitos de los genetistas y evolucionistas. A este nivel, destaca que a pesar de la gran variedad de modelos que existen para evaluar las variaciones nucleotídicas en el tiempo, en la mayoría de los estudios que evalúan el polimorfismo alélico por sustitución, se centran en el cálculo de las frecuencias alélicas en una población. Sin embargo, esta no es la única forma de caracterizarlo. El polimorfismo de un locus puede ser caracterizado no sólo por el número y frecuencia de alelos, sino también por el número de mutaciones por alelo (Li 1997), así como por la distribución y tipo de sustituciones a lo largo de la proteína (Eigen y col. 1988).

A través de los parámetros ya citados es posible calcular tanto el grado de selección natural (negativa o positiva) como si existe mutación neutra (prueba de Hudson-Kreitman-Aguadé o McDonald-Kreitman), propiedades que resultan de interés para el presente estudio.

Resumiendo, se ha planteado que el fenómeno de reconocimiento del universo antigénico propio y extraño por parte de los Acs es el producto de eventos ocurridos a nivel genético (Rothenfluh y col. 1995). Por tanto desde esta perspectiva, el compromiso funcional de reconocimiento estaría promoviendo la diversificación de los genes de Ig para generar un repertorio de Acs capaz de contender con el gran universo antigénico propio y extraño. Sin embargo, se ha visto que la diversidad del repertorio de Acs tanto funcional como estructural no es tan grande como se esperaba. Más aún el hecho de que en distintos niveles estructurales (dominios, sub-regiones, posiciones, etc.) y funcionales (uso de genes, distribución heterogénea de la variabilidad entre familias, etc.) se observe una diversidad

restringida y estrechamente correlacionada con la evolución y diversificación de los genes, sugiere la existencia de estrategias en la evolución de los repertorios de receptores específicos del sistema inmune.

Puesto que todas las estrategias que están operando en el reconocimiento y su expresión en los patrones observados a distintos niveles en la estructura del Ac son el producto de los eventos evolutivos ocurridos a nivel genético (Rothenfluh y col. 1995), el estudio de los mecanismos que generan la diversidad ya sea a nivel evolutivo (variación en los genes de línea germinal, evolución de mecanismos de rearrreglo, etc.), o a nivel somático (rearrreglo, edición, hipermutación, etc.) en el repertorio nos permitirá interpretar más claramente los resultados obtenidos en los estudios estructurales y funcionales. No obstante, el que los mecanismos por diversificación somática ya se hayan descrito con gran detalle y que se postule que es la diversificación germinal la que a través de la evolución de sus genes ha moldeado la diversidad apropiada de sitios de unión al antígeno (la diversificación somática se centra en mejorar el ajuste fino de la unión con sus ligandos), postulan la necesidad de estudiar a profundidad el origen de la diversidad germinal de los genes IgV así como sus implicaciones funcionales para el reconocimiento. Esto sobre todo a la luz de que son pocos los estudios que abordan esta problemática y de que en su mayoría se centran en el cálculo de frecuencias alélicas y no exploran el contenido de información genética y estructural de cada secuencia.

### **3. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Con el objetivo de entender con más detalle las estrategias que utiliza el sistema inmune para crear repertorios diversos de Acs con afinidad y especificidad adecuadas, se analizaron

restringida y estrechamente correlacionada con la evolución y diversificación de los genes, sugiere la existencia de estrategias en la evolución de los repertorios de receptores específicos del sistema inmune.

Puesto que todas las estrategias que están operando en el reconocimiento y su expresión en los patrones observados a distintos niveles en la estructura del Ac son el producto de los eventos evolutivos ocurridos a nivel genético (Rothenfluh y col. 1995), el estudio de los mecanismos que generan la diversidad ya sea a nivel evolutivo (variación en los genes de línea germinal, evolución de mecanismos de rearrreglo, etc.), o a nivel somático (rearrreglo, edición, hipermutación, etc.) en el repertorio nos permitirá interpretar más claramente los resultados obtenidos en los estudios estructurales y funcionales. No obstante, el que los mecanismos por diversificación somática ya se hayan descrito con gran detalle y que se postule que es la diversificación germinal la que a través de la evolución de sus genes ha moldeado la diversidad apropiada de sitios de unión al antígeno (la diversificación somática se centra en mejorar el ajuste fino de la unión con sus ligandos), postulan la necesidad de estudiar a profundidad el origen de la diversidad germinal de los genes IgV así como sus implicaciones funcionales para el reconocimiento. Esto sobre todo a la luz de que son pocos los estudios que abordan esta problemática y de que en su mayoría se centran en el cálculo de frecuencias alélicas y no exploran el contenido de información genética y estructural de cada secuencia.

### **3. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Con el objetivo de entender con más detalle las estrategias que utiliza el sistema inmune para crear repertorios diversos de Acs con afinidad y especificidad adecuadas, se analizaron

las mutaciones en los alelos de los genes funcionales IgV según los alineamientos de alelos reportados en la base de datos IMGT <http://imgt.cines.fr> (Lefranc 2003; Lefranc 2004; Lefranc and Lefranc 2001). A partir de esta base de datos se analizaron los siguientes aspectos: i) distribución de alelos mutados por locus, ii) número de sustituciones por alelo, iii) distribución y tipo de sustitución de aminoácido en el exón variable, y iv) análisis de la proporción de sustituciones reemplazantes/silentes (R/S) para el exón variable completo y por sub-regiones (FRs y CDRs). El análisis de proporción de sustituciones R/S bajo el modelo de cambio genético por mutación puntual aleatoria proporciona una poderosa herramienta para determinar el tipo de presión selectiva que opera sobre posiciones o sub-regiones específicas de los genes (Jukes y King 1979, Shlomchik y col. 1987). Esta característica resulta muy adecuada para los objetivos del presente estudio.

Simultáneamente al análisis evolutivo de patrones de sustitución en los alelos de los loci IgV, se realizó un estudio de las sustituciones en alelos de una población mexicana. Este análisis resulta de interés debido a que son muy pocos los estudios poblacionales sistemáticos para caracterizar el polimorfismo de los genes de Igs (la mayoría de los alelos de la base de datos provienen de estudios en lo que su objetivo no era caracterizar el polimorfismo), más aún los estudios que reportan alelos provienen de poblaciones caucásicas. Es por lo tanto importante profundizar en la determinación del polimorfismo, al menos de ciertos genes importantes (Vargas-Madrado y Paz-García 2001), lo cual esperamos nos permita avanzar en la comprensión de las estrategias evolutivas y de desarrollo de los repertorios de Acs.

Finalmente, dado que el estudio de los mecanismos de diversificación tienen como objetivo profundizar en el entendimiento del fenómeno de reconocimiento molecular inmune, y que dicho fenómeno funda sus bases epistemológicas en el concepto de

especificidad, a lo largo de este proceso de investigación hemos estudiado de forma paralela la especificidad. Esta necesidad surge debido a que la especificidad a nivel molecular es un concepto sumamente confuso. Por una parte genera un ánimo de seguridad a las personas que lo usan ya que parece estar sólidamente fundamentado en evidencia estructural bioquímica, la cual postula un modelo llave-cerradura rígido. Por otro lado es un concepto vago, sin definición, que se explica a través de metáforas. Tal investigación se realizó mediante una revisión bibliográfica del concepto, sus definiciones, explicaciones y usos.

## **4. METODOLOGÍA**

### ***4.1. Análisis evolutivo molecular en alelos de genes V de inmunoglobulina***

#### ***4.1.1. Construcción de la base de datos***

Partiendo de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>), se compilaron todos los alelos de los genes IgV de humano y ratón, y se compararon de forma detallada con los genes de línea germinal. Alineamos cada uno de los alelos con el alelo representante de cada gen IgV y siguiendo el criterio de máxima homología asignamos las secuencias. El análisis detallado las secuencias permitió reasignar algunos de los alelos que presentaban errores en la base de datos original.

Con el propósito de tener elementos cualitativos en este estudio, cada uno de los artículos originales que reportaron alelos a estudiar fue revisado. Esto nos permitió obtener información relevante para cada secuencia. A partir de la información contenida en cada uno de los artículos originales se evaluó la calidad de la base de datos. Esto a través de la valoración y la sistematización de: i) propósito de la investigación, ii) condiciones

especificidad, a lo largo de este proceso de investigación hemos estudiado de forma paralela la especificidad. Esta necesidad surge debido a que la especificidad a nivel molecular es un concepto sumamente confuso. Por una parte genera un ánimo de seguridad a las personas que lo usan ya que parece estar sólidamente fundamentado en evidencia estructural bioquímica, la cual postula un modelo llave-cerradura rígido. Por otro lado es un concepto vago, sin definición, que se explica a través de metáforas. Tal investigación se realizó mediante una revisión bibliográfica del concepto, sus definiciones, explicaciones y usos.

## **4. METODOLOGÍA**

### ***4.1. Análisis evolutivo molecular en alelos de genes V de inmunoglobulina***

#### ***4.1.1. Construcción de la base de datos***

Partiendo de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>), se compilaron todos los alelos de los genes IgV de humano y ratón, y se compararon de forma detallada con los genes de línea germinal. Alineamos cada uno de los alelos con el alelo representante de cada gen IgV y siguiendo el criterio de máxima homología asignamos las secuencias. El análisis detallado las secuencias permitió reasignar algunos de los alelos que presentaban errores en la base de datos original.

Con el propósito de tener elementos cualitativos en este estudio, cada uno de los artículos originales que reportaron alelos a estudiar fue revisado. Esto nos permitió obtener información relevante para cada secuencia. A partir de la información contenida en cada uno de los artículos originales se evaluó la calidad de la base de datos. Esto a través de la valoración y la sistematización de: i) propósito de la investigación, ii) condiciones

experimentales, iii) origen del ADN (raza y/o procedencia de los individuos muestreados, tipo de células y/o tejido, etc.)

#### ***4.1.2. Clasificación del tipo de reemplazo***

Para cada una de las mutaciones reportadas en los alelos se analizó el tipo de sustitución de aminoácido (alteración de las propiedades físico-químicas) que se presenta en cada residuo. Esto de acuerdo con el sistema de agrupación y análisis de residuos de Grantham (1978) y Go y Miyazawa (1980). En estos sistemas, la alteración de las propiedades físico-químicas y por tanto de la funcionalidad del sitio activo se encuentra principalmente determinada por la composición, polaridad, volumen molecular, exterioridad e interioridad de las cadenas laterales. Considerando todas estas características clasificamos las sustituciones de aminoácido en tres grupos: i) Conservativa, cuando la sustitución no tiene repercusiones en la estructura de la proteína, ii) No-conservativa, cuando la sustitución alteró algunas de las propiedades físicoquímicas de la proteína, y iii) Radical, cuando la sustitución altera drásticamente no sólo las propiedades físicoquímicas sino también de plegamiento de la proteína.

#### ***4.1.3. Cálculo de la proporción R/S***

La identidad secuencial entre diversos segmentos génicos puede provenir de la presión evolutiva que mantiene la secuencia solamente a nivel de nucleótido o de preservar la secuencia a nivel de proteína. Dentro de los análisis que permiten evaluar las fuerzas que actúan en la evolución de las secuencias se encuentran aquellos en donde se estudian cambios de aminoácido producto de las mutaciones ocurridas en un codón. En vista de la redundancia exhibida en el código genético, los cambios de bases en un codón pueden

generar tanto el reemplazo de un aminoácido (R), como su conservación (mutación silente (S)). Siguiendo este criterio, es posible caracterizar las fuerzas evolutivas que moldean la diversificación en las diferentes sub-regiones de un gen a través del cálculo de las proporciones de sustituciones reemplazantes y silentes (R/S) o índice de reemplazamiento (IR). Dicho índice se calcula dividiendo las sustituciones reemplazantes entre el total de sustituciones silentes (R/S) (Jukes y King 1979; Shlomchik y col. 1987). Las sustituciones se contabilizan como cambios de nucleótido encontrados en un alelo respecto al alelo predominante para un locus. Los codones que experimentan mutación al azar presentan índices de 2.9. Valores por debajo de 2.9 indican conservación y valores por encima diversificación (Jukes y King 1979; Shlomchik y col. 1987).

## ***4.2. Análisis Poblacional de los patrones de sustitución en genes $V_H$ de inmunoglobulina***

### ***4.2.1. Selección de los genes a estudiar***

Usando los mapas bidimensionales reportados en trabajos anteriores (Vargas-Madrado y Paz-García 2001) que permiten agrupar e identificar genes V que codifican para Acs con propiedades de reconocimiento distintivas y de los análisis de uso de genes, se seleccionaron los siguientes genes:

i) el gen V3-23 ( $V_H26$ ), el cual se expresa con gran frecuencia en linfocitos B fetales y adultos y en auto-anticuerpos (Cook y Tomlinson 1995; Sasso y col. 1995; Schroeder y col. 1995)

ii) el gen V6-1, único miembro de la familia  $V_H6$  y que se presenta preferencialmente en linfocitos fetales y auto-anticuerpos (Berman y col. 1991; Van Dijk-Hard y col. 1997; Raaphorst y col. 1997). Además de que es el único gen que codifica para

la clase de estructura canónica 3-5, clase con características estructurales únicas (Pascual y Capra 1991; Vargas-Madrado y col. 1995; Vargas-Madrado y Paz 2001).

iii) los genes 4-59 y 4-61, los cuales presentan 100% de identidad en aquellas posiciones relevantes en la interacción con el Ag, pero codifican para diferentes CSC (1-1 y 3-1 respectivamente) (Vargas-Madrado y Paz 2001).

#### ***4.2.2. Diseño de los Cebadores ó “Primers”***

Se diseñaron “primers” familia-específico para los genes  $V_H$  a estudiar siguiendo la metodología de Tomlinson y col. (1992). En esta metodología las regiones amplificadoras se localizan en el heptámero y parte de la región espaciadora de la recombinación 3' terminal, así como el exón líder o 5' terminal. Puesto que parte del heptámero se pierde durante la recombinación, esta estrategia permite asegurar la amplificación sólo de genes de línea germinal.

Adicionalmente, se diseñaron “primers” internos en el caso de las familias  $V_{H3}$  y  $V_{H4}$ . Estos se localizaron en las regiones que presentan mayor variabilidad dentro de las familias (CDR1 y CDR2) ya que son blancos fáciles para la selección de los genes de estudio (V3-23, V4-59 y V4-61).

#### ***4.2.3. Preparación del ADN genómico***

El ADN genómico fue aislado de las células blancas de sangre periférica obtenida de 20 individuos sanos (10 indígenas y 10 mestizos mexicanos). Para ello se utilizó el método de Blin y Stafford (1976) a partir de 5 ml de sangre completa colectada en un tubo con 0.057 de EDTA al 15%. La sangre se transfirió a un tubo de propileno de 20 ml conteniendo previamente 10 ml de buffer de fosfatos (PBS): fosfatos 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2. La

pastilla nuclear fue aislada por centrifugación a 800 g por 7 min a 4°C y luego resuspendida en 10 ml de buffer de extracción (acetato de sodio 300 mM, EDTA 50 mM pH 7.5, RNasa A a una concentración final de 25 µg/ml) y 50 µl de proteinasa K. Las muestras se incubaron a 50°C por 5 hrs. La pastilla fue extraída dos veces con fenol/cloroformo, una vez con cloroformo y precipitada mediante el uso de etanol frío. El ADN fue resuspendido en 500 µl de agua y cuantificado por espectroscopia UV a 260 nm.

#### ***4.2.4. Amplificación por RCP ó “PCR” y secuenciación***

El ADN genómico fue amplificado usando los primers previamente diseñados y siguiendo el protocolo de Tomlinson y col. (1992). Las mezclas de reacción se llevaron a 50 µl conteniendo: 25 pmol of cada primer, 5 to 10 µg de ADN genómico, 2.5 unidades de Taq polimerasa, 20 µM de cada dNTPs, el buffer recomendado (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.8) y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. La reacción se desarrolló con 30 ciclos de amplificación, en el que cada ciclo consistió en: 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineamiento a 55°C y 2 min de extensión a 72°C. Al final de los 30 ciclos se realizó una extensión final a 72°C por 5 min.

El producto de la amplificación se analizó corriendo 5 µl de la muestra en un gel de agarosa al 2%. El fragmento aislado e identificado se cortó y el ADN fue extraído con fenol/cloroformo, precipitado con etanol y digerido con enzimas de restricción (EcoRI y XbaI). El producto fue ligado a un plasmido (Puc-19) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La mezcla de ligación fue utilizada para la transformación de células de E. coli XL1-blue por electroporación (Dower y col. 1988). El ADN seleccionado

y extraído de las placas de bacterias transformadas fue purificado y secuenciado por el método de Sanger y col. (1977).

Para evitar problemas de contaminación y falsos positivos se tomaron diversas precauciones: controles negativos (sin ADN genómico), amplificaciones independientes con los mismos “primers”, en todos los casos se impuso el requerimiento de que cada gen  $V_H$  de línea germinal se encontrará al menos en 2 amplificaciones independientes.

#### ***4.3. Análisis funcional-estructural de las sustituciones y sus implicaciones para el mecanismo de reconocimiento molecular inmune***

Caracterizados e identificados los alelos encontrados se procedió a realizar los estudios a nivel estructural. Para ello se consideró una jerarquía diferenciada para cada posición de acuerdo a los atributos moleculares fundamentales para el mecanismo de reconocimiento de Ags por Acs (posiciones en contacto, posiciones que determinan las estructuras canónicas, posiciones involucradas en la interacción  $VH:VL$ , etc). Este esquema ha sido desarrollado por nuestro grupo de investigación (Vargas- Madrazo y col. 1995, 1997; Vargas-Madrado y Paz-García 2001). El estudio estructural permitió determinar las implicaciones a nivel del reconocimiento inmune de los cambios generados en el alelo. El análisis se hizo a través de la modelación molecular de cada uno de los cambios observados en la secuencia de aminoácidos a la luz del modelo de reconocimiento molecular Ag-Ac. Puesto que existen en la actualidad gran cantidad de estructuras cristalográficas, seleccionamos mediante criterios de homología de secuencias una estructura para la modelación. Todo esto se hizo con la ayuda de una estación de trabajo Silicon Graphics y del Software Insight.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. *Artículos de Investigación*

Las Igs junto con el TCR y el MHC constituyen sub-familias de proteínas con altas velocidades evolutivas, propiedad que se ha asociado con las funciones de enorme diversidad de reconocimiento y defensa en las que participan. A pesar de que esta visión de la evolución rápida en las Igs es ampliamente aceptada, diversos estudios han mostrado que en la evolución de estos receptores convergen diversas y contradictorias fuerzas que aún no son plenamente entendidas.

En las Igs la capacidad de reconocimiento es principalmente el producto de variaciones que modifican las características de su sitio de unión al antígeno y de las regiones que tienen influencia sobre éste; es decir, por variación en la forma general de dicho sitio y de la composición de aminoácidos en las asas hipervariables que lo conforman (Wilson y Stanfield 1993). Desde esta perspectiva, si las Igs tuvieran la alta proporción de mutaciones respecto al tiempo que se postula, el número de posibles sitios de unión al antígeno sería casi ilimitado. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que las Igs no presentan una hipervariabilidad tan elevada y aleatoria como se había postulado (Cocho y col. 1993; Vargas-Madrado y col. 1994; Lara-Ochoa y col. 1996), lo anterior debido a que operan restricciones tanto a nivel funcional como estructural. Por lo anterior es de interés explorar las fuerzas que actúan en los procesos de diversificación de las Igs.

Como se mostró previamente, dentro de estos procesos evolutivos que introducen cambios en la secuencia para volver más apto o adaptable al sistema inmune se encuentran la duplicación génica, el polimorfismo alélico y la conversión génica germinal (Pascual y Capra 1991; Sitnikova y Su 1998). A nivel de polimorfismo alélico, aunque mucho se habla

de cuan polimórficos son los genes de Ig, muy pocos son los estudios en los que se evalúa en detalle el contenido de información genética y estructural de las secuencias. En la mayoría de los estudios de evolución de genes de Igs la distancia entre secuencias es considerada como una medida de separación temporal, suponiéndose tácitamente que las probabilidades de sustitución son uniformes e invariantes en todas las posiciones (Eigen y col. 1988). Los estudios bajo este tipo de premisas han sido generalmente aplicados a genes de proteínas invariantes o poco variables, situación en la cual parece más plausible asumir dichas homogeneidades. Sin embargo, es bien sabido que la diversificación en las regiones variables de las Igs no se distribuye de forma homogénea en todas las posiciones (Wu y Kabat 1970; Vargas-Madrado y col. 1994). Desde este punto de vista, la variabilidad puede ir desde la total conservación en algunas posiciones hasta la hipervariabilidad en otras (Eigen y col. 1988). Más aún, visiones más cercanas a la complejidad biológica de las macromoléculas nos dice que no todas las sustituciones de aminoácido en una proteína dada tienen el mismo impacto para la evolución (Zuckerandl 1976).

Por lo anterior y dada la importancia tanto para la inmunología como para la evolución molecular de un mejor entendimiento de los procesos básicos de evolución en receptores específicos (tales como las Igs), resulta importante estudiar en detalle la naturaleza de los procesos de diversificación en proteínas con alta proporción de mutaciones (por ej. Igs). Esto sobre todo siguiendo un modelo en donde se considere tanto el contenido de información genética, como estructural de las secuencias (análisis verticales y horizontales), los cuales en estudios previos han mostrado que pueden contribuir a profundizar la comprensión de la naturaleza de los procesos evolutivos.

Es por ello que en esta investigación analizamos la evolución de la información genética y estructural por diversificación alélica en genes IgV. Como se mencionó

anteriormente, el sitio de unión al antígeno se compone de 6 asas hipervariables, 3 de VH y 3 de VL. Por lo que un estudio completo de los patrones de sustitución por polimorfismo en genes IgV deberá comprender el análisis de los loci IghV, IgkV e IglλV, así como de los loci D y J, pero aquí sólo se analizarán los loci correspondientes a la región V que comprende la región codificadora más grande de los dominios V.

En vista de las diversas evidencias estructurales (Vargas-Madrado y col. 1995; Kabat y Wu 1991; Wilson y Stanfield 1993) y funcionales (Zouali 1995; Ward y col. 1989) que postulan que el dominio VH juega un papel más preponderante en el mecanismo de reconocimiento y en particular en la estrategia de diversificación, decidimos tener un primer acercamiento al proceso de diversificación germinal por polimorfismo alélico en el locus IghV de humano. Dicho estudio dio lugar al primer artículo titulado: “Structural Analysis of Substitution Patterns in Alleles of Human Immunoglobulin VH Genes” (documento en lo subsiguiente identificado como artículo A1).

Con esta información decidimos explorar y contrastar lo observado en el locus IghV de humano con los dos loci que codifican para el dominio VL. Más aún, dadas las similitudes entre humano y ratón en los mecanismos de diversificación de Igs (Weill y Reynaud 1996) y en las características del repertorio estructural (Almagro y col. 1997, 1998) y al ser además las dos especies más estudiadas en inmunología, es también de interés comparar los resultados para estos tres loci de Igs en estas dos especies. El análisis de los patrones de sustitución en los dos loci de VL tanto en humano como en ratón y su comparación con lo previamente observado en el artículo A1 dio lugar al segundo artículo titulado: “Substitution Patterns in Alleles of Immunoglobulin V Genes in Humans and Mice” (artículo A2).

Adicionalmente, en vista de las evidencias que muestran un uso sesgado en los genes de Ig y que postulan que sólo una pequeña fracción del repertorio juega un papel central para determinar las propiedades fundamentales de los repertorios de Acs del sistema inmune (Zinkernagel y Doherty 1977; Viale y col. 1992; Rothenfluh y col. 1995; Nobrega y col. 1998; Lacroix-Desmazes y col. 1998; Coutinho 2000; Zinkernagel y Hengartner 2001; Zinkernagel 2002; Mackworth-Young y col. 2003); y de que en la actualidad son pocos los estudios que evalúan los procesos de diversificación germinal por polimorfismo alélico, decidimos analizar los patrones de sustitución en los alelos de ciertos genes de interés (Vargas-Madrado y Paz-García 2001) en una muestra de individuos mexicanos. Estos resultados se reportan en el tercer artículo titulado: “Novel Substitution Polymorphisms of Human Immunoglobulin VH Genes in Mexicans” (artículo A3).

Por último, todas estas propiedades, dinámicas y mecanismos evolutivos que le han dado forma al repertorio de Acs a través de asignarle características estructurales particulares a cada una de sus partes no tienen sentido sino a la luz del fenómeno de especificidad inmunológica. En vista de lo anterior, realizamos de forma adicional y paralela al estudio de la diversificación germinal por polimorfismo alélico una investigación histórica, epistemológica y contextual de dicho fenómeno. Los resultados de este último se encuentran descritos en el cuarto artículo titulado: “The Immunological Specificity: History, Settings, Metaphors and Phantoms” (artículo A4).



## Structural analysis of substitution patterns in alleles of human immunoglobulin VH genes

Tania Romo-González, Enrique Vargas-Madrado\*

*Departamento Biología Sistémica, Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Morelos 9 La Pitaya, Zoncuantla, 91500 Coatepec, Xalapa, Veracruz, Mexico*

Received 16 August 2004

### Abstract

The diversity in repertoires of antibodies (Abs) needed in response to the antigen challenge is produced by evolutionary and somatic processes. The mechanisms operating at a somatic level have been studied in great detail. In contrast, neither the mechanisms nor the strategies of diversification at an evolutionary level have yet been understood in similar detail. Particularly, the substitution patterns in alleles of immunoglobulin genes (Igs) have not been systematically studied. Furthermore, there is a scarcity of studies which link the analysis at a genetic level of the diversification of repertoires with the structural consequences at the protein level of the changes in DNA information. For the purpose of systematically characterizing the strategies of evolutionary diversification through sequence variation at alleles, in this work, we built a database for all the alleles of the IGHV locus in humans reported until now. Based on these data, we performed diverse analyses of substitution patterns and linked these results with studies at the protein level. We found that the sequence diversification in different alleles does not operate with equal intensity for all V genes. Our studies, both of the number of substitutions and of the type of amino acid change per sub-segment of the V-REGION evidenced differences in the selective pressure to which these regions are exposed. The implications of these results for understanding the evolutionary diversification strategies, as well as for the somatic generation of antibody repertoires are discussed.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* R/S ratio; Amino acid substitution pattern; Molecular recognition; Antibody repertoires

### 1. Introduction

The main function of the immune system in vertebrates is to protect them from foreign organisms (Mazumdar, 1995; Cohn and Langman, 1996). Since the variety of the antigenic world is enormous, efficient immunological mechanisms of defense must be provided with repertoires of highly diversified receptors able to contribute efficiently to the recognition and processing of foreign agents. Diversity in the repertoire of antibodies (Abs) is produced by genetic and somatic

processes (Max, 1998). Generally, organisms have extensive multigenetic families with diverse members which encode numerous V-REGIONS. Such diversity increases by somatic mechanisms like recombination, inexact binding of genetic segments, hypermutation (Tonegawa, 1983) and germline conversion (Becker and Knight, 1990; McCormack et al., 1991).

The mechanisms operating to diversify the Abs repertoire at somatic level have been studied in great detail, but little is known about the genetic contribution to the diversification of the Ab repertoire. This lack of understanding is partly due to the very complex configuration, composition and evolution of the immunoglobulin (Ig) genes (Li et al., 2002). However, it is fundamental to understand the factors that have shaped the germline repertoire and its evolutionary diversification processes. This knowledge should lead to an understanding

*Abbreviations:* Ab, antibody; CDR, complementarity determining region; FR, framework region; Ig, immunoglobulin; R/S ratio, replacement/silent ratio

\* Corresponding author. Tel.: +52 28 125757; fax: +52 28 125757.

E-mail address: [cnvargas@yahoo.com](mailto:cnvargas@yahoo.com) (E. Vargas-Madrado).

of the differential expression of V genes and their association with some pathologies (Milner et al., 1995).

In the human Ig loci, two types of polymorphism have been observed for the V genes: (i) variation in nucleotide substitution and (ii) insertion and/or deletion of genes in the locus (Cook and Tomlinson, 1995; Lefranc et al., 1999; Hammarstrom et al., 1990; Matsuda et al., 1993, 1998). Although a correlation between insertion/deletion polymorphism variations and pathologies has not been found (Pargent et al., 1991; Schaible et al., 1993), such events may affect the function that genetic segments play in the Repertoire (Li et al., 2002). In regions I and II of gene IGHV, this kind of polymorphism has been observed (Cui and Li, 1998; Pramanik and Li, 2002), whereas in region III this type of variations has not been found (Cui and Li, 1997, 2000).

Similar processes take place in evolution through nucleotide substitution where the genes situated in the most J<sub>H</sub>-distal regions present a high degree of substitution polymorphism (genes 1-12L, 1-6/1-69, 1-3/1-68, 1-12R and 4-11/DP-66), in contrast to genes located in the most J<sub>H</sub>-proximal portion that are highly conserved (Cook et al., 1994a, 1994b). Differences in substitution polymorphism depend not only on the physical location of the IGHV genes; it has been observed that within the V-REGIONS, there also exist fragments in which diversification is either favored or restricted (Cook and Tomlinson, 1995; Milner et al., 1995). Within the mutations observed in germline genes, processes of diversification and selection have been seen to stimulate the variability of amino acids at the antigen-binding site and to conserve the amino acids in the framework regions (FRs). This highly marked conservation of the FR is related to its function of maintaining the folding of the domain, and consequently conserve the general structure of the antigen-binding site (Tanaka and Nei, 1989; Kirkham and Schroeder, 1994; Vargas-Madrado et al., 1994; Tomlinson et al., 1996). Furthermore, variability in the VH domain is not only favored in the CDRs, as some FRs are more susceptible to processes of diversification while others are highly conserved (Kirkham et al., 1992). Differences in conservation may be attributed to the distinct functions performed by these sub-segments in the antibody (Kirkham et al., 1992; Kirkham and Schroeder, 1994).

Within the V-REGIONS, the substitution of nucleotides permits the creation of alleles with amino acid changes which imply structural variants with respect to its parent allele. This process permits the exploration of variants of antigen-binding sites, allowing a better adaptation to the changing antigenic universe in an evolutionary period (Ota et al., 2000).

At present a detailed characterization of the implications of the substitution patterns in alleles for the mechanism of antigen-antibody recognition does not exist. There are several levels at which the evolutionary strategies of the Ig genes can be characterized (Sasso et al., 1990; van Dijk et al., 1991; Sasso et al., 1993; Cui and Li, 1998). For example, the evolutionary diversification of Ig genes can be studied by the number of mutations per allele (Li, 1997), as well as by the distribution and type of substitutions along the gene (Eigen

et al., 1989). There is a marked difference in evolutionary patterns between FRs and CDRs in the antibodies (Kabat, 1978; Lara-Ochoa et al., 1995), but even within each region there are very diverse patterns of variation among distinct positions (Vargas-Madrado et al., 1994). For instance, hypervariable positions that have a high frequency of contact with the antigen are present in the CDRs (Padlan et al., 1995; MacCallum et al., 1996; Ramirez-Benites and Almagro, 2001), whereas other highly conserved positions preserve the structure of the antigen-binding site (Chothia and Lesk, 1987; Padlan, 1990; Vargas-Madrado et al., 1994). Therefore, an integral and detailed characterization of the substitution patterns in alleles in the V genes of Igs that considers its functional peculiarities, will allow a deeper comprehension of the strategies of molecular evolution in the repertoire of antibodies (Vargas-Madrado et al., 1997).

In this paper we analyzed some aspects of molecular evolution by allelic variation in the human IGHV genes and the consequences of these alterations on the structural properties of the antigen-binding site. This will permit a more detailed understanding of the strategies that the immune system develops to create diverse repertoires of Abs with high affinity and specificity. Allele mutations of the human functional IGHV genes were analyzed, based on the alignments of alleles available in IMGT Repertoire from IMGT, the international ImmunoGenetics information system, <http://imgt.cines.fr> (Lefranc, 2003, 2004), and published in The Immunoglobulin FactsBook (Lefranc and Lefranc, 2001). Through a detailed study of the original reports on the sequences, we evaluated the quality of the available information. Based on this database, the following aspects are analyzed: (i) distribution of alleles per gene; (ii) number of substitutions per allele; (iii) distribution and type of amino acid substitution in the V-REGION; (iv) analysis of the replacement/silent substitutions ratio (R/S ratio) for the complete V-REGION and by sub-regions (FRs and CDRs).

The analysis of the R/S ratio with the model of genetic change through aleatory punctual mutation provides a powerful tool for determining the type of selective pressure that is operating on positions or specific sub-regions of genes (Jukes and King, 1979; Shlomchik et al., 1987). This characteristic is very appropriate for the objectives of the present study.

## 2. Methods

### 2.1. Construction of the database

Based on the IMGT (<http://imgt.cines.fr>) database, all alleles of the human IGHV locus were compiled and compared in detail with the germline genes. We aligned each of the alleles with the allele representing each IGHV gene and, following the criterion of maximum homology, we assigned the sequences to the corresponding allele. An analysis of the sequences made it possible to reassign some of the alleles that presented errors in their assignment in the original database

due to problems of alignment. In order to have qualitative elements for this study, each of the original articles was reviewed to obtain the information relevant to each sequence. The original sequences were checked; the experimental conditions, the source of the DNA, and other data were collected in order to evaluate the quality of the database.

## 2.2. Classification of the type of replacement

For each of the substitutions reported in the alleles, the type of amino acid substitution (alterations of physico-chemical properties) presented in each residue was analyzed; this was done in accordance with the system of the grouping and analysis by Grantham (1974) and Go and Miyazawa (1980). In these systems, the alteration of physico-chemical properties is mainly determined by the composition, polarity, molecular volume, exteriority and interiority of the lateral chains. Considering all these characteristics, we classified the amino acid substitutions into three groups: (i) conservative, (ii) non-conservative and (iii) radical.

## 2.3. Calculating the R/S ratio

Due to redundancy in the genetic code, base pairs changes in a codon may yield either a replacement of one amino acid by another or preservation of the same residue (a silent mutation). Because of this, it is possible to characterize the evolutionary forces shaping the diversification of the different sub-regions of a gene by studying the replacement and silent substitutions ratio (R/S ratio). The R/S ratio was calculated by dividing the replacement substitutions by the total number of silent substitutions (R/S) (Jukes and King, 1979; Shlomchik et al., 1987). The substitutions are counted as nucleotide changes found in an allele with respect to the predominant allele in a gene. Codons undergoing random mutation are predicted to yield an R/S ratio of 2.9. Values below 2.9 indicate conservation and those above 2.9 diversification (Jukes and King, 1979; Shlomchik et al., 1987).

## 3. Results

### 3.1. Analysis of the database for human IGHV alleles

Table 1 reports the genes for which alleles have been found. This database includes 158 sequences, which contribute alleles for 42 of the 51 functional genes that form the IGHV locus (Cook and Tomlinson, 1995). It is remarkable that most of the studies reporting alleles were not realized for the purpose of characterizing allelic polymorphism. It should also be mentioned that most of the samples of genetic material for studies of IGHV genes have been obtained from Caucasian individuals.

The main features that we found from the detailed analysis of the sequence database are:

- (i) Only part of the data comes from studies specifically designed to characterize polymorphism. Although the remaining studies report sequences of alleles, this was not the purpose of their research. For instance, the alleles found for genes V7-4-1, V5-51, V5-a and V3-23 resulted from systematic studies to characterize their polymorphism (Sanz et al., 1989; Willemis van Dijk et al., 1992; Rubinstein et al., 1994; Sasso et al., 1995).
- (ii) The polymorphism found for genes V3-11, V3-15, V3-30, V3-30-3, V3-33, V3-49, V3-64, V4-4, V4-30-2, V4-30-4, V4-31, V4-34, V4-39, V4-59, and V4-61 was reported in studies whose objective was to characterize the polymorphism of their respective families, but not specifically that of these genes (Sasso et al., 1990, 1992; Olee et al., 1991; Weng et al., 1992; Winkler et al., 1992; Adderson et al., 1993).
- (iii) The alleles found for the remaining genes (21) may be considered circumstantial, since they were found in studies of other kinds, such as the mapping of the IGHV locus, or gene usage and its association with pathologies.
- (iv) Genes V1-18, V3-7, V3-13, and V3-30-3 have been studied independently by different research groups that always found the same allele for each gene (Berman et al., 1988; Olee et al., 1991; Kuppers et al., 1992; Tomlinson et al., 1992; Winkler et al., 1992; Matsuda et al., 1993; Sasso et al., 1992, 1995).
- (v) For gene V3-30, 18 different alleles have been reported, and they resulted from four independent studies (Chen, 1990; Olee et al., 1991; Sasso et al., 1992; Harmer et al., 1995); for gene V3-23, in contrast, only two alleles have been found also as a result of four independent studies (Chen et al., 1988; Tomlinson et al., 1992; Matsuda et al., 1993; Sasso et al., 1995).
- (vi) In the case of the genes with more reported alleles (2-70, 4-34, 4-59 and 3-30), the different alleles resulted from independent studies (Kodaira et al., 1986; Lee et al., 1987; Baer et al., 1988; Chen, 1990; Olee et al., 1991; Pascual et al., 1990; Campbell et al., 1992; Sasso et al., 1992; Tomlinson et al., 1992; van Es et al., 1992; Weng et al., 1992; Andris et al., 1993; Matsuda et al., 1993; van der Maarel et al., 1993; Cook et al., 1994a, 1994b; Brezinschek et al., 1995; Harmer et al., 1995; Voswinkel et al., 1997).

The fifth and sixth columns of Table 1 show the number of alleles reported for each gene. A great variability in the number of alleles per gene exists, for example, gene 3-30 presents 18 alleles, whereas gene 3-13 has only one. This range implies great differences in the degree of variability for the genes, which allows us to classify the genes variability as follows: (i) highly variable (seven or more alleles per gene); (ii) variable (from three to six alleles) and (iii) conserved (one to two alleles). Of the 42 functional genes of the IGHV gene for which alleles have been reported 7 (17%) are highly variable, 12 (28%) are variable and 23 (55%) are conserved.

Table 1  
Number of alleles reported per gene for human IGHV

Clans and families		Number of germline genes	Number of allelic segments	Gene name	Number of alleles
Clan I	IGHV1	11	7	1-2	3
				1-3	1
				1-18	1
				1-45	2
				1-46	2
				1-69	6
				1-f	1
	IGHV5	2	2	5-5-51	4
				5-a	3
	IGHV7	1	1	7-4-1	2
Clan II	IGHV2	3	2	2-5	8
				2-70	11
	IGHV4	11	10	4-4	5
				4-28	4
				4-30-2	3
				4-30-4	5
				4-31	9
				4-34	12
				4-39	5
				4-59	9
				4-61	5
				4-b	1
					IGHV6
Clan III	IGHV3	22	19	3-7	1
				3-11	2
				3-13	1
				3-15	7
				3-21	1
				3-23	2
				3-30	18
				3-30-3	1
				3-33	4
				3-38	1
				3-43	1
				3-47	2
				3-48	2
				3-49	2
				3-53	1
				3-64	4
				3-66	2
3-72	1				
3-74	2				
Totals		51	42	158	

At a family level, marked differences are also observed in the number of reported alleles (Table 2, columns three and four). Evidently, this amount is strongly determined by the number of genes in each family. Within the complex families, it is noteworthy that, although the IGHV4 family contains fewer genes than IGHV3 (11 and 22, respectively), the first proved to be more variable in the number of alleles reported (58 and 55 genes, respectively). In the small families, IGHV2 and IGHV5 are highly variable, for they possess only three and two genes, respectively, yet 19 and 7 alleles have been

reported, respectively. This contrasts with the IGHV6 and IGHV7 families, each consisting of only one gene, for which only one allele has been found.

### 3.2. Number of substitutions per allele

Fig. 1 shows the number of substitutions (total and replacements) per allele. The distribution is highly heterogeneous, with extreme values ranging from 1 to 12 replacement substitutions. We propose a classification of three groups of al-

Table 2  
R/S ratio by sub-segments of the VH domain grouped according to family and clan

Clans and families		Number of genes	Number of alleles	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
Clan I	IGHV1	11(7) <sup>a</sup>	16	0.1	2/0 <sup>b</sup>	1/0	11.0	2.6
	IGHV5	2(2)	7	0/3 <sup>c</sup>	1/0	0.5	-	2/0
	IGHV7	1(1)	2	-	-	0/1	-	4/0
Clan II	IGHV2	3(2)	19	4.0	9/0	1.0	20/0	2.4
	IGHV4	11(10)	58	3.0	5/0	1.3	3.4	0.7
	IGHV6	1(1)	1	-	-	-	-	-
Clan III	IGHV3	22(19)	55	1.7	12.5	0.2	3.0	2.0
Totals		51(42)	158	1.8	21.0	0.6	4.3	1.5

<sup>a</sup> The number of genes integrating each family is specified. The number of genes presenting alleles is reported in parentheses.

<sup>b</sup> No silent substitutions were found for some regions and families, while for others no replacements substitutions were found. In such cases, the number of replacements and silent substitutions is explicitly reported (numerator and denominator, respectively).

<sup>c</sup> Those positions for which no substitution of any kind was encountered are indicated with a hyphen.

les according to the number of replacement substitutions: (i) highly mutated (seven or more substitutions); (ii) moderately mutated (from three to six substitutions); (iii) slightly mutated (one or two substitutions). Of the 158 alleles studied, 107 (68%) are slightly mutated; 38 (24%) moderately mutated and 13 (8%) highly mutated.

An important question at this point is whether some correlation exists between the presence of a great number of alleles in a gene and the fact that these alleles are highly substituted. It was found that there is a strong correlation between these two events. Thus, of the 13 highly mutated alleles, eight belong to highly variable genes, which represents a frequency far greater than expected (estimated  $\chi^2$  is 46.6 and the ex-

pected  $\chi^2_{0.95}$  is 3.84); that is, out of a total of 158 alleles, 74 alleles belong to highly variable genes, which implies a probability of 0.46 for the occurrence of alleles in highly variable genes. Therefore, if there are 13 highly mutated alleles, the mathematical expectation that these alleles should appear in highly variable genes is 5.98, which is less than the eight observed.

### 3.3. Type of substitutions per allele

Not only the number of substitutions is important to create diversity at the protein level; the type of amino acid substitution (alteration of physico-chemical properties)

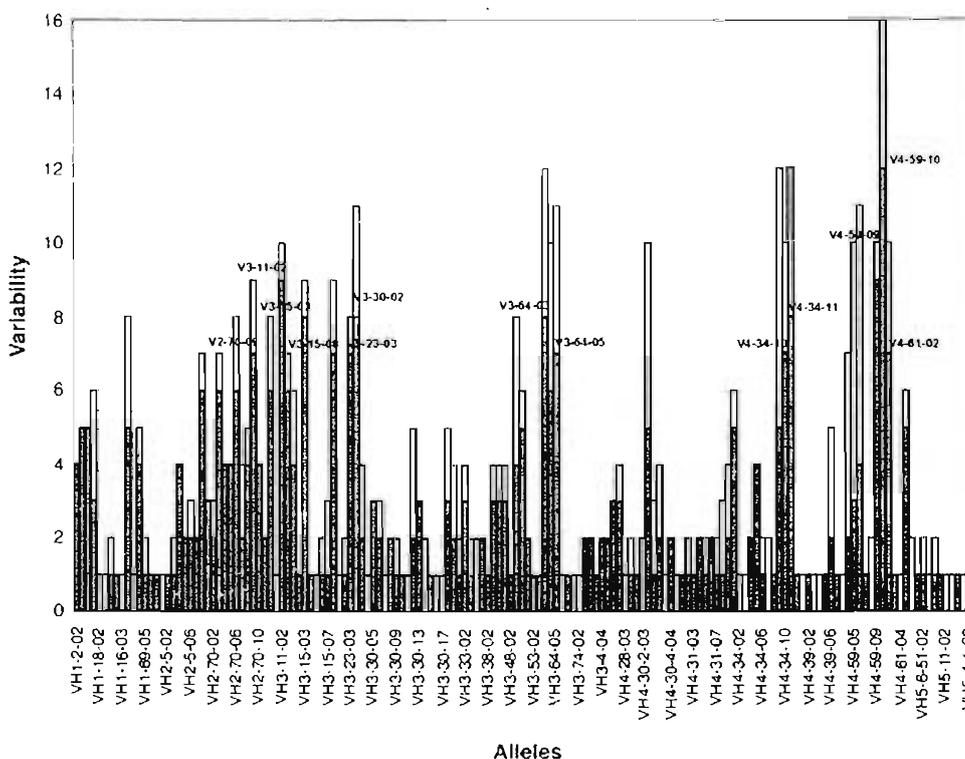


Fig. 1. This figure shows the number of substitutions occurring in each allele. The total of substitutions is shown in white, while those changes that produced a replacement at the amino acid level are shown in green.

presented in each residue also plays a fundamental role (see Section 2).

In the 158 reported alleles, 484 substitutions were found, of which 300 implied amino acid changes. Of these 300, 183 (61%) imply a conservative change, 107 (36%) non-conservative, and 10 (3%) radical. Almost two thirds of amino acid substitutions (61%) do not imply drastic alterations in physico-chemical properties, which seems to be partly associated with the preponderance of conservative substitutions in the FRs (see section on analysis of R/S ratio). Nevertheless, the fact that 39% of the changes (non-conservative and radical) imply partial or radical alterations in the properties of the residues suggests intense pressure toward diversification, at least in some sub-regions of the domain.

The types of amino acid replacement were estimated by grouping the genes according to their degree of variability (number of alleles per gene). The very variable genes present the following proportions: 62% of conservative substitutions, 35% non-conservative and 3% radical. For the variable genes, the percentages are: 65%, 31% and 4%, respectively, and for the conserved genes, the percentages are: 60%, 38% and 2%. This indicates that the proportions of the three types of amino acid replacements remain the same, whether the gene is highly variable or very conserved. Very similar proportions were found when grouping the alleles according to the number of substitutions they present. Thus, the highly

mutated alleles have the following percentages per type of substitution: 72% with conservative substitutions, 23% non-conservative and five radical. The percentages for the moderately mutated alleles are: 60%, 37% and 3%, respectively, and for the slightly mutated alleles: 60%, 36% and 4%. These results suggest that the pressure to conserve the appropriate proportion of residues operates similarly on the different alleles, although, as we mentioned before, the intensity of the variation is different among the distinct genes. In the following sections, we will see that the types of amino acid substitutions are not equally distributed among the CDRs and the FRs.

3.4. Substitutions by position in the V-REGION

The previous results show that, through a detailed characterization of the substitution patterns at alleles, peculiar forms of variations associated with the specific functions of the protein under study become evident. A distinctive characteristic of antibodies is the great diversity of variability at different positions dependent on the function performed by the residues (Kabat, 1978; Vargas-Madrado et al., 1994). Therefore, the number of substitutions per position in the V-REGION was analyzed for the 158 alleles, and the results are shown in Fig. 2. Both the total number of substitutions and those that imply amino acid replacement are reported.

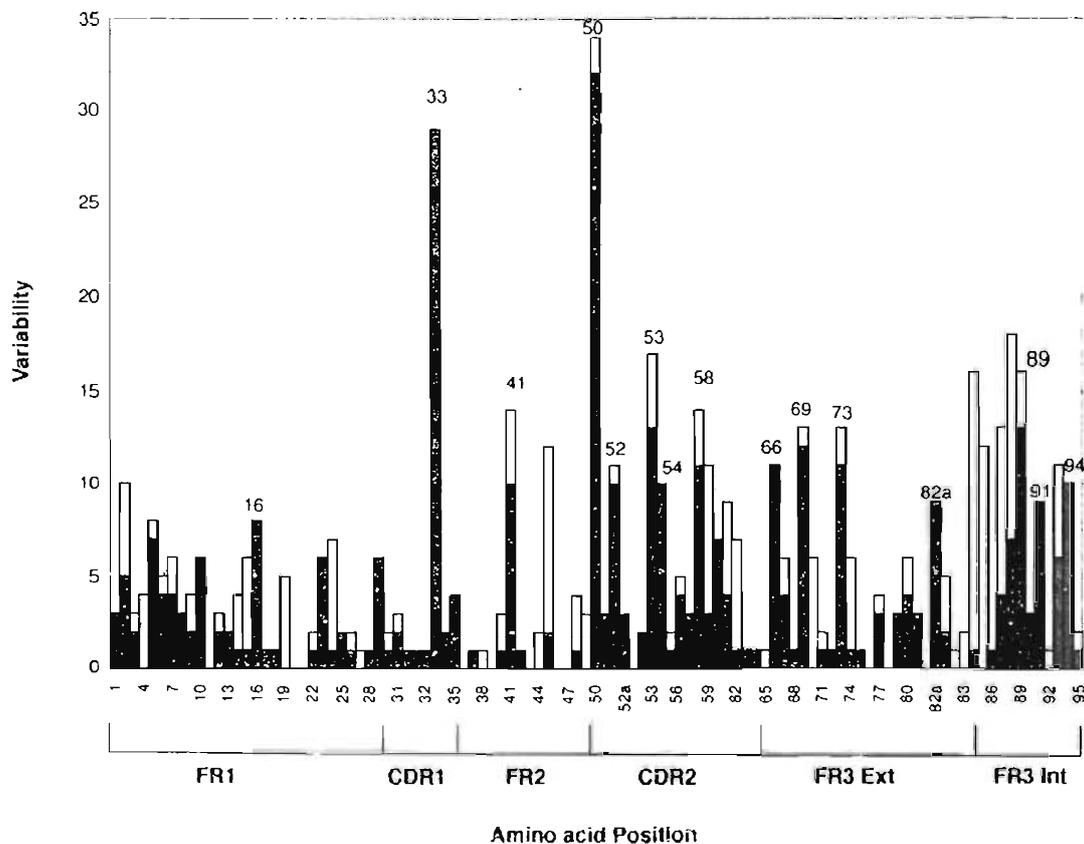


Fig. 2. This figure denotes the substitutions occurring in the VH exon by positions from 1 to 94. Those substitutions originating from replacement are shown in red, and white is for all the substitutions accounted for.

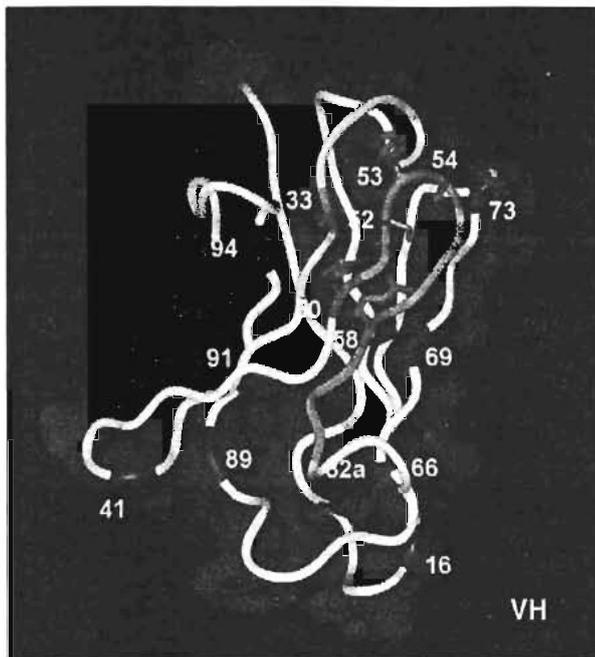


Fig. 3. Within the VH domain of the Ig, the positions produced by allelic polymorphism that were replaced most frequently are marked with blue; within these same positions those that were reported as frequently in contact with the Ag are marked with red (35). Pink represents CDR1 and green CDR2.

It can be seen that some positions (12 out of a total of 94) admit neither silent nor replacement substitutions, in any of the alleles (positions 11, 20, 21, 36, 39, 43, 46, 47, 52b, 76, 78, 82). Taking into account only the replacement substitutions, we find another group of positions, 37 of them, that mutate occasionally, that is, present one or two replacements. In contrast with this group, 27 positions presented three or more replacement substitutions; among these, 15 residues stand out for their high frequency of replacement (eight or more substitutions for positions 16, 33, 41, 50, 52, 53, 54, 58, 66, 69, 73, 82a, 89, 91 and 94). Within this group, positions 33 and 50 deserve special attention for their extraordinary hypervariability, having 29 and 32 replacements, respectively. It should be noted that this group of positions with an elevated number of replacements includes various residues that have been identified as having frequent contact with the antigen (positions 33, 50, 52, 53, 54, 58) (MacCallum et al., 1996). In Fig. 3 the location of the positions identified herein as being frequently replaced is presented in the three-dimensional structure of the VH domain, with emphasis on those positions showing frequent contact with the antigen. It can be seen that most of the frequently replaced positions (10 out of 15) are located in the CDRs or in nearby areas (Figs. 2 and 3).

The presence of a region in the FR3 with a high replacement frequency (positions 89, 91, 94) is also noteworthy; it corresponds with the interior region (Int) of the FR3, according to a classification by Kirkham and Schroeder (1994).

During our analysis to determine mutations by positions, we found that some positions of the V-REGION showed double and triple mutations within one and the same codon

(Fig. 4). The expected probability of a double or triple mutation occurring within a codon is extremely small (0.0036 for a double mutation and 0.000013 for a triple one, if we assume an average length of 282 nucleotides per V-REGION). We also found that these double and triple mutations occur repeatedly in the same position in different alleles (Fig. 4), and that the great majority of such multiple mutations per codon take place in highly mutated positions. The previous observations suggest that these events of multiple mutations are associated with mutation hotspots.

### 3.5. R/S ratios per region in the V-REGION

It is possible to characterize the evolutionary forces shaping the diversification of the different sub-regions of a gene by studying the replacement and silent substitutions ratio (R/S ratio) and comparing them with the values obtained through a strict consideration of the redundancy of the genetic code (Jukes and King, 1979; Shlomchik et al., 1987).

The R/S ratio for the different sub-regions (FR1, FR2, FR3, CDR1, CDR2) of the V-REGION in IGHV genes was calculated, and the results per family and region are summarized in Table 2. The analysis of the total R/S ratio per region (last row in Table 2) shows that the R/S ratio values for the FRs are far below the point of equilibrium ( $R/S = 2.9$ ), whereas the values for the CDRs are above said value. This same tendency has been reported for the variation between germline genes in humans and mice, where the R/S ratio for the CDRs was above the point of equilibrium (Kirkham and Schroeder, 1994; Ota et al., 2000). This shows that in allelic variation there is also a selection for diversification in the CDRs and for conservation in the FRs, similar to that shown for orthologous and paralogous diversification for IGHV genes. FR2 is notable for its R/S ratio value of 0.6, which implies that almost all of the substitutions occurring in this region are silent. Although both CDRs favor replacement substitutions, the R/S ratio value is much higher for CDR1 (21.0) than for CDR2 (4.3). The reason for such a high value for CDR1 is that nearly all of the substitutions in this region take place in position 33, and all of those occurring in this position are replacements (Fig. 2). Even though CDR2 contains position 50, the most mutated position, several other positions in this region present substitutions, many of which are silent. Consequently, the R/S ratio for CDR2 shows a value closer to the point of equilibrium (4.3), though it also indicates a selection toward diversification.

Upon itemizing the values by gene family, it can be seen that both in the FRs and in the CDRs the R/S ratio values vary considerably among regions for the different families (Table 2). It should be noted that the small families, IGHV6 and IGHV7, for which only one or two alleles have been reported, contribute a very small sample for this type of analysis. There is a great variation among the different families for FR1 and FR3; in FR1, for example, the R/S ratio value for IGHV2 is 0.1, whereas for IGHV2 and IGHV4 the values are 4.0 and 3.0, respectively. Similarly, in FR3 a high conser-

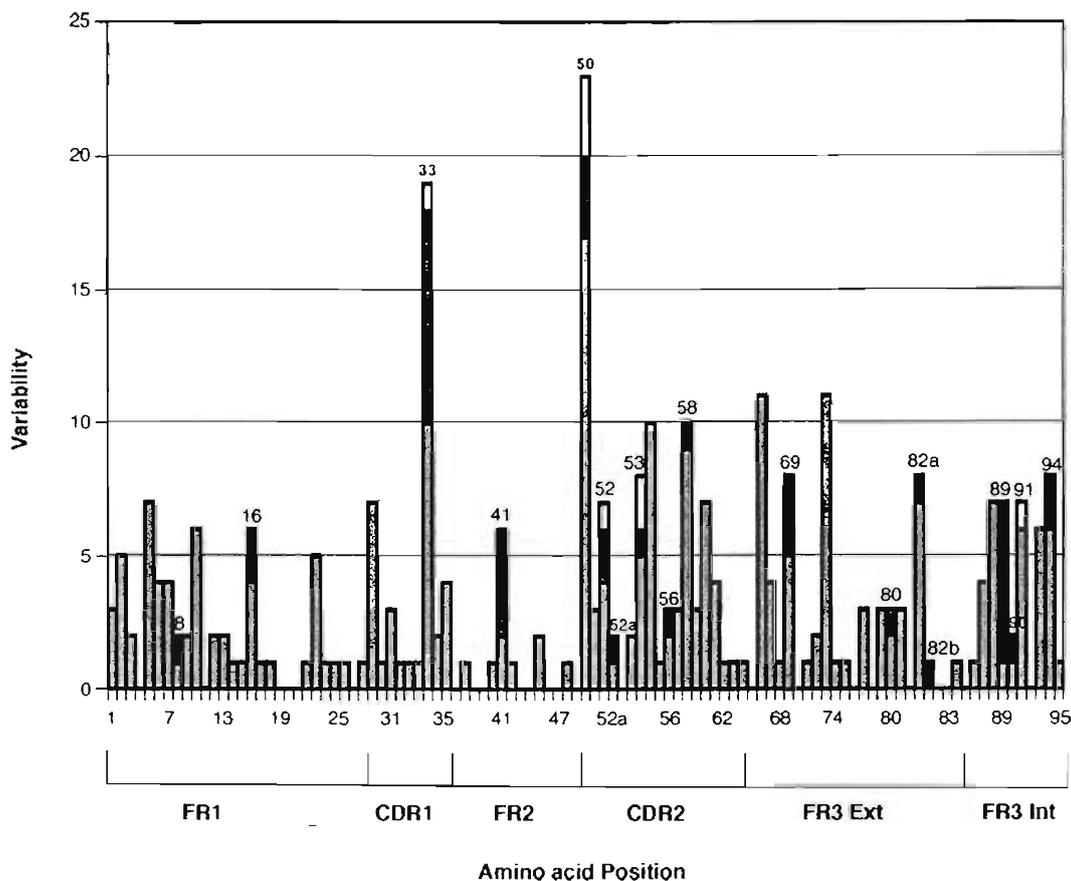


Fig. 4. This figure shows the replacement substitutions occurring within a single codon in the VH exon by positions from 1 to 94. They are grouped by color according to the type of substitutions: yellow for triple substitutions, purple for double, and blue for single ones

variation is seen for the IGHV4 family ( $R/S = 0.7$ ); in contrast, families IGHV5 and IGHV7 present only replacement substitutions (2.0/0 and 4.0/0, respectively).

The CDRs also present considerable variations in the R/S ratio values. In CDR1, families IGHV1 and IGHV5, for which 16 and 7 alleles, respectively, have been reported, show only two and one respective replacement substitutions. In contrast, families IGHV2, IGHV3 and IGHV4 in this same CDR show high ratios of replacement. Considerable differences are also observed in CDR2, in which there are families with very high R/S ratio values (IGHV1 and IGHV2), while others have values quite close to the point of mutational equilibrium (Table 2).

The simultaneous occurrence of opposing R/S ratio values between CDR1 and CDR2 in the same family presents an even more striking contrast; in family IGHV3, for example, the R/S ratio for CDR1 is 12.5, whereas the value for CDR2 is 3.0. Another noteworthy case is IGHV1, which as previously mentioned, has only two substitutions in CDR1 (both replacements); whereas 12 substitutions occur in CDR2, 11 of them replacements, due to which a R/S ratio value of 11.0 is obtained (Table 2).

Considering the marked differences observed in the R/S ratio among the different regions, the types of amino acid

substitutions among these segments may also be expected to be significantly different. Therefore, the distribution of the three types of amino acid substitution previously described for the different CDR and FR regions was also calculated, the results per region being as shown in Table 3.

FR1 and FR2 show a clear tendency to restrict their substitutions toward the conservation of physico-chemical properties. Nonetheless, 17% of radical changes occurring in FR2 deserve attention. This value is contributed almost entirely by two replacements in positions 41 and 42 of alleles V1-45-03 and V5-51-05, respectively. Since FR2 forms part of the core of the VH:VL interphase and is therefore fundamental for maintaining the stability of the variable superdomain (Vargas-Madrado and Paz-Garcia, 2003), these alleles

Table 3  
Percentage of replacement type for sub-regions of the Exon-V

Region	Radical (%)	Non-conservative (%)	Conservative (%)
FR1	6	12	82
FR2	17	8	75
FR3	2	40	58
CDR1	0	38	63
CDR2	2	51	46
Exon-V	3	36	61

may not be functional. On the other hand, FR3 presents four times as many non-conservative substitutions as do FR1 and FR2.

Although the percentage of radical changes in the CDRs is also quite low, the value of their non-conservative substitutions rises considerably, the latter percentage being greater than that for conservative changes in the case of CDR2.

In general, the types of amino acid substitutions are not observed to occur in the same proportions in the different regions. This is congruent with observations in previous sections indicating the existence of diverse evolutionary restrictions for the different sub-segments.

#### 4. Discussion

In the previous sections we analyzed the substitution patterns at alleles in the IGHV locus. The evolutionary strategy followed by the processes of diversification and/or conservation acting upon IGHV genes seems to be subject to mechanisms of selection and DNA dynamics, since the greatest incidence of substitutions tends to occur in those regions and residues that are important for the recognition of antigens, while it is restricted in the regions responsible for the general folding of the domain (Milner et al., 1995; Tomlinson et al., 1996; Ota et al., 2000). At the same time, it must be considered that in concertation with selective pressure there are several mechanisms of DNA dynamics, like “concerted” evolution, that co-determine the final properties of genes.

This work shows a detailed study of variation patterns, highlighting the fact that the diversification process does not occur homogeneously among the genes, nor among different regions of V genes (Kirkham and Schroeder, 1994; Blanden et al., 1998; Ota et al., 2000). From the analysis of allelism per gene performed here, we notice a clear tendency to conserve certain genes and diversify others. Nevertheless, evolution does not occur through the direct selection of individual genes having unique characteristics associated with susceptibility or resistance to diseases, but rather at the level of the complete Abs repertoire (Blanden et al., 1998). It is also necessary to consider that, in the evolution of Igs, not only selective pressure molds the repertoire; diverse mechanisms associated with DNA dynamics are also capable of selectively altering certain genes or their sub-regions. This implies the existence of evolutionary dynamics of optimization operating between different forces, and this will be expressed at different levels of organization in locus IGHV. Therefore, it is necessary to be careful when assuming that the same selective pressures will be acting for all the members of a family, be it small or large. For example, in the early studies of the evolution of Ig families it was postulated that, with the objective of increasing the diversity of repertoires, the genetic strategy was to generate large populations of redundant genes (complex families, e.g., family IGHV3), along with the persistent con-

servation of those small families with unique characteristics (e.g., family IGHV6) (Pascual and Capra, 1991; Ota et al., 2000).

Nevertheless, more detailed studies (like the one presented here) show the existence of much finer strategies. For example, for small families it is observed that families IGHV5, but especially IGHV2, are highly redundant for the different analyses made here, whereas IGHV6 and IGHV7 are highly conserved. Correspondingly, certain genes in large families are highly variable in the number of alleles reported and in other parameters analyzed, while others are conserved (Table 1). For instance, we found that the evolutionary diversification strategies differ greatly between genes V3-23 and V4-34, both of which are expressed very frequently in humans (Milner et al., 1995). Gene V3-23 has only three alleles, and its amino acid substitutions are restricted to CDR2. In contrast, V4-34 has 12 alleles and its substitutions occur all along the V-REGION (data not shown).

In the human genome the alleles of a gene generally differ by an average of one nucleotide, this level of diversity being associated with evolution through genetic drift (Kruglyak, 1997; Halushka et al., 1999). In locus IGHV, 73% of the alleles have one or two substitutions, which also suggests genetic drift; however, the remaining 27% (particularly the 8% of genes having more than eight substitutions) show evidence of intense selective pressure to diversify the repertoire of antibodies.

In previous studies, a great amount of deleterious mutations have been observed in said genes which come from the random genetic drift (Perlmutter et al., 1985; Ota et al., 2000). Additionally, the structural and functional evidences imply a significant role of diversifying selection preserving the germline V gene segment repertoire (Rothenfluh et al., 1995; Ota et al., 2000). Therefore, our results and the foregoing entail complex and contradictory forces in the evolution of human V gene segments.

From the analyses of substitution patterns (number and type of substitutions and R/S ratio) per region and position of the different alleles, a second evolutionary strategy can be distinguished; more explicitly, not only a selective force and “concerted” evolution acting to conserve and/or diversify some of the genes, but also a tendency to diversify only certain regions (mainly CDR2) within the gene may be observed. Furthermore, within those regions only some positions were frequently replaced (positions 33, 50, 53, 54 and 58), being positions in frequent contact, these have been seen to play a central role in the interaction with the antigen (MacCallum et al., 1996). This pattern is very similar to the one observed when the differences among the IGHV genes in humans are analyzed (Tomlinson et al., 1996) and with some patterns in the sequence data that are consistent with “signatures” of somatic events (Tomlinson et al., 1996; Blanden et al., 1998).

It was also found that the FR3 region contains several positions that are highly mutated (Fig. 2), and that the percentage of non-conservative substitutions is as much as four-fold higher than in FR1 and FR2. Certain sub-segments of the FR

that are distant from the antigen-binding site have been postulated as playing an important recognition role, since they affect the antigen binding (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; Gorman et al., 1991) or the interaction with other non-specific ligands (Kirkham et al., 1992; Zouali, 1995). For instance, position 71 in FR3 participates in the conformation of CDR2 (Chothia et al., 1989; Foote and Winter, 1992) or affects VH:VL pairing (Saul and Poljak, 1993; Vargas-Madrado and Paz-Garcia, 2003).

On the other hand, we found that the forces and mechanisms to diversify the CDRs do not operate equally for the different families. That is, in some families CDR1 is more diversified and in others it is CDR2. The different CDRs may perform distinct functions in the recognition properties of antibodies (Rothenfluh and Steele, 1993; Vargas-Madrado et al., 1995, 1997; Hande and Manser, 1997; Hemminki et al., 1998; Yazici et al., 1998; Decanniere et al., 1999; Roe et al., 1999; Xu and Davis, 2000). Consequently, differential strategies can operate for the CDRs in germinal diversification in accordance with the distinct functions fulfilled by each gene or family (Pascual et al., 1990; Berman et al., 1991; Wang and Stollar, 1999; Van Dijk-Hard and Lundkvist, 2002). Unfortunately, at the present time analyses similar to the ones described above for germline genes or somatic hypermutation are not available.

#### 4.1. Global strategies for repertoire diversification

Various evidence indicates that only a small fraction of the repertoire of immunoglobulin genes is important for the immune response (Zinkernagel and Doherty, 1977; Viale et al., 1992; Rothenfluh et al., 1995; Nobrega et al., 1998; Lacroix-Desmazes et al., 1998; Coutinho, 2000; Zinkernagel and Hengartner, 2001; Zinkernagel, 2002). In previous works we have proposed bi-dimensional maps that make it possible to group and identify V genes that codify for antibodies having very peculiar properties of recognition (Vargas-Madrado and Paz-Garcia, 2001). The detailed study of substitution patterns in alleles that we have presented here shows that diversification strategies at distinct levels of variation differ considerably among the genes and families, thereby suggesting differential evolutionary strategies for distinct genes in terms of their contribution to the general properties of the Abs repertoire.

This work points up the scarcity of systematic population studies for characterizing both the substitution patterns in alleles and in general the polymorphism of immunoglobulin genes, as well as the importance of more detailed research in the case of certain important genes (Vargas-Madrado and Paz-Garcia, 2001). This will yield a wealth of information that will help to understand the evolutionary strategies and development of antibody repertoires. A similar analysis of the substitution patterns in alleles for the  $V\kappa$  and  $V\lambda$  genes in humans and mice, under the same parameters explored in this study, is presently underway and will be reported in a forthcoming article.

#### Acknowledgements

We wish to thank Edda Sciutto and Edmundo Lamoyi for their helpful guidance and comments throughout this creative research process. And we especially thank Carlos Laralde, who has been the pivot point for a substantial change in our mental landscapes. Irene Marquina and Warren Haid translated and revised the manuscript. This work was made possible through economic support from the Biological Research Institute of the University of Veracruz. Tania Romo González is supported by scholarships from CONACYT and DGEP-UNAM for postgraduate studies.

#### References

- Adderson, E.E., Azmi, F.H., Wilson, P.M., Shackelford, P.G., Carroll, W.L., 1993. The human VH3b gene subfamily is highly polymorphic. *J. Immunol.* 151 (2), 800–809.
- Andris, J.S., Brodeur, B.R., Capra, J.D., 1993. Molecular characterization of human antibodies to bacterial antigens: utilization of the less frequently expressed VH2 and VH6 heavy chain variable region gene families. *Mol. Immunol.* 30 (17), 1601–1616.
- Baer, R., Forster, A., Lavenir, I., Rabbitts, T.H., 1988. Immunoglobulin VII genes are transcribed by T cells in association with a new 5' exon. *J. Exp. Med.* 167 (6), 2011–2016.
- Becker, R.S., Knight, K.L., 1990. Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell* 63 (5), 987–997.
- Berman, J.E., Mellis, S.J., Pollock, R., Smith, C.L., Suh, H., Heinke, B., Kowal, C., Surti, U., Chess, L., Cantor, C.R., Alt, F.W., 1988. Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus. *EMBO J.* 7 (3), 727–738.
- Berman, J.E., Nickerson, K.G., Pollock, R.R., Barth, J.E., Schuurman, R.K., Knowles, D.M., Chess, L., Alt, F.W., 1991. VH gene usage in humans: biased usage of the VH6 gene in immature B lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* 21 (5), 1311–1314.
- Blanden, R.V., Rothenfluh, H.S., Zylstra, P., Weiller, G.F., Steele, E.J., 1998. The signature of somatic hypermutation appears to be written into the germline IgV segment repertoire. *Immunol. Rev.* 162, 117–132.
- Brezinschek, H.P., Brezinschek, R.I., Lipsky, P.E., 1995. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J. Immunol.* 155 (1), 190–202.
- Campbell, M.J., Zelenetz, A.D., Levy, S., Levy, R., 1992. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol. Immunol.* 29 (2), 193–203.
- Chen, P.P., 1990. Structural analyses of human developmentally regulated Vh3 genes. *Scand. J. Immunol.* 31 (3), 257–267.
- Chen, P.P., Liu, M.F., Sinha, S., Carson, D.A., 1988. A 16/6 idiotype-positive anti-DNA antibody is encoded by a conserved VH gene with no somatic mutation. *Arthritis Rheum.* 31 (11), 1429–1431.
- Chothia, C., Lesk, A.M., 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196 (4), 901–917.
- Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davics, D., Tulip, W.R., Colman, P.M., Spinelli, S., Alzari, P.M., Poljak, R.J., 1989. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342 (6252), 877–883.
- Cohn, M., Langman, R.E., 1996. The immune system: a look from a distance. *Front Biosci.* 1, d318–d323.
- Cook, G.P., Tomlinson, I.M., 1995. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol. Today* 16 (5), 237–242.

- Cook, G.P., Tomlinson, I.M., Walter, G., Riethman, H., Carter, N.P., Bulwela, L., Winter, G., Rabbitts, T.H., 1994a. A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q. *Nat. Genet.* 7 (2), 162–168.
- Cook, G.P., Tomlinson, I.M., Walter, G., Riethman, H., Carter, N.P., Bulwela, L., Winter, G., Rabbitts, T.H., 1994b. A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q. *Nat. Genet.* 7 (2), 162–168.
- Coutinho, A., 2000. Germ-line selection ensures embryonic autoreactivity and a positive discrimination of self mediated by supraclonal mechanisms. *Semin. Immunol.* 12 (3), 205–213 (discussion 257–344).
- Cui, X., Li, H., 1998. Determination of gene organization in individual haplotypes by analyzing single DNA fragments from single spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (18), 10791–10796.
- Cui, X., Li, H., 1997. Discriminating between allelic and interlocus differences among human immunoglobulin VH4 sequences by analyzing single spermatozoa. *Hum. Genet.* 100 (1), 96–100.
- Cui, X., Li, H., 2000. Human immunoglobulin VH4 sequences resolved by population-based analysis after enzymatic amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. *Eur. J. Immunogenet.* 27 (1), 37–46.
- Decanniere, K., Desmyter, A., Lauwereys, M., Ghahroudi, M.A., Muyl-dermans, S., Wyns, L., 1999. A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops. *Struct. Fold Des.* 7 (4), 361–370.
- Eigen, M., Lindemann, B.F., Tietze, M., Winkler-Oswatitsch, R., Dress, A., von Haeseler, A., 1989. How old is the genetic code? Statistical geometry of tRNA provides an answer. *Science* 244 (4905), 673–679.
- Foote, J., Winter, G., 1992. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* 224 (2), 487–499.
- Go, M., Miyazawa, S., 1980. Relationship between mutability, polarity and exteriority of amino acid residues in protein evolution. *Int. J. Pept. Protein Res.* 15 (3), 211–224.
- Gorman, S.D., Clark, M.R., Routledge, E.G., Cobbold, S.P., Waldmann, H., 1991. Reshaping a therapeutic CD4 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (10), 4181–4185.
- Grantham, R., 1974. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185 (4154), 862–864.
- Halushka, M.K., Fan, J.B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R., Chakravarti, A., 1999. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat. Genet.* 22 (3), 239–247.
- Hammarstrom, L., Ghanem, N., Smith, C.I., Lefranc, G., Lefranc, M.P., 1990. RFLP of human immunoglobulin genes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 7 (1), 7–19.
- Hande, S., Manser, T., 1997. Single amino acid substitutions in V(H) CDR2 are sufficient to generate or enhance the specificity of two forms of an anti-arsonate antibody variable region for DNA. *Mol. Immunol.* 34 (18), 1281–1290.
- Hanner, J.J., Loizou, S., Thompson, K.M., So, A.K., Walport, M.J., Mackworth-Young, C., 1995. A human monoclonal antiphospholipid antibody that is representative of serum antibodies and is germline encoded. *Arthritis Rheum.* 38 (8), 1068–1076.
- Hemminki, A., Niemi, S., Hautoniemi, L., Soderlund, H., Takkinen, K., 1998. Fine tuning of an anti-testosterone antibody binding site by stepwise optimisation of the CDRs. *Immunotechnology* 4 (1), 59–69, Jun.
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G., 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321 (6069), 522–525.
- Jukes, T.H., King, J.L., 1979. Evolutionary nucleotide replacements in DNA. *Nature* 281 (5732), 605–606.
- Kabat, E.A., 1978. The structural basis of antibody complementarity. *Adv. Protein Chem.* 32, 1–75.
- Kirkham, P.M., Mortari, F., Newton, J.A., Schroeder Jr., H.W., 1992. Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding. *EMBO J.* 11 (2), 603–609.
- Kirkham, P.M., Schroeder Jr., H.W., 1994. Antibody structure and the evolution of immunoglobulin V gene segments. *Semin. Immunol.* 6 (6), 347–360.
- Kodaira, M., Kinashi, T., Umemura, I., Matsuda, F., Noma, T., Ono, Y., Honjo, T., 1986. Organization and evolution of variable region genes of the human immunoglobulin heavy chain. *J. Mol. Biol.* 190 (4), 529–541.
- Kruglyak, L., 1997. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat. Genet.* 17 (1), 21–24.
- Kuppers, R., Fischer, U., Rajewsky, K., Gause, A., 1992. Immunoglobulin heavy and light chain gene sequences of a human CD5 positive immunocytoma and sequences of four novel VHIII germline genes. *Immunol. Lett.* 34 (1), 57–62.
- Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S.V., Mouthon, L., Ayoub, A., Malanchere, E., Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., 1998. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J. Immunol. Methods* 216 (1–2), 117–137.
- Lara-Ochoa, F., Vargas-Madrado, E., Almagro, J.C., 1995. Distributions of the use frequencies of amino acids in the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. E* 41 (1), 98–103.
- Lee, K.H., Matsuda, F., Kinashi, T., Kodaira, M., Honjo, T., 1987. A novel family of variable region genes of the human immunoglobulin heavy chain. *J. Mol. Biol.* 195 (4), 761–768.
- Lefranc, M.P., 2003. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 31 (1), 307–310.
- Lefranc, M.P., 2004. IMGT-ONTOLOGY and IMGT databases, tools and Web resources for immunogenetics and immunoinformatics. *Mol. Immunol.* 40 (10), 647–660.
- Lefranc, M.P., Lefranc, G., 2001. *The Immunoglobulin FactsBook*. Academic Press, 458.
- Lefranc, M.P., Pallares, N., Fripiat, J.P., 1999. Allelic polymorphisms and RFLP in the human immunoglobulin lambda light chain locus. *Hum. Genet.* 104 (5), 361–369.
- Li, W.-H., 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates Inc.
- Li, H., Cui, X., Pramanik, S., Ching, N.O., 2002. Genetic diversity of the human immunoglobulin heavy chain VH region. *Immunol. Rev.* 190, 53–68.
- MacCallum, R.M., Martin, A.C., Thornton, J.M., 1996. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J. Mol. Biol.* 262 (5), 732–745.
- Matsuda, F., Ishii, K., Bourvagnet, P., Kuma, K., Hayashida, H., Miyata, T., Honjo, T., 1998. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J. Exp. Med.* 188 (11), 2151–2162.
- Matsuda, F., Shin, E.K., Nagaoka, H., Matsumura, R., Haino, M., Fukita, Y., Takaishi, S., Imai, T., Riley, J.H., Anand, R., et al., 1993. Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Nat. Genet.* 3 (1), 88–94.
- Max, E.E., 1998. Immunoglobulins: Molecular Genetics. In: Paul, W. (Ed.), *Fundamental immunology*, fourth ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 111–182.
- Mazumdar, P.M.H., 1995. *Species and Specificity. An Interpretation of History of Immunology*. Cambridge University Press, pp. 3–382.
- McCormack, W.T., Tjoelker, L.W., Thompson, C.B., 1991. Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 219–241.
- Milner, E.C., Hufnagle, W.O., Glas, A.M., Suzuki, I., Alexander, C., 1995. Polymorphism and utilization of human VH genes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764, 50–61.
- Nobrega, A., Grandien, A., Hauray, M., Hecker, L., Malanchere, E., Coutinho, A., 1998. Functional diversity and clonal frequencies of reactivity in the available antibody repertoire. *Eur. J. Immunol.* 28 (4), 1204–1215.

- Olee, T., Yang, P.M., Siminovitch, K.A., Olsen, N.J., Hillson, J., Wu, J., Kozin, F., Carson, D.A., Chen, P.P., 1991. Molecular basis of an autoantibody-associated restriction fragment length polymorphism that confers susceptibility to autoimmune diseases. *J. Clin. Invest.* 88 (1), 193–203.
- Ota, T., Sitnikova, T., Nei, M., 2000. Evolution of vertebrate immunoglobulin variable gene segments. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 248, 221–245.
- Padlan, E.A., 1990. On the nature of antibody combining sites: unusual structural features that may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands. *Proteins* 7 (2), 112–124.
- Padlan, E.A., Abergel, C., Tipper, J.P., 1995. Identification of specificity-determining residues in antibodies. *FASEB J.* 9 (1), 133–139.
- Pargent, W., Schable, K.F., Zachau, H.G., 1991. Polymorphisms and haplotypes in the human immunoglobulin kappa locus. *Eur. J. Immunol.* 21 (8), 1829–1835.
- Pascual, V., Capra, J.D., 1991. Human immunoglobulin heavy-chain variable region genes: organization, polymorphism, and expression. *Adv. Immunol.* 49, 1–74.
- Pascual, V., Randen, I., Thompson, K., Sioud, M., Forre, O., Natvig, J., Capra, J.D., 1990. The complete nucleotide sequences of the heavy chain variable regions of six monospecific rheumatoid factors derived from Epstein-Barr virus-transformed B cells isolated from the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. Further evidence that some autoantibodies are unmutated copies of germ line genes. *J. Clin. Invest.* 86 (4), 1320–1328.
- Perlmutter, R.M., Berson, B., Griffin, J.A., Hood, L., 1985. Diversity in the germline antibody repertoire. Molecular evolution of the T15 VN gene family. *J. Exp. Med.* 162 (6), 1998–2016.
- Pramanik, S., Li, H., 2002. Direct detection of insertion/deletion polymorphisms in an autosomal region by analyzing high-density markers in individual spermatozoa. *Am. J. Hum. Genet.* 71 (6), 1342–1352.
- Ramirez-Benites, M.C., Almagro, J.C., 2001. Analysis of antibodies of known structure suggests a lack of correspondence between the residues in contact with the antigen and those modified by somatic hypermutation. *Proteins* 45 (3), 199–206.
- Riechmann, L., Foote, J., Winter, G., 1988. Expression of an antibody Fv fragment in myeloma cells. *J. Mol. Biol.* 203 (3), 825–828.
- Roe, M., Norderhaug, I.N., Brandtzaeg, P., Johansen, F.E., 1999. Fine specificity of ligand-binding domain I in the polymeric Ig receptor: importance of the CDR2-containing region for IgM interaction. *J. Immunol.* 162 (10), 6046–6052.
- Rothenfuh, H.S., Blanden, R.V., Steele, E.J., 1995. Evolution of V genes: DNA sequence structure of functional germline genes and pseudogenes. *Immunogenetics* 42 (3), 159–171.
- Rothenfuh, H.S., Steele, E.J., 1993. Origin and maintenance of germ-line V genes. *Immunol. Cell Biol.* 71 (Pt 3), 227–232.
- Rubinstein, D.B., Schwartz, R.S., Guillaume, T., Leblanc, P., Stewart, A.K., 1994. Germline complexity, restriction fragment length polymorphism, and coding region sequences of the human VH7 gene family identified with family-specific FR3 segment oligonucleotides. *Mol. Immunol.* 31 (10), 713–721.
- Sanz, I., Dang, H., Takei, M., Talal, N., Capra, J.D., 1989. VH sequence of a human anti-Sm autoantibody. Evidence that autoantibodies can be unmutated copies of germline genes. *J. Immunol.* 142 (3), 883–887.
- Sasso, E.H., Buckner, J.H., Suzuki, L.A., 1995. Ethnic differences of polymorphism of an immunoglobulin VH3 gene. *J. Clin. Invest.* 96 (3), 1591–1600.
- Sasso, E.H., van Dijk, K.W., Milner, E.C., 1990. Prevalence and polymorphism of human VH3 genes. *J. Immunol.* 145 (8), 2751–2757.
- Sasso, E.H., Willems van Dijk, K., Bull, A.P., Milner, E.C., 1993. A fetal expressed immunoglobulin VH1 gene belongs to a complex set of alleles. *J. Clin. Invest.* 91 (6), 2358–2367.
- Sasso, E.H., Willems van Dijk, K., Bull, A., van der Maarel, S.M., Milner, E.C., 1992. VH genes in tandem array comprise a repeated germline motif. *J. Immunol.* 149 (4), 1230–1236.
- Saul, F.A., Poljak, R.J., 1993. Structural patterns at residue positions 9, 18, 67 and 82 in the VH framework regions of human and murine immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 230 (1), 15–20.
- Schaible, G., Rappold, G.A., Pargent, W., Zachau, H.G., 1993. The immunoglobulin kappa locus: polymorphism and haplotypes of Caucasoid and non-Caucasoid individuals. *Hum. Genet.* 91 (3), 261–267.
- Shlomchik, M.J., Marshak-Rothstein, A., Wolfowicz, C.B., Rothstein, T.L., Weigert, M.G., 1987. The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* 328 (6133), 805–811.
- Tanaka, T., Nei, M., 1989. Positive darwinian selection observed at the variable-region genes of immunoglobulins. *Mol. Biol. E* 6 (5), 447–459.
- Tomlinson, I.M., Walter, G., Jones, P.T., Dear, P.H., Sonnhammer, E.L., Winter, G., 1996. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J. Mol. Biol.* 256 (5), 813–817.
- Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M.B., Winter, G., 1992. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* 227 (3), 776–798.
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302 (5909), 575–581.
- van der Maarel, S., van Dijk, K.W., Alexander, C.M., Sasso, E.H., Bull, A., Milner, E.C., 1993. Chromosomal organization of the human VH4 gene family. Location of individual gene segments. *J. Immunol.* 150 (7), 2858–2868.
- van Dijk, K.W., Sasso, E.H., Milner, E.C., 1991. Polymorphism of the human Ig VH4 gene family. *J. Immunol.* 146 (10), 3646–3651.
- Van Dijk-Hard, I., Lundkvist, I., 2002. Long-term kinetics of adult human antibody repertoires. *Immunology* 107 (1), 136–144.
- van Es, J.H., Heutink, M., Aanstoot, H., Logtenberg, T., 1992. Sequence analysis of members of the human Ig VH4 gene family derived from a single VH locus. Identification of novel germ-line members. *J. Immunol.* 149 (2), 492–497.
- Vargas-Madrado, E., Lara-Ochoa, F., Almagro, J.C., 1995. Canonical structure repertoire of the antigen-binding site of immunoglobulins suggests strong geometrical restrictions associated to the mechanism of immune recognition. *J. Mol. Biol.* 254 (3), 497–504.
- Vargas-Madrado, E., Lara-Ochoa, F., Jimenez-Montano, M., 1994. A skewed distribution of amino acids at recognition sites of the hypervariable region of immunoglobulins. *J. Mol. E* 38 (1), 100–104.
- Vargas-Madrado, E., Lara-Ochoa, F., Ramirez-Benites, M.C., Almagro, J.C., 1997. Evolution of the structural repertoire of the human V(H) and Vkappa germline genes. *Int. Immunol.* 9 (12), 1801–1815.
- Vargas-Madrado, E., Paz-Garcia, E., 2003. An improved model of association for VH-VL immunoglobulin domains: asymmetries between VH and VL in the packing of some interface residues. *J. Mol. Recognit.* 16 (3), 113–120.
- Vargas-Madrado, E., Paz-Garcia, E., 2001. Interpreting Gene Usage of immunoglobulins: Structural Classification of the Genes of Immunoglobulins According to Their Recognition Properties. *EFIS 2000 International Proceedings Division*. pp. 81–90.
- Viale, A.C., Coutinho, A., Freitas, A.A., 1992. Differential expression of VH gene families in peripheral B cell repertoires of newborn or adult immunoglobulin H chain congenic mice. *J. Exp. Med.* 175 (6), 1449–1456.
- Voswinkel, J., Pfreundschuh, M., Gause, A., 1997. Evidence for a selected humoral immune response encoded by VH4 family genes in the synovial membrane of a patient with RA. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815, 312–315.
- Wang, X., Stollar, B.D., 1999. Immunoglobulin VH gene expression in human aging. *Clin. Immunol.* 93 (2), 132–142.
- Weng, N.P., Snyder, J.G., Yu-Lee, L.Y., Marcus, D.M., 1992. Polymorphism of human immunoglobulin VH4 germ-line genes. *Eur. J. Immunol.* 22 (4), 1075–1082.
- Willems van Dijk, K., Milner, L.A., Sasso, E.H., Milner, E.C., 1992. Chromosomal organization of the heavy chain variable region gene

- segments comprising the human fetal antibody repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (21), 10430–10434.
- Winkler, T.H., Fehr, H., Kalden, J.R., 1992. Analysis of immunoglobulin variable region genes from human IgG anti-DNA hybridomas. *Eur. J. Immunol.* 22 (7), 1719–1728.
- Xu, J.L., Davis, M.M., 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13 (1), 37–45.
- Yazici, Z.A., Behrendt, M., Goodfield, M., Partridge, L.J., Lindsey, N.J., 1998. Does the CDR3 of the heavy chain determine the specificity of autoantibodies in systemic lupus erythematosus? *J. Autoimmun.* 11 (5), 477–483.
- Zinkernagel, R.M., 2002. Uncertainties—discrepancies in immunology. *Immunol. Rev.* 185, 103–125.
- Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C., 1977. The concept that surveillance of self is mediated via the same set of genes that determines recognition of allogenic cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 41 (Pt. 2), 505–510.
- Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., 2001. Regulation of the immune response by antigen. *Science* 293 (5528), 251–253.
- Zouali, M., 1995. B-cell superantigens: implications for selection of the human antibody repertoire. *Immunol. Today* 16 (8), 399–405.

**Artículo en arbitraje en J. Mol. Evol.**  
**A2: SUBSTITUTION PATTERNS IN ALLELES OF  
IMMUNOGLOBULIN V GENES IN HUMANS AND  
MICE**

*Tania Romo-González and Enrique Vargas-Madrado*

Instituto de Investigaciones Biológicas,  
Universidad Veracruzana,  
Xalapa, Veracruz, México.

**Total number of pages:** 33 (including four Figures and four Tables).

**Running title:** Substitution Patterns of V genes in humans and mice

**Reprint request to:** Tania Romo-González

Mail: 2a Schubert No. 4 Indeco Animas, Xalapa, Ver., México. C.P. 91190

E-mail: romisnaider@yahoo.com.mx

Phone: +52 (228) 8125757

Fax: +52 (228) 8 125757

**Key Words:** patterns of nucleotide substitutions, protein evolution, immunoglobulins, V genes, immune recognition.

incluyen al entorno si no a la propia organización en ese instante. Es decir, si permanecemos en el simple nivel topológico de la noción de fenotipo se ve ciertamente que éste ha surgido de interacciones entre el genotipo (genos) y el entorno (oikos), pero no se ve su autonomía propia: esto constituye la relación  $\text{geno} \text{ ---- } \text{feno} \text{ ---- } \text{eco-organizadora}$  en 

--	--

 la que cada uno de los términos participa en la regeneración de los otros (Morin 1983). Por lo que: “el gen no resuelve el misterio de la diversidad (de la auto-organización), lo plantea en su complejidad” (Morin 1983).

## 6. CONCLUSIÓN

De forma general la eficacia del fenómeno de reconocimiento molecular inmune ha sido asociado con la diversificación germinal y/o somática de sus genes (Tauber y Podolsky 1997). Por ejemplo, se ha propuesto que los procesos genéticos que crean la diversidad en el repertorio de anticuerpos (Acs) teóricamente pueden generar  $10^{11}$  especificidades, incluyendo las especificidades potencialmente dañinas (Pinchuk y col. 1996). Sin embargo, a pesar de esta gran potencial de posibilidades, esta no es ni remotamente suficiente si la comparamos con la inmensidad del universo antigénico propio y extraño que además está en constante re-cambio. Más aún, de los estudios funcionales y estructurales se hace evidente que de ese repertorio potencial solo se utiliza una pequeña parte (Vargas-Madrazo y col. 1995; Wilson y Stanfield 1993; Schroeder y col. 1995; van Dijk-Hard y col. 1997) ¿y entonces cómo es que el sistema inmune de los vertebrados es capaz de contender tan eficazmente? ¿será el fenómeno del reconocimiento molecular inmune y por tanto su especificidad un problema de potencialidades genéticas?

Diversos autores han postulado que no es el número de especies sino la cualidad del material lo que permite el adecuado reconocimiento, es decir, su plasticidad o adaptabilidad evolutiva ante lo circunstante (Conrad 1977; Larralde 1980; Van Regenmortel 1989; Greenspan 2001; Denton y col. 2002; James y col. 2003; A4). Desde esta perspectiva, la contención del universo antigénico no requiere de un gran “pool” genético, ni de procesos de variación evolutiva extremadamente rápidos, sino de estrategias plásticas y puntuales que permitan reconocer mucho con poco (Conrad 1977, 1979, 1990). Por ejemplo, el alfabeto castellano consta de 29 letras con las que se pueden construir una variedad casi ilimitada de palabras, siendo a su vez muy pequeño el número de palabras que existen y se generan en comparación con este universo infinito. De igual forma, estas palabras a su vez cambian en cada contexto de significado tal como lo plantea Shanon: “la lengua es inagotable al estar incompleta... La polisemia... permite el uso de la misma palabra en contextos diferentes y dota así a la lengua de una imprescindible flexibilidad. En particular, las palabras existentes pueden ser empleadas en una gran variedad de contextos, incluyendo aquellos en los que nunca se han utilizado antes. Si las palabras no fueran intrínsecamente polisemias, la lengua no podría acomodarse dentro de una variedad ilimitada e imprevista de contextos. Sin la polisemia, cada contexto requeriría la invención de una nueva palabra, y el número de palabras llegaría a ser eventualmente inmanejable. Las palabras al ser contexto-dependientes, pueden compararse a las herramientas que en diversas ocasiones pueden ser utilizadas de diversas maneras, y de manera no específica antes de su ejecución” (Shanon 1993).

Lo mismo puede decirse de los anticuerpos (oraciones) y sus genes (palabras) no se requiere una gran cantidad de genes que codifique para una gran cantidad de moléculas de Acs, sino de un repertorio plástico capaz de interactuar con el mismo y con el ambiente

en un contexto dado (Jerne 1985; A4). El repertorio de Acs es como el vocabulario que está compuesto no por palabras sino por oraciones, las cuales son capaces de responder ante cualquier oración expresada por una multitud de Ags propios o extraños con los que el sistema inmune se puede encontrar (Jerne 1985). Dentro de esta comunicación por tanto es necesario que haya reglas gramaticales que aseguren que el armado de las oraciones sea coherente tanto fonética como semánticamente. Por lo que si la secuencia del gen contiene alguna información, no es información para crear o para generar un único artefacto como en la ensambladura de un Lego o la construcción de un reloj, sino más bien la información contenida es la de una guía que permite la interacción o comunicación con un entorno Platónico pre-existente a pre-figurado (Denton y col. 2002). Como en la famosa analogía de Aristóteles, donde él considera que hay un plan pre-existente en la construcción de una casa, el cual actúa como moldeador de los componentes materiales, los ladrillos y las piedras: "ahora el orden de las cosas en el proceso de formación es al revés de su verdadero y esencial orden ... los ladrillos y las piedras vienen cronológicamente antes de que venga la casa ... pero lógicamente la esencia verdadera de la forma de la cosa (el plan pre-existente de la casa o de la forma pre-existente) viene primero". Entonces lo que tenemos son formas plásticas almacenadas en los genes las cuales evolucionan bajo una gramática o pre-forma natural (Denton y col. 2002), formas que a su vez están en un constante diálogo o reconocimiento consigo mismo y con el ambiente: en un constante recambio del "Selfhood", en un constante proceso de auto-(geno-feno)-eco-organización (Morin 1983; Tauber y Podolsky 1997).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Almagro JC, Hernandez I, del Carmen Ramirez M, Vargas-Madrazo E. 1997. The differences between the structural repertoires of VH germ-line gene segments of mice and humans: implication for the molecular mechanism of the immune response. *Mol Immunol.* 34(16-17):1199-214
2. Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ. 1986. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science.* 233(4765):747-53
3. Amzel LM, Poljak RJ. 1979. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu Rev Biochem.* 48:961-97
4. Andersson E, Matsunaga T. 1995. Evolution of immunoglobulin heavy chain variable region genes: a VH family can last for 150-200 million years or longer. *Immunogenetics.* 41(1):18-28
5. Anfinsen CB. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 181:223-230
6. Afonin PV, Fokin AV, Tsygannik IN, Mikhailova IY, Onoprienko LV, Mikhaleva II, Ivanov VT, Mareeva TY, Nesmeyanov VA, Li N, Pangborn WA, Duax WL, Pletnev VZ. 2001. Crystal structure of an anti-interleukin-2 monoclonal antibody Fab complexed with an antigenic nonapeptide. *Protein Sci.* 10(8):1514-21
7. Banfield MJ, King DJ, Mountain A, Brady RL. 1997. VL:VH domain rotations in engineered antibodies: crystal structures of the Fab fragments from two murine antitumor antibodies and their engineered human constructs. *Proteins.* 29(2):161-71
8. Becker RS, Knight KL. 1990. Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell.* 63(5), 987-97
9. Behe MJ. 1996. Darwin's Black Box: The Biochemical Challenge to Evolution. The Free Press, New York
10. Berg OG, von Hippel PH. 1988. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* 13(6):207-11
11. Berman JE, Mellis SJ, Pollock R, Smith CL, Suh H, Heinke B, Kowal C, Surti U, Chess L, Cantor CR, et al. 1988. Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus. *EMBO J.* 7(3):727-38
12. Berman JE, Nickerson KG, Pollock RR, Barth JE, Schuurman RK, Knowles DM, Chess L, Alt FW. 1991. VH gene usage in humans: biased usage of the VH6 gene in immature B lymphoid cells. *Eur J Immunol.* 21(5):1311-4
13. Bhat TN, Bentley GA, Fischmann TO, Boulot G, Poljak RJ. 1990. Small rearrangements in structures of Fv and Fab fragments of antibody D1.3 on antigen binding. *Nature.* 347(6292):483-5
14. Blin N, Stafford DW. 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3(9):2303-8
15. Booker JK, Haughton G. 1994. Mechanisms that limit the diversity of antibodies. II. Evolutionary conservation of Ig variable region genes which encode naturally occurring autoantibodies. *Int Immunol.* 6(9):1427-36
16. Branden BC, Poljak RJ. 1995. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *The FASEB Journal.* 9:9-16
17. Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. 1995. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol.* 155(1):190-202
18. Boursier L, Su W, Spencer J. 2004. Analysis of strand biased 'G' hypermutation in human immunoglobulin V(lambda) gene segments suggests that both DNA strands are targets for deamination by activation-induced cytidine deaminase. *Mol Immunol.* 40(17):1273-8
19. Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy S, Levy R. 1992. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol Immunol.* 29(2):193-203
20. Celis E, Ridaura R, Larralde C. 1977. Effects of the extent of DNP substitution on the apparent affinity constant and cooperation between sites in the reactions of dinitrophenylated human serum albumin with anti-DNP and anti-HSA antibodies coupled to agarose. *Immunochemistry.* 14(7):553-9
21. Celis E, Larralde C. 1978. Regulation of the binding of antigen to receptors by soluble antibodies: in-vitro competition and synergism for dinitrophenylated human serum albumin and epsilon-DNP-lysine". *Immunochemistry.* 15(8):595-601
22. Chang B, Casali P. 1995. A sequence analysis of human germline Ig VH and VL genes. The CDR1s of a major proportion of VH, but not VL, genes display a high inherent susceptibility to amino acid replacement. *Ann NY Acad Sci.* 764:170-9
23. Chang CH, Short MT, Westholm FA, Stevens FJ, Wang BC, Furey W Jr, Solomon A, Schiffer M. 1985. Novel arrangement of immunoglobulin variable domains: X-ray crystallographic analysis of the lambda-chain dimer Bence-Jones protein Loc. *Biochemistry.* 24(18):4890-7
24. Chatellier J, Van Regenmortel MH, Vernet T, Altschuh D. 1996. Functional mapping of conserved residues located at the VL and VH domain interface of a Fab. *J Mol Biol.* 264(1):1-6
25. Chothia C, Novotny J, Bruccoleri R, Karplus M. 1985. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol Biol.* 186(3):651-63
26. Chothia C, Lesk AM, Levitt M, Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ. 1986. The predicted structure of immunoglobulin D1.3 and its comparison with the crystal structure. *Science.* 233(4765):755-8

27. Chothia C, Lesk AM. 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 196(4):901-17
28. Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, Air G, Sheriff S, Padlan EA, Davies D, Tulip WR, et al. 1989. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature.* 342(6252):877-83
29. Cohn M, Langman RE. 1996. The immune system: A look from a distance. *Front Biosci.* 1, d318-23
30. Colman PM. 1988. Structure of antibody-antigen complexes: implications for immune recognition. *Adv Immunol.* 43:99-132
31. Collis AV, Brouwer AP, Martin AC. 2003. Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J Mol Biol.* 325(2):337-54
32. Conrad M. 1977. Evolutionary adaptability of biological macromolecules. *J Mol Evol.* 10(1):87-91
33. Conrad M. 1979. Bootstrapping on the adaptive landscape. *Biosystems.* 11(2-3):167-82
34. Conrad M. 1990. The geometry of evolution. *Biosystems.* 24(1):61-81
35. Cook GP, Tomlinson IM, Walter G, Riethman H, Carter NP, Buluwela L, Winter G, Rabbitts TH. 1994. A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q. *Nat Genet.* 7(2):162-8
36. Cook GP, Tomlinson IM. 1995. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today.* 16(5):237-42
37. Cortazzo P, Cervenansky C, Marin M, Reiss C, Ehrlich R, Deana A. 2002. Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 293(1):537-41
38. Coutinho A. 1989. Beyond clonal selection and network. *Immunol Rev.* 110:63-87
39. Coutinho A. 2000. Germ-line selection ensures embryonic autoreactivity and a positive discrimination of self mediated by supraclonal mechanisms. *Semin Immunol.* 12(3):205-13
40. Cui X, Li H. 1997. Discriminating between allelic and interlocus differences among human immunoglobulin VH4 sequences by analyzing single spermatozoa. *Hum Genet.* 100(1):96-100
41. Cui X, Li H. 1998. Determination of gene organization in individual haplotypes by analyzing single DNA fragments from single spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(18):10791-6
42. Cui X, Li H. 2000. Human immunoglobulin VH4 sequences resolved by population-based analysis after enzymatic amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. *Eur J Immunogenet.* 27(1):37-46
43. Davidkova G, Pettersson S, Holmberg D, Lundkvist I. 1997. Selective usage of VH genes in adult human B lymphocyte repertoires. *Scand J Immunol.* 45(1):62-73
44. Davies DR, Padlan EA, Segal DM. 1975. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu Rev Biochem.* 44:639-67
45. Day ED. 1990. Advanced immunochemistry. Wiley-Liss. Segunda Edición. 107-138
46. Deana A, Ehrlich R, Reiss C. 1998. Silent mutations in the *Escherichia coli* ompA leader peptide region strongly affect transcription and translation in vivo. *Nucleic Acids Res.* 26(20):4778-82
47. Demaison C, David D, Letourneur F, Theze J, Saragosti S, Zouali M. 1995. Analysis of human VH gene repertoire expression in peripheral CD19+ B cells. *Immunogenetics.* 42(5):342-52
48. Denton MJ, Marshall CJ, Legge M. 2002. The protein folds as platonic forms: new support for the pre-Darwinian conception of evolution by natural law. *J Theor Biol.* 219(3):325-42
49. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16:6127-6145
50. Edelman GM, Gall WE. 1969. The antibody problem. *Annu Rev Biochem.* 38:415-66
51. Edmundson AB, Ely KR, Girling RL, Abola EE, Schiffer M, Westholm FA, Fausch MD, Deutsch HF. 1974. Binding of 2,4-dinitrophenyl compounds and other small molecules to a crystalline lambda-type Bence-Jones dimer. *Biochemistry.* 13(18):3816-27
52. Edmundson AB, Ely KR, Herron JN. 1984. A search for site-filling ligands in the Mcg Bence-Jones dimer: crystal binding studies of fluorescent compounds. *Mol Immunol.* 21(7):561-76
53. Edmundson AB, Ely KR. 1985. The Mcg light chain: multiple conformations derived from a single amino acid sequence. *Ann Inst Pasteur Immunol.* 136C(2):276-82
54. Edmundson AB, Ely KR, Herron JN, Cheson BD. 1987. The binding of opioid peptides to the Mcg light chain dimer: flexible keys and adjustable locks. *Mol Immunol.* 24(9):915-35
55. Efimov AV. 1984. A novel super-secondary structure of proteins and the relation between the structure and the amino acid sequence. *FEBS Letters.* 166(1):33-38
56. Eigen M. 1971. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften.* 58(10):465-523
57. Eigen M, Winkler-Oswatitsch R, Dress A. 1988. Statistical geometry in sequence space: a method of quantitative comparative sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(16):5913-7
58. Fanning L, Bertrand FE, Steinberg C, Wu GE. 1998. Molecular mechanisms involved in receptor editing at the Ig heavy chain locus. *Int Immunol.* 10(2):241-6
59. Feeney AJ. 1992. Comparison of junctional diversity in the neonatal and adult immunoglobulin repertoires. *Int Rev Immunol.* 8(2-3):113-22
60. Foote J, Winter G. 1992. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol.* 224(2):487-99

61. Freitas AA, Vialc AC, Sundblad A, Hcusser C, Coutinho A. 1991. Normal serum immunoglobulins participate in the selection of peripheral B-cell repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(13):5640-4
62. Go M, Miyazawa S. 1980. Relationship between mutability, polarity and exteriority of amino acid residues in protein evolution. *Int J Pept Protein Res.* 15(3):211-24
63. Gojobori T, Ishii K, Nei M. 1982. Estimation of average number of nucleotide substitutions when the rate of substitution varies with nucleotide. *J Mol Evol.* 18(6):414-23
64. Gorman SD, Clark MR, Routledge EG, Cobbold SP, Waldmann H. 1991. Reshaping a therapeutic CD4 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(10):4181-5
65. Grantham R. 1974. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science.* 185(4154):862-4
66. Greenspan NS. 2001. Affinity, complementarity, cooperativity, and specificity in antibody recognition. *Curr Top Microbiol Immunol.* 260: 65-85
67. Guigou V, Cuisinier AM, Tonnelle C, Moinier D, Fougereau M, Fumoux F. 1990. Human immunoglobulin VH and VK repertoire revealed by in situ hybridization. *Mol Immunol.* 27(9):935-40
68. Haino M, Hayashida H, Miyata T, Shin EK, Matsuda F, Nagaoka H, Matsumura R, Taka-ishi S, Fukita Y, Fujikura J, et al. 1994. Comparison and evolution of human immunoglobulin VH segments located in the 3' 0.8-megabase region. Evidence for unidirectional transfer of segmental gene sequences. *J Biol Chem.* 269(4):2619-26
69. Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A. 1999. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet.* 22(3):239-47
70. Hande S, Manser T. 1997. Single amino acid substitutions in V(H) CDR2 are sufficient to generate or enhance the specificity of two forms of an anti-arsenate antibody variable region for DNA. *Mol Immunol.* 34(18):1281-90
71. Herron JN, He XM, Ballard DW, Blier PR, Pace PE, Bothwell AL, Voss EW Jr, Edmundson AB. 1991. An autoantibody to single-stranded DNA: comparison of the three-dimensional structures of the unliganded Fab and a deoxynucleotide-Fab complex. *Proteins.* 11(3):159-75
72. Holmquist R, Pearl D. 1980. Theoretical foundations for quantitative paleogenetics. Part III: The molecular divergence of nucleic acids and proteins for the case of genetic events of unequal probability. *J Mol Evol.* 16(3-4):211-67
73. Honig B. 1999. Protein folding: from the Levinthal paradox to structure prediction. *J Mol Biol.* 293(2):283-93
74. Huang C, Stewart AK, Schwartz RS, Stollar BD. 1992. Immunoglobulin heavy chain gene expression in peripheral blood B lymphocytes. *J Clin Invest.* 89(4):1331-43
75. Huang C, Stollar BD. 1993. A majority of Ig H chain cDNA of normal human adult blood lymphocytes resembles cDNA for fetal Ig and natural autoantibodies. *J Immunol.* 151(10):5290-300
76. Humphreys DP, Sehdev M, Chapman AP, Ganesh R, Smith BJ, King LM, Glover DJ, Reeks DG, Stephens PE. 2000. High-level periplasmic expression in *Escherichia coli* using a eukaryotic signal peptide: importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence. *Protein Expr Purif.* 20(2):252-64
77. James LC, Roversi P, Tawfik DS. 2003. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science.* 299(5611):1362-7
78. Janeway CA and Travers P. 1997. Immunobiology. 3rd ed. London: Current Biology Limited/Garland Publishing Inc
79. Jerne NK. 1985. The generative grammar of the immune system. *Science.* 229(4718):1057-9
80. Johnson G, Wu TT. 1998. Preferred CDRH3 lengths for antibodies with defined specificities. *Int Immunol.* 10(12):1801-5
81. Jolly CJ, Wagner SD, Rada C, Klix N, Milstein C, Neuberger MS. 1996. The targeting of somatic hypermutation. *Semin Immunol.* 8(3):159-68
82. Jukes TH, Cantor CR.. 1969. Evolution of protein molecules. In H. N. Munro, ed., *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York
83. Jukes TH, King JL. 1979. Evolutionary nucleotide replacements in DNA. *Nature.* 281(5732):605-6
84. Kabat EA, Wu TT, Bilofsky H. 1977. Unusual distributions of amino acids in complementarity-determining (hypervariable) segments of heavy and light chains of immunoglobulins and their possible roles in specificity of antibody-combining sites. *J Biol Chem.* 252(19):6609-16
85. Kabat EA. 1978. The structural basis of antibody complementarity. *Adv Protein Chem.* 32:1-75
86. Kabat EA, Wu TT. 1991. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol.* 147(5):1709-19
87. Kaplan N, Risko K. 1982. A method for estimating rates of nucleotide substitution using DNA sequence data. *Theor Popul Biol.* 21(3):318-28
88. Kataoka T, Nikaïdo T, Miyata T, Moriwaki K, Honjo T. 1982. The nucleotide sequences of rearranged and germline immunoglobulin VH genes of a mouse myeloma MC101 and evolution of VH genes in mouse. *J Biol Chem.* 257(1):277-85
89. Kearney JF, Vakil M, Solvason N. 1989. The role of idiotypic interactions and B-cell subsets in development of the B-cell repertoire. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 54 Pt 1:203-7
90. Khalifa MB, Weidenhaupt M, Choulier L, Chatellier J, Rauffer-Bruyere N, Altschuh D, Vernet T. 2000. Effects on interaction kinetics of mutations at the VH-VL interface of Fabs depend on the structural context. *J Mol Recognit.* 13(3):127-39

91. Kimura M, Ota T. 1972. On the stochastic model for estimation of mutational distance between homologous proteins. *J Mol Evol.* 2(1):87-90
92. Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16(2):111-20
93. Kimura M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(1):454-8
94. Kirkham PM, Mortari F, Newton JA, Schroeder HW Jr. 1992. Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding. *EMBO J.* 11(2):603-9
95. Kirkham PM, Schroeder HW Jr. 1994. Antibody structure and the evolution of immunoglobulin V gene segments. *Semin Immunol.* 6(6):347-60
96. Klein J. 1986. Natural History of the Major Histocompatibility Complex. Wiley, New York.
97. Klein J, Satta Y, O'hUigin C, Takahata N. 1993. The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol.* 11:269-95
98. Klein U, Kuppers R, Rajewsky K. 1994. Variable region gene analysis of B cell subsets derived from a 4-year-old child: somatically mutated memory B cells accumulate in the peripheral blood already at young age. *J Exp Med.* 180(4):1383-93
99. Kodaira M, Kinashi T, Umemura I, Matsuda F, Noma T, Ono Y, Honjo T. 1986. Organization and evolution of variable region genes of the human immunoglobulin heavy chain. *J Mol Biol.* 190(4):529-41
100. Kraj P. 1995. Repertoire of rearranged immunoglobulin genes of human peripheral lymphocytes. *Postepy Hig Med Dosw.* 49(1):9-22
101. Kruglyak L. 1997. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet.* 17(1):21-4
102. Kuznetsov I, Morozov P. 1996. GEOMETRY: a software package for nucleotide sequence analysis using statistical geometry in sequence space. *Comput Appl Biosci.* 12(4):297-301
103. Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchere E, Coutinho A, Kazatchkine MD. 1998. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods.* 216(1-2):117-37
104. Lanave C, Preparata G, Saccone C, Serio G. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J Mol Evol.* 20(1):86-93
105. Lara-Ochoa F, Vargas-Madrado E, Almagro JC. 1995. Distributions of the use frequencies of amino acids in the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Evol.* 41(1):98-103
106. Larralde C. 1980. Molecules, Cells and Parasites in Immunology. Academic Press
107. Lee KH, Matsuda F, Kinashi T, Kodaira M, Honjo T. 1987. A novel family of variable region genes of the human immunoglobulin heavy chain. *J Mol Biol.* 195(4):761-8
108. Lefranc, MP and Lefranc, G. 2001. The Immunoglobulin FactsBook, Academic Press, 458 pages
109. Lefranc MP. 2003. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 31(1):307-10
110. Lefranc MP. 2004. IMGT-ONTOLOGY and IMGT databases, tools and Web resources for immunogenetics and immunoinformatics. *Mol Immunol.* 40(10):647-60
111. Li H, Cui X, Pramanik S, Chinge NO. 2002. Genetic diversity of the human immunoglobulin heavy chain VH region. *Immunol Rev.* 190, 53-68
112. Li W-H. 1997. Molecular Evolution. Sinauer Associates Inc
113. Lim WA, Sauer RT. 1989. Alternative packing arrangements in the hydrophobic core of lambda repressor. *Nature.* 339(6219):31-6
114. Litman GW, Anderson MK, Rast JP. 1999. Evolution of antigen binding receptors. *Annu Rev Immunol.* 17:109-47
115. López-Bueno JA, Moya A. 1992. GEOSEQ: a Pascal program to calculate statistical geometry parameters of aligned nucleic acid sequences. *Comput Appl Biosci.* 8(4):385-8
116. MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. 1996. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol.* 262(5):732-45
117. Malanchere E, Marcos MA, Nobrega A, Coutinho A. 1995. Studies on the T cell dependence of natural IgM and IgG antibody repertoires in adult mice. *Eur J Immunol.* 25(5):1358-65
118. Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR. 1989. Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:9268-9272
119. Martin AC, Thornton JM. 1996. Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application to antibodies. *J Mol Biol.* 263(5):800-15
120. Matsuda F, Honjo T. 1996. Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Adv Immunol.* 62:1-29
121. Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T. 1998. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med.* 188(11):2151-62
122. Max EE. 1998. Immunoglobulins: Molecular Genetics. In: Paul We (ed) Fundamental immunology, 4<sup>th</sup> edn. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 111-182
123. Mazumdar, PMH. 1995. Species and Specificity. An Interpretation of History of Immunology. Cambridge University Press, pp 3-382
124. McCormack WT, Thompson CB. 1990. Chicken IgL variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5' to 3' polarity. *Genes Dev.* 4(4):548-58

125. McCormack WT, Tjoelker LW, Thompson CB. 1991. Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Annu Rev Immunol.* 9, 219-41
126. Mian IS, Bradwell AR, Olson AJ. 1991. Structure, function and properties of antibody binding sites. *J Mol Biol.* 217(1):133-51
127. Milner EC, Hufnagle WO, Glas AM, Suzuki I, Alexander C. 1995. Polymorphism and utilization of human VH Genes. *Ann NY Acad Sci.* 764:50-61
128. Milstein C, Neuberger MS, Staden R. 1998. Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(15):8791-4
129. Miura Y, Chu CC, Dines DM, Asnis SE, Furie RA, Chiorazzi N. 2003. Diversification of the Ig variable region gene repertoire of synovial B lymphocytes by nucleotide insertion and deletion. *Mol Med.* 9(5-8):166-74
130. Morea V, Tramontano A, Rustici M, Chothia C, Lesk AM. 1998. Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 275(2):269-94
131. Morin E. 1983. El Metodo 2. La Vida De La Vida. 2ª Ed., Ediciones Catedra, S.A.
132. Mouthon L, Nobrega A, Nicolas N, Kaveri SV, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. 1995. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(9):3839-43
133. Nieselt-Struwe K. 1997. Graphs in sequence spaces: a review of statistical geometry. *Biophys Chem.* 66(2-3):111-31.
134. Nobrega A, Haury M, Gueret R, Coutinho A, Weksler ME. 1996. The age-associated increase in autoreactive immunoglobulins reflects a quantitative increase in specificities detectable at lower concentrations in young mice. *Scand J Immunol.* 44(5):437-43
135. Nobrega A, Grandien A, Haury M, Hecker L, Malanchere E, Coutinho A. 1998. Functional diversity and clonal frequencies of reactivity in the available antibody repertoire. *Eur J Immunol.* 28(4):1204-15
136. Olee T, Yang PM, Siminovitch KA, Olsen NJ, Hillson J, Wu J, Kozin F, Carson DA, Chen PP. 1991. Molecular basis of an autoantibody-associated restriction fragment length polymorphism that confers susceptibility to autoimmune diseases. *J Clin Invest.* 88(1):193-203
137. Oresic M, Shalloway D. 1998. Specific correlations between relative synonymous codon usage and protein secondary structure. *J Mol Biol.* 281(1):31-48
138. Ota T, Nei M. 1994. Divergent evolution and evolution by the birth-and-death process in the immunoglobulin VH gene family. *Mol Biol Evol.* 11(3):469-82
139. Ota T, Nei M. 1995. Evolution of immunoglobulin VH pseudogenes in chickens. *Mol Biol Evol.* 12(1):94-102
140. Ota T, Sitnikova T, Nei M. 2000. Evolution of vertebrate immunoglobulin variable gene segments. *Curr Top Microbiol Immunol.* 248:221-45
141. Padlan EA. 1990. On the nature of antibody combining sites: unusual structural features that may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands. *Proteins.* 7(2):112-24
142. Padlan EA. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol.* 31(3):169-217
143. Padlan EA, Abergel C, Tipper JP. 1995. Identification of specificity-determining residues in antibodies. *FASEB J.* 9(1):133-9
144. Pallares N, Lefebvre S, Contet V, Matsuda F, Lefranc MP. 1999. The human immunoglobulin heavy variable genes. *Exp Clin Immunogenet.* 16(1):36-60
145. Papavasiliou FN, Schatz DG. 2000. Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature.* 408(6809):216-21
146. Pargent W, Schable KF, Zachau HG. 1991. Polymorphisms and haplotypes in the human immunoglobulin kappa locus. *Eur J Immunol.* 21(8):1829-35
147. Pascual V, Capra JD. 1991. Human immunoglobulin heavy-chain variable region genes: organization, polymorphism, and expression. *Adv Immunol.* 49:1-74
148. Pauling L. 1945. Karl Landsteiner, M.D. Dover Publications, Inc. New York
149. Pavlov YI, Rogozin IB, Galkin AP, Aksenova AY, Hanaoka F, Rada C, Kunkel TA. 2002. Correlation of somatic hypermutation specificity and A-T base pair substitution errors by DNA polymerase eta during copying of a mouse immunoglobulin kappa light chain transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(15):9954-9. Epub 2002
150. Perlmutter RM, Berson B, Griffin JA, Hood L. 1985. Diversity in the germline antibody repertoire. Molecular evolution of the T15 VN gene family. *J Exp Med.* 162(6):1998-2016
151. Pinchuk GV, Alexander CM, Glas AM, Armitage RJ, Milner EC. 1996. VH repertoire in human B lymphocytes stimulated by CD40 ligand and IL-4: evidence for positive and negative selection mechanisms coupled to CD40 activation. *Mol Immunol.* 33(17-18):1369-76
152. Poljak RJ, Amzel LM, Avey HP, Chen BL, Phizackerley RP, Saul F. 1973. Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2.8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70(12):3305-10
153. Pramanik S, Li H. 2002. Direct detection of insertion/deletion polymorphisms in an autosomal region by analyzing high-density markers in individual spermatozoa. *Am J Hum Genet.* 71(6):1342-52. Epub Nov 19
154. Raaphorst FM, Langlois van den Bergh R, Waaijer JL, Vossen JM, van Tol MJ. 1997. Expression of the human immunoglobulin heavy chain VH6 gene element by fetal B lymphocytes. *Scand J Immunol.* 46(3):292-7

155. Ramírez-Benítez MC, Almagro JC. 2001. Analysis of antibodies of known structure suggests a lack of correspondence between the residues in contact with the antigen and those modified by somatic hypermutation. *Proteins*. 45(3):199-206
156. Retter MW, Nemazee D. 1998. Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J Exp Med*. 188(7):1231-8
157. Reynaud CA, Anquez V, Grimal H, Weill JC. 1987. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell*. 48(3):379-88
158. Rini JM, Schulze-Gahmen U, Wilson IA. 1992. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science*. 255(5047):959-65
159. Roe M, Norderhaug IN, Brandtzaeg P, Johansen FE. 1999. Fine specificity of ligand-binding domain I in the polymeric Ig receptor: importance of the CDR2-containing region for IgM interaction. *J Immunol*. 162(10):6046-52
160. Rogozin IB, Diaz M. 2004. Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol*. 172(6):3382-4
161. Romo-González T, Vargas-Madrado E. 2004. Structural Analysis of Substitution Patterns in Alleles of Human Immunoglobulin VH Genes. *Molecular Immunology*. In Press
162. Romo-González T, Vargas-Madrado E. 2004b. Substitution Patterns in Alleles of Immunoglobulin V Genes in Humans and Mice. *J Mol Evol*. Submitted
163. Romo-González T, Vargas-Madrado E, Larraalde C. 2004. The Immunological Specificity: History, Settings, Metaphors And Phantoms. *Configurations*. Submitted
164. Romo-González T, Rodríguez-Dorantes M, Morales-Montor J, Vargas-Madrado E. 2004c. Novel Substitution Polymorphisms of Human Immunoglobulin VH Genes in Mexican Indigenous and Mestizos. *Genes and Immunity*. Submitted
165. Rothenfluh HS, Steele EJ. 1993. Origin and maintenance of germ-line V genes. *Immunol Cell Biol*. 71 ( Pt 3):227-32
166. Rothenfluh HS, Blanden RV, Steele EJ. 1995. Evolution of V genes: DNA sequence structure of functional germline genes and pseudogenes. *Immunogenetics*. 42(3):159-71
167. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(12):5463-7
168. Sanz I. 1991. Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol*. 147(5):1720-9
169. Sasso EH, Van Dijk KW, Milner EC. 1990. Prevalence and polymorphism of human VH3 genes. *J Immunol*. 145(8):2751-7
170. Sasso EH, Willems van Dijk K, Bull AP, Milner EC. 1993. A fetally expressed immunoglobulin VH1 gene belongs to a complex set of alleles. *J Clin Invest*. 91(6):2358-67
171. Sasso EH, Buckner JH, Suzuki LA. 1995. Ethnic differences of polymorphism of an immunoglobulin VH3 gene. *J Clin Invest*. 96(3):1591-600
172. Saul FA, Poljak RJ. 1993. Structural patterns at residue positions 9, 18, 67 and 82 in the VH framework regions of human and murine immunoglobulins. *J Mol Biol*. 230(1):15-20
173. Schaible G, Rappold GA, Pargent W, Zachau HG. 1993. The immunoglobulin kappa locus: polymorphism and haplotypes of Caucasoid and non-Caucasoid individuals. *Hum Genet*. 91(3):261-7
174. Shanon B. 1993. *The Representational and the Presentational: An Essay on Cognition and the Study of Mind*. Harvester-Wheatssheaf, London.
175. Shirai H, Kidera A, Nakamura H. 1996. Structural classification of CDR-H3 in antibodies. *FEBS Lett*. 399(1-2):1-8
176. Shirai H, Nakajima N, Higo J, Kidera A, Nakamura H. 1998. Conformational sampling of CDR-H3 in antibodies by multicanonical molecular dynamics simulation. *J Mol Biol*. 278(2):481-96
177. Schneider BS, Maimon J, Friedman J. 1986. Expression of a cholecystokinin precursor-related peptide in vertebrate and invertebrate tissues. *Am J Physiol*. 251(6 Pt 1):E707-14
178. Schroeder HW Jr, Mortari F, Shiokawa S, Kirkham PM, Elgavish RA, Bertrand FE 3rd. 1995. Developmental regulation of the human antibody repertoire. *Ann N Y Acad Sci*. 764:242-60
179. Schroeder HW Jr, Zhang L, Philips JB 3rd. 2001. Slow, programmed maturation of the immunoglobulin HCDR3 repertoire during the third trimester of fetal life. *Blood*. 98(9):2745-51
180. Shen A, Humphries C, Tucker P, Blattner F. 1987. Human heavy-chain variable region gene family nonrandomly rearranged in familial chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(23):8563-7
181. Sheriff S, Silverton EW, Padlan EA, Cohen GH, Smith-Gill SJ, Finzel BC, Davies DR. 1987. Three-dimensional structure of an antibody-antigen complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(22):8075-9
182. Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A, Wolfowicz CB, Rothstein TL, Weigert MG. 1987. The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature*. 328(6133):805-11
183. Sibanda BL, Thornton JM. 1985. Beta-hairpin families in globular proteins. *Nature*. 316:170-174
184. Sitnikova T, Nei M. 1998. Evolution of immunoglobulin kappa chain variable region genes in vertebrates. *Mol Biol Evol*. 15(1):50-60
185. Stanfield RL, Takimoto-Kaminura M, Rini JM, Profy AT, Wilson IA. 1993. Major antigen-induced domain rearrangements in an antibody. *Structure*. 1(2):83-93

186. Steele EJ, Lindley RA, Blanden RV. 1998. Lamarck's Signature: How Retrogenes Are Changing Darwin's Natural Selection Paradigm. Perseus Books
187. Stewart AK, Huang C, Stollar BD, Schwartz RS. 1993. High-frequency representation of a single VH gene in the expressed human B cell repertoire. *J Exp Med.* 177(2):409-18
188. Stiernholm NB, Berinstein NL. 1994. Immunoglobulin somatic variation; studies of receptor editing in a human B cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 12(5-6):333-41
189. Suzuki I, Pfister L, Glas A, Nottenburg C, Milner EC. 1995. Representation of rearranged VH gene segments in the human adult antibody repertoire. *J Immunol.* 154(8):3902-11
190. Tajima F, Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol Evol.* 1(3):269-85
191. Tanaka T, Nei M. 1989. Positive darwinian selection observed at the variable-region genes of immunoglobulins. *Mol Biol Evol.* 6(5):447-59
192. Tauber AI, Podolsky SH. 1997. The Generation of Diversity. Clonal Selection Theory and the Rise of Molecular Immunology. Harvard University Press
193. Thomas-Vaslin V, Andrade L, Freitas A, Coutinho A. 1991. Clonal persistence of B lymphocytes in normal mice is determined by variable region-dependent selection. *Eur J Immunol.* 21(9):2239-46
194. Thompson CB, Neiman PE. 1987. Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell.* 48(3):369-78
195. Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G. 1992. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J Mol Biol.* 227(3):776-98
196. Tomlinson IM, Walter G, Jones PT, Dear PH, Sonnhammer EL, Winter G. 1996. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J Mol Biol.* 256(5):813-17
197. Tonegawa S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 302(5909), 575-81
198. van Dijk KW, Sasso EH, Milner EC. 1991. Polymorphism of the human Ig VH4 gene family. *J Immunol.* 146(10):3646-51
199. van Dijk-Hard I, Soderstrom I, Feld S, Holmberg D, Lundkvist I. 1997. c-related impaired affinity maturation and differential D-JH gene usage in human VH6-expressing B lymphocytes from healthy individuals. *Eur J Immunol.* 27(6):1381-6
200. van Dijk-Hard I, Lundkvist I. 2002. Long-term kinetics of adult human antibody repertoires. *Immunology.* 107(1):136-44
201. van Es JH, Heutink M, Aanstoot H, Logtenberg T. 1992. Sequence analysis of members of the human Ig VH4 gene family derived from a single VH locus. Identification of novel germ-line members. *J Immunol.* 149(2):492-7
202. van Regenmortel MH. 1989. Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity. *Immunol Today.* 10(8):266-72
203. Varela FJ, Coutinho A. 1991. Second generation immune networks. *Immunol Today.* 12(5):159-66
204. Vargas-Madrado E, Lara-Ochoa F, Jimenez-Montano M. 1994. A skewed distribution of amino acids at recognition sites of the hypervariable region of immunoglobulins. *J Mol Evol.* 38(1):100-4
205. Vargas-Madrado E, Lara-Ochoa F, Almagro JC. 1995. Canonical structure repertoire of the antigen-binding site of immunoglobulins suggests strong geometrical restrictions associated to the mechanism of immune recognition. *J Mol Biol.* 254(3):497-504
206. Vargas-Madrado E, Lara-Ochoa F, Ramirez-Benites MC, Almagro JC. 1997. Evolution of the structural repertoire of the human V(H) and V kappa germline genes. *Int Immunol.* 9(12):1801-15
207. Vargas-Madrado E, Paz-Garcia E. 2001. Interpreting Gene Usage of immunoglobulins: Structural Classification of the Genes of Immunoglobulins According to Their Recognition Properties. EFIS 2000 International Proceedings Division. 81-90
208. Vargas-Madrado E, Paz-Garcia E. 2003. An improved model of association for VH-VL immunoglobulin domains: asymmetries between VH and VL in the packing of some interface residues. *J Mol Recognit.* 16(3):113-20
209. Viale AC, Coutinho A, Freitas AA. 1992. Differential expression of VH gene families in peripheral B cell repertoires of newborn or adult immunoglobulin H chain congenic mice. *J Exp Med.* 175(6):1449-56
210. Viale AC, Coutinho A, Heyman RA, Freitas AA. 1993. V region dependent selection of persistent resting peripheral B cells in normal mice. *Int Immunol.* 5(6):599-605
211. Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. *Nature.* 341(6242):544-6
212. Weill JC, Reynaud CA. 1996. Rearrangement/hypermutation/gene conversion: when, where and why? *Immunol Today.* 17(2):92-7
213. Weng NP, Snyder JG, Yu-Lee LY, Marcus DM. 1992. Polymorphism of human immunoglobulin VH4 germ-line genes. *Eur J Immunol.* 22(4):1075-82
214. Wiens GD, Roberts VA, Whitcomb EA, O'Hare T, Stenzel-Poore MP, Rittenberg MB. 1998. Harmful somatic mutations: lessons from the dark side. *Immunol Rev.* 162:197-209
215. Wilson AC, Carlson SS, White TJ. 1977. Biochemical evolution. *Annu-Rev Biochem.* 46:573-639
216. Wilson IA, Stanfield RL. 1993. Antibody-antigen interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 3:113-118

217. Wilson PC, de Boutciller O, Liu YJ, Potter K, Banchereau J, Capra JD, Pascual V. 1998. Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med.* 187(1):59-70
218. Wu TT, Kabat EA. 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med.* 132(2):211-50
219. Wu TT, Johnson G, Kabat EA. 1993. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins.* 16(1):1-7
220. Xu JL, Davis MM. 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity.* 13(1):37-45
221. Yazici ZA, Behrendt M, Goodfield M, Partridge LJ, Lindsey NJ. 1998. Does the CDR3 of the heavy chain determine the specificity of autoantibodies in systemic lupus erythematosus? *J Autoimmun.* 11(5):477-83
222. Zemlin M, Schelonka RL, Bauer K, Schroeder HW Jr. 2002. Regulation and chance in the ontogeny of B and T cell antigen receptor repertoires. *Immunol Res.* 26(1-3):265-78
223. Zemlin M, Klinger M, Link J, Zemlin C, Bauer K, Engler JA, Schroeder HW Jr, Kirkham PM. 2003. Expressed murine and human CDR-H3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures. *J Mol Biol.* 334(4):733-49
224. Zinkernagel RM, Doherty PC. 1977. The concept that surveillance of self is mediated via the same set of genes that determines recognition of allogenic cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 41 Pt 2:505-10
225. Zinkernagel RM, Hengartner H. 2001. Regulation of the immune response by antigen. *Science.* 293(5528):251-3
226. Zinkernagel RM. 2002. Uncertainties - discrepancies in immunology. *Immunol Rev.* 185:103-25
227. Zouali M, Theze J. 1991. Probing VH gene-family utilization in human peripheral B cells by in situ hybridization. *J Immunol.* 146(8):2855-64
228. Zouali M. 1995. B-cell superantigens: implications for selection of the human antibody repertoire. *Immunol Today.* 16(8):399-405
229. Zuckerkandl E. 1976. Evolutionary processes and evolutionary noise at the molecular level. I. Functional density in proteins. *J Mol Evol.* 7(3):167-83
230. Zuckerkandl E, Villet R. 1988. Concentration-affinity equivalence in gene regulation: convergence of genetic and environmental effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(13):4784-8
231. Zuckerkandl E. 1994. Molecular pathways to parallel evolution: I. Gene nexuses and their morphological correlates. *J Mol Evol.* 39(6):661-78
232. Zuckerkandl E. 1997. Neutral and nonneutral mutations: the creative mix—evolution of complexity in gene interaction systems. *J Mol Evol.* 44 Suppl 1:S2-8
233. Zuckerkandl E. 2001. Intrinsicly driven changes in gene interaction complexity. I. Growth of regulatory complexes and increase in number of genes. *J Mol Evol.* 53(4-5):539-54
234. Zuckerkandl E. 2002. Why so many noncoding nucleotides? The eukaryote genome as an epigenetic machine. *Genetica.* 115(1):105-29

## 8. ANEXOS

### 8.1. Artículos en colaboración

217. Wilson PC, de Boutciller O, Liu YJ, Potter K, Banchereau J, Capra JD, Pascual V. 1998. Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med.* 187(1):59-70
218. Wu TT, Kabat EA. 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med.* 132(2):211-50
219. Wu TT, Johnson G, Kabat EA. 1993. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins.* 16(1):1-7
220. Xu JL, Davis MM. 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity.* 13(1):37-45
221. Yazici ZA, Behrendt M, Goodfield M, Partridge LJ, Lindsey NJ. 1998. Does the CDR3 of the heavy chain determine the specificity of autoantibodies in systemic lupus erythematosus? *J Autoimmun.* 11(5):477-83
222. Zemlin M, Schelonka RL, Bauer K, Schroeder HW Jr. 2002. Regulation and chance in the ontogeny of B and T cell antigen receptor repertoires. *Immunol Res.* 26(1-3):265-78
223. Zemlin M, Klinger M, Link J, Zemlin C, Bauer K, Engler JA, Schroeder HW Jr, Kirkham PM. 2003. Expressed murine and human CDR-H3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures. *J Mol Biol.* 334(4):733-49
224. Zinkernagel RM, Doherty PC. 1977. The concept that surveillance of self is mediated via the same set of genes that determines recognition of allogenic cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 41 Pt 2:505-10
225. Zinkernagel RM, Hengartner H. 2001. Regulation of the immune response by antigen. *Science.* 293(5528):251-3
226. Zinkernagel RM. 2002. Uncertainties - discrepancies in immunology. *Immunol Rev.* 185:103-25
227. Zouali M, Theze J. 1991. Probing VH gene-family utilization in human peripheral B cells by in situ hybridization. *J Immunol.* 146(8):2855-64
228. Zouali M. 1995. B-cell superantigens: implications for selection of the human antibody repertoire. *Immunol Today.* 16(8):399-405
229. Zuckerkandl E. 1976. Evolutionary processes and evolutionary noise at the molecular level. I. Functional density in proteins. *J Mol Evol.* 7(3):167-83
230. Zuckerkandl E, Villet R. 1988. Concentration-affinity equivalence in gene regulation: convergence of genetic and environmental effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(13):4784-8
231. Zuckerkandl E. 1994. Molecular pathways to parallel evolution: I. Gene nexuses and their morphological correlates. *J Mol Evol.* 39(6):661-78
232. Zuckerkandl E. 1997. Neutral and nonneutral mutations: the creative mix—evolution of complexity in gene interaction systems. *J Mol Evol.* 44 Suppl 1:S2-8
233. Zuckerkandl E. 2001. Intrinsic driven changes in gene interaction complexity. I. Growth of regulatory complexes and increase in number of genes. *J Mol Evol.* 53(4-5):539-54
234. Zuckerkandl E. 2002. Why so many noncoding nucleotides? The eukaryote genome as an epigenetic machine. *Genetica.* 115(1):105-29

## 8. ANEXOS

### 8.1. Artículos en colaboración

## HOST GENDER IN PARASITIC INFECTIONS OF MAMMALS: AN EVALUATION OF THE FEMALE HOST SUPREMACY PARADIGM

J. Morales-Montor, A. Chavarría, M. A. De León, L. I. Del Castillo, E. G. Escobedo, E. N. Sánchez, J. A. Vargas, M. Hernández-Flores, T. Romo-González\*, and C. Larralde†

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, El Alto, México DF 04510, México. e-mail: larralde@servidor.unam.mx

**ABSTRACT:** A review of current literature on mammalian hosts' sexual dimorphism (SD) in parasitic infections revealed that (1) it is a scarcely and superficially studied biological phenomenon of considerable significance for individual health, behavior, and lifestyles and for the evolution of species; (2) there are many notable exceptions to the rule of a favorable female bias in susceptibility to infection; (3) a complex network of molecular and cellular reactions connecting the host's immuno-neuro-endocrine systems with those of the parasite is responsible for the host-parasite relationship rather than just an adaptive immune response and sex hormones; (4) a lack of gender-specific immune profiles in response to different infections; (5) the direct effects of the host hormones on parasite physiology may significantly contribute to SD in parasitism; and (6) the need to enrich the reductionist approach to complex biological issues, like SD, with more penetrating approaches to the study of cause-effect relationships, i.e., network theory. The review concludes by advising against generalization regarding SD and parasitism and by pointing to some of the most promising lines of research.

### THE FEMALE HOST SUPREMACY PARADIGM IN PARASITIC INFECTIONS

It is widely held that female mammals are more resistant to parasitic infections than males because of gender-associated differences in exposure and of testosterone's immunosuppressive properties. The paradigm implies that sexual dimorphism (SD) to parasitism is mediated only, or principally, by the host's immune system and usually disregards the parasites' direct response to the distinct sex-steroid profiles of their female and male hosts.

The female supremacy paradigm in parasitic infections has existed for a long time (Addis, 1946), and despite thoughtful recommendations against simplification (Zuk and McKean, 1996), it is rarely questioned. In several prestigious journals, however, it has recently been a matter of debate, particularly in association with mortality trends in humans (Moore and Wilson, 2002; Owens, 2002) and several infectious diseases (Zuk and McKean, 1996; Doprado et al., 1998; Watanabe et al., 1999; Klein, 2000; Ganley and Rajan, 2001; Hughes and Randolph, 2001; Roberts et al., 2001; Verhelyi, 2001). It has also been associated with a number of broader subjects, i.e., evolution of sexual reproduction (Zuk, 1994), decision making of the host, social hierarchy (Barnard et al., 1998; Gourbal et al., 2002), mating behavior (Kavaliers and Colwell, 1993; Morales et al., 1996; Willis and Poulin, 2000), and energy costs of infection and the immune response (Hansen et al., 2003). We decided to reexamine the paradigm in the light of the current understanding of the immune and endocrine systems of potential hosts because we found that it conflicted with our observations regarding experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*.

### EXPERIMENTAL MURINE *TAENIA CRASSICEPS* CYSTICERCOSIS CONFLICTS WITH THE PARADIGM

*Taenia crassiceps* is an intestinal cestode of canines (definitive host) and of various extraintestinal tissues of rodents (in-

termediate host) in its larval (cysticercus) stage (Freeman, 1962). Experimental cysticercosis caused by *T. crassiceps* in mice simply requires the intraperitoneal injection of live cysticerci (Culbreth et al., 1972). Intraperitoneal cysticerci reproduce asexually by exogenous budding, developing massive parasite loads in a few months (Smith, Esch et al., 1972; Smith, Parrish et al., 1972) that may even approximate the host's body weight, without causing it apparent discomfort (Larralde et al., 1995). The cysticerci also survive and reproduce in vitro under usual culture conditions in media free of fetal calf serum. These features of experimental murine cysticercosis have made it a convenient model in studying the immunological, genetic, and sexual factors involved in susceptibility to infection and parasite proliferation (Sciutto et al., 2002). Sexual differences to infection in mice are still a matter of research. Thus, experimental findings have shown that in different congenic and syngenic strains of mice, females become infected more often than males and carry more cysticerci than males, with significant between-strain variations (Sciutto et al., 1991; Huerta et al., 1992; Larralde et al., 1995; Terrazas et al., 1998; Morales-Montor, Baig et al., 2001; Morales-Montor, Baig, Hallal-Calleros et al., 2002; Morales-Montor, Baig, Kabbani et al., 2002; Morales-Montor, Hallal-Calleros et al., 2002). Estrogens favor parasite reproduction, whereas androgens appear to inhibit it (Bojalil et al., 1993; Terrazas et al., 1994; Morales-Montor, Baig, Hallal-Calleros et al., 2002). Gonadectomy and thymectomy equalize parasite loads between sexes by greatly increasing those in males and slightly decreasing those in females (Huerta et al., 1992; Terrazas et al., 1994; Morales-Montor, Baig, Hallal-Calleros et al., 2002). Male mice are better protected by vaccination than females (Cruz-Revilla et al., 2000). Externally administered 17 $\beta$ -estradiol and dihydrotestosterone (DHT) are able to restore parasite loads to their normal levels in castrated animals. T cells, but not antibodies, also restore the effects of thymectomy (Bojalil et al., 1993). The TH1 response hinders parasite growth early in infection (Terrazas et al., 1999; Toenjes et al., 1999; Spolski et al., 2000; Rodríguez-Sosa et al., 2002), whereas the TH2 response prevails at later times of infection but is incapable of slowing parasite growth (Terrazas et al., 1998; Toenjes et al., 1999). In chronic infections, the male mouse is feminized (estrogenized and deandrogenized) to a degree that

Received 20 March 2003; revised 23 September 2003; accepted 24 September 2003.

\* Departamento de Biología Molecular, Universidad Veracruzana, Xalapa, México.

† To whom correspondence should be addressed.

inhibits male sexual behavior (Morales et al., 1996). Feminization is apparently caused by overexpression of P-450 aromatase (Morales-Montor, Hallal-Calleros et al., 2002), triggered by the high levels of interleukin-6 (IL-6) in late infections (Morales-Montor, Baig et al., 2001; Morales-Montor, Mohamed et al., 2001). Cytokine profiles of infected male and female mice do not show major differences, except for the levels of IL-4, which are higher in males during early infection only (Terrazas et al., 1998).

These findings led to the initial proposal of a sex steroid, immunoendocrine interaction that controls the reproduction of cysticerci, one in which androgens were postulated to favor a TH1 response that limits parasite growth and in which estrogen favors a TH2 response that permits parasite reproduction (Huerta et al., 1992; Bojalil et al., 1993; Terrazas et al., 1994; Morales-Montor, Baig et al., 2001; Morales-Montor, Baig, Hallal-Calleros et al., 2002; Morales-Montor, Baig, Kabbani et al., 2002). Other studies also support the purported correlation between androgens and TH1 response and between estrogen and TH2 response (Morales-Montor, Baig et al., 2001; Morales-Montor, Baig, Hallal-Calleros et al., 2002; Morales-Montor, Baig, Kabbani et al., 2002; Morales-Montor, Hallal-Calleros et al., 2002).

Signs of SD in cysticercosis were recently reported for other host and taeniid species. For example, sex steroids have been implicated in porcine cysticercosis caused by *Taenia solium* because both castration and pregnancy nearly double the prevalence of naturally acquired cysticercosis in rural pigs (Morales et al., 2002). In humans, women are more frequently afflicted than men by severe neurocysticercosis (Del Brutto et al., 1988) and show higher inflammatory profiles (Fleury et al., 2003). Because sex steroids affect experimental *T. crassiceps* infections in laboratory mice and extend to natural infections of *T. solium* in humans and pigs, as well as *Trichinella spiralis* in rats (Klein et al., 1999), our initial suspicions regarding the general validity of the female supremacy paradigm were strengthened.

Other ongoing research has shown that in *T. crassiceps* murine cysticercosis several physiological systems of the host respond to the host's sex hormones, and so does the parasite either by limiting or by prompting its reproduction. For example, the central nervous system of infected and feminized male mice responds to intraperitoneal infections by overexpression of the *c-fos* gene in the hypothalamus, hippocampus, and preoptic area (Morales-Montor, Arrieta et al., 2003). It would appear that hormonal changes induced in the host act to promote the overexpression of the *c-fos* gene involved in cellular differentiation and proliferation of both parasite and host cells (Escobedo et al., 2004), as they do in other stress and immune challenges (Pacheco-Lopez et al., 2002). Thus, in murine cysticercosis, parasite proliferation is responsive not only to the host immune system and testosterone but also to a complex network that integrates the nervous, immune, and endocrine systems of the host and the parasite's physiological systems. The conflict between male biases in *T. crassiceps* cysticercosis with the host female supremacy paradigm expectations is undeniable and requires explanation.

## TESTING THE FEMALE HOST SUPREMACY PARADIGM IN A WIDER REPERTOIRE OF PARASITIC INFECTIONS

The paradigm of female host supremacy in parasitic infections of mammals, as well as the robustness of the corresponding endocrinological and immunological factors postulated as its mechanisms, was evaluated using current literature (Medline,  $n = 110$ : 1995–2002), as well as several frequently cited classic articles and a few recent ones published in 2003. After examining this literature, however, the general validity of the female supremacy paradigm was seriously weakened by too many exceptions. What emerged was a complex host immuno-neuro-endocrine network that was related to the parasite physiologically and that seems more likely to control the complexities involved in certain host-parasite interactions than testosterone alone.

When infections that documented sex bias in infection parameters (Infection-SD) or immune profiles (Immune-SD) were found, the possibility of a cause-effect relationship was examined further. Each infection was classified as either sexually dimorphic, noting the sex favored by the bias (females > males or females < males), or undefined (females = males). Infection-SD was evaluated in terms of prevalence, intensity, severity, morbidity, mortality, hormonal profiles, or behavioral changes in infected animals. The biological meaning of these parameters differs substantially. Thus, some relate to the probability of infection, i.e., prevalence, and others to the outcome of infection, i.e., mortality, but they were assumed to be equivalent indications of sex bias. Immune-SD parameters include antibody production, lymphoid cell responses to mitogens or antigens, cytokine production, hypersensitivity reactions, and protective effects of vaccination. Immune-SD parameters also have important functional differences in their nature and context of expression, i.e., populations, individuals, cells, and molecules, in their role as effectors or mediators of immune responses, in their operation under *in vitro* or *in vivo* conditions, and in their ability to protect from infection. These immune parameters were scored as "greater than" or "smaller than" with respect to the opposite gender. The Immune-SD and Infection-SD data collected were used to examine how the 2 are connected.

## FIRST GENERAL SIGNS OF PARADIGM WEAKNESS

The total number of references examined is relatively small, i.e., only 110. The search identified just 46 different parasite species occurring in 10 species of mammalian hosts, a minute sample considering the many thousands of parasite (Hoberg, 1997) and mammalian species (Anderson et al., 1984). Forty-three references reported SD (Table 1), and the rest (67) were concerned with molecular interactions between the endocrine and immune systems or with hormonal, behavioral, and immune effects on the host (Fig. 1).

The human medicine bias in SD research is obvious because 56% of all the articles were oriented to the study of infections affecting humans or experimental animal infections (usually in rodents) having a human counterpart, i.e., malaria, schistosomiasis, trypanosomiasis, toxoplasmosis, and cysticercosis. Most references in the list do not directly explore SD but rather describe the *in vitro* effects of sexual hormones or cytokines on the immediate response of some immunological or endocrinological component derived from hosts of either sex in rather

TABLE 1. Infection-SD or Immune-SD in different host-parasite relationships documented to date (some parasites infect more than 1 host species).

Parasite	Host	Dimorphism	Prevalence	Intensity	Severity	Mortality	Mechanisms	Other observations	Reference
<i>Brachylaima eribbi</i>	Mice	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂				Expulsion of worms in C57 BL/6J mice is mediated by an immune response	Butcher et al. (2002)
<i>Brugia malayi</i>	Human	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂					Ganley and Rajan (2001)
<i>Brugia pahangi</i>	Rat	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂					Bell et al. (1999)
<i>Dipetalonema vitae</i>	Hamster	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂			17β-estradiol and progesterone are associated with protection in females		Reynouard et al. (1984)
<i>Eimeria vermiformis</i>	Mice							Females distinguish between infected and noninfected males	Kavaliers and Colwell (1993), Kavaliers (1995)
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Mice						Peripheral immune response is reduced in infected males and it is associated to higher levels of corticosterone	High-ranking infected males are less aggressive	Barnard (1998)
<i>Heterakis spumosa</i>	Mice	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂			Testosterone favors the development of the parasite and its survival		Harder et al. (1992)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	Rat	Yes in response to treatment					Infected males have decreased levels of testosterone in plasma	A deficient diet in vitamin G complex inhibits growth of the parasite in females only. Females distinguish between infected and noninfected males	Addis (1946), Willis and Poutlin (2000)
<i>Ixodes ricinus</i>	Voles						Testosterone reduces innate and acquired resistance to tick feeding	Tick feeding favors transmission of other parasites	Hughes and Randolph (2001)
<i>Leishmania donovani</i>	Mice	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂				Macrophages treated in vitro with testosterone have an increased number of promastigotes	Zhang et al. (2001)
<i>Leishmania major</i>	Mice	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂				Testosterone treatment in females increases parasite number and orchidectomy in males decreases it	Mock and Nacy (1988)

TABLE 1. Continued.

Parasite	Host	Dimorphism	Prevalence	Intensity	Severity	Mortality	Mechanisms	Other observations	Reference
<i>Leishmania mexicana</i>	Mice	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂	♀ < ♂		Infected females produce more IFN-γ and infected males more TNF-α	Lesion growth as a result of treatment with IFN-γ-neutralizing antibody in females equaled that in males	Satoskar and Alexander (1995)
<i>Leishmania</i> spp. ( <i>Leishmania viania guyanensis</i> and <i>Leishmania viania panamensis</i> )	Hamster	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂	♀ < ♂		The increased severity in males was associated to a greater intrafollicular expression of IL-4, IL-10, and TGF-β, which are disease promoters	Testosterone treated females have larger lesions than untreated females	Travi, Osorio et al. (2002)
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Rat	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂			Testosterone affects goblet cell function and parasite expulsion		Tiuria et al. (1995)
<i>Plasmodium chabaudi</i>	Mice	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂	♀ < ♂	♀ < ♂	Testosterone decreases the levels of total IgG, IgG1, and IgG2b, increases CD8+, and decreases Ig+ cells in infected females	Oral treatment with testosterone increases mortality in females	Benten et al. (1997), Mossmann et al. (1984)
<i>Plasmodium chabaudi</i>	IFN-γ R <sup>-/-</sup> KO mice	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂			Male sex hormones modulate the TH1-TH2 cell function		Zhang et al. (2000)
<i>Plasmodium chabaudi</i>	IL-4 <sup>-/-</sup> KO mice	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂			Male sex hormones modulate the TH1-TH2 cell function		Zhang et al. (2000)
<i>Plasmodium chabaudi</i>	IL-10 <sup>-/-</sup> KO mice	Yes	♀ > ♂				The pathology may be due to direct stimulation of TNF-α by the parasite		Li (1999)
<i>Schistosoma haematobium</i>	Human	Yes		♀ = ♂			Females have higher levels of specific IgA, TGF-β, and IL-10 with a low specific proliferation compared with males		Remoue et al. (2001)
<i>Schistosoma mansoni</i>	Human	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂	♀ < ♂				Mohamed-Ali et al. (1999)
<i>Schistosoma mansoni</i>	Mice	Yes	♀ > ♂	♀ > ♂	♀ > ♂	♀ > ♂	Testosterone treatment in females or castrated males reduces mortality. DHEA treatment reduces parasite number in females		Nakazawa et al. (1997), Fallon et al. (1998)

TABLE I. Continued.

Parasite	Host	Dimorphism	Prevalence	Intensity	Severity	Mortality	Mechanisms	Other observations	Reference
<i>Schistosoma muriei</i>	Hamster	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂					Barrabès et al. (1980)
<i>Strongyloides ratti</i>	Rat	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂				Testosterone treatment or macrophage blocking increases worm recovery in females	Watanabe et al. (1999)
<i>Strongyloides venezuelensis</i>	Rat	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂			Testosterone restitution increases susceptibility and estradiol restitution decreases it	Gonadectomy in male rats decreases parasite loads, whereas it increases the loads in females	Rivero et al. (2002a, 2002b)
<i>Taenia crassiceps</i>	Mice	Yes	♀ > ♂	♀ > ♂			During infection there is a TH1–TH2 shift; IL-12 promotes CD4+ -specific proliferation; in the chronic infection, IL-6 predominates and stimulates the aromatase activity, which increases serum estradiol in males	Chronically infected males lose their sexual behavior. Infection changes the response to the predator, facilitating the parasite cycle. Vaccination is more effective in males than in females	Sciutto et al. (1990, 1991), Larralde et al. (1995), Morales et al. (1996), Terrazas et al. (1998, 2002), Gourbal et al. (2001), Morales-Montor, Baig et al. (2001)
<i>Taenia solium</i>	Pigs		♀ Nonpregnant > ♀ pregnant; ♂ noncastrated > ♂ castrated				Low levels of androgens or high levels of estrogens probably influence susceptibility to infection		Morales et al. (2002)
<i>Taenia solium</i>	Human	Yes			♀ > ♂			Women develop a greater degree of inflammation when cysticerci are found in brain parenchyma and have more CSF* inflammation and increased cellularity in the CSF than men	Del Brutto et al. (1988), Fleury et al. (2003)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Mice	Yes	♀ > ♂	♀ > ♂	♀ > ♂	♀ > ♂	Male SCID* more rapidly produce IL-12 and higher levels of IFN-γ. Males produce higher levels of TNF-α and IFN-γ at the onset of the infection, controlling parasite multiplication	Testosterone treatment reduces parasite numbers and mortality in females. Infection produces infertility in females	Slahj (1994), Roberts et al. (1995), Walker et al. (1997), Liesenfeld et al. (2001)

TABLE 1. Continued.

Parasite	Host	Dimorphism	Prevalence	Intensity	Severity	Mortality	Mechanisms	Other observations	Reference
<i>Trichinella spiralis</i>	Voles	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂				Polygamous males have higher testosterone levels than monogamous males concomitant to infection	Klein et al. (1999)
<i>Trypanosoma evansi</i>	Mice	Yes	♀ < ♂	♀ < ♂			Intact males have higher levels of lytic antibodies	Doprado et al. (1998, 1999), Schuster and Schaub (2001)	

placement reduces the parasitemia. Orchiectomized males have fewer parasites than controls; testosterone replacement increases parasitemia

\* CSF, cerebrospinal fluid; SCID, severe combined immunodeficiency disease.

unrealistic in vitro conditions, i.e., cell culture media containing (contaminated with) fetal calf serum rich in growth factors and antibiotics. The biochemical results were then mistakenly assumed to operate in a similar manner in the more complicated context of an in vivo infection.

The analysis developed by the literature search casts doubt on the validity of the general female supremacy paradigm. The most notable shortcomings relate to (1) the poor representation of host-parasite systems among cited references, (2) the heavy human medical bias of the more thoroughly explored infections, (3) the unequal meanings of infection and immune parameters measuring SD in host susceptibility to infection, (4) the questionable protective function for many of the immune parameters, and (5) the excessive use of the reductionist approach in explaining events occurring at higher levels of complexity by way of the direct extrapolation of events occurring in vitro.

### THE PREVALENCE AND MECHANISMS OF SD IN SPECIFIC PARASITE INFECTIONS

Table 1 summarizes the 43 references describing 32 infections in 8 host-parasite systems (some parasite species infect more than 1 host species, and 1 host species is infected by more than 1 parasite species) that provided information on the subject of Infection-SD or Immune-SD. In this data set, in 22 of 32 instances (68%) of the 8 systems, females fared better than males in prevalence, intensity, or consequence of infection (severity), varying from insignificant to pronounced. In 5 of 32 instances (16%), males scored better than females, and in 5 of 32 cases (16%), results could not be defined one way or another. In effect, 32% were exceptions to the paradigm. Furthermore, it is of interest to note (Table 1) that severity of infection and mortality indicators were not studied as extensively as prevalence and intensity of infection. Severity of infection was reported in only 28% of the cases cited, and in 60% of these situations, female hosts fared better than males. Only in human schistosomiasis, by *Schistosoma haematobium*, was severity the same for both sexes. Mortality, in contrast, was only reported in 19% of the infections, half of which favored female hosts and the other half males. It is clear, therefore, that SD in severity and mortality have been insufficiently explored to make general and categorical statements.

Sex-associated immunological differences (Immune-SD) were reported in only 10 of 32 infections, and multifaceted immune profiles are described in only 5. Table II focuses on the 5 host-parasite systems in which several infection and immune parameters were evaluated at the time of infection. No uniform pattern or sex bias is discernable. In malaria, toxoplasmosis, and cysticercosis, infections are more prevalent and intense in female than in male mice. However, in leishmaniasis and schistosomiasis, it is the male host that is more frequently and intensely parasitized. The immune parameters studied also vary in each infection, without clear association to infection parameters. Comparison of immune profiles in all 5 infections is possible only for interferon-γ (IFN-γ), which was found to be more elevated in males than in females in all but 1 infection (murine leishmaniasis). Levels of tumor necrosis factor α (TNF-α) were greater in females than in males with malaria; however, in leishmaniasis, schistosomiasis, and toxoplasmosis, males exhibited higher levels of TNF-α than females. In leishmaniasis

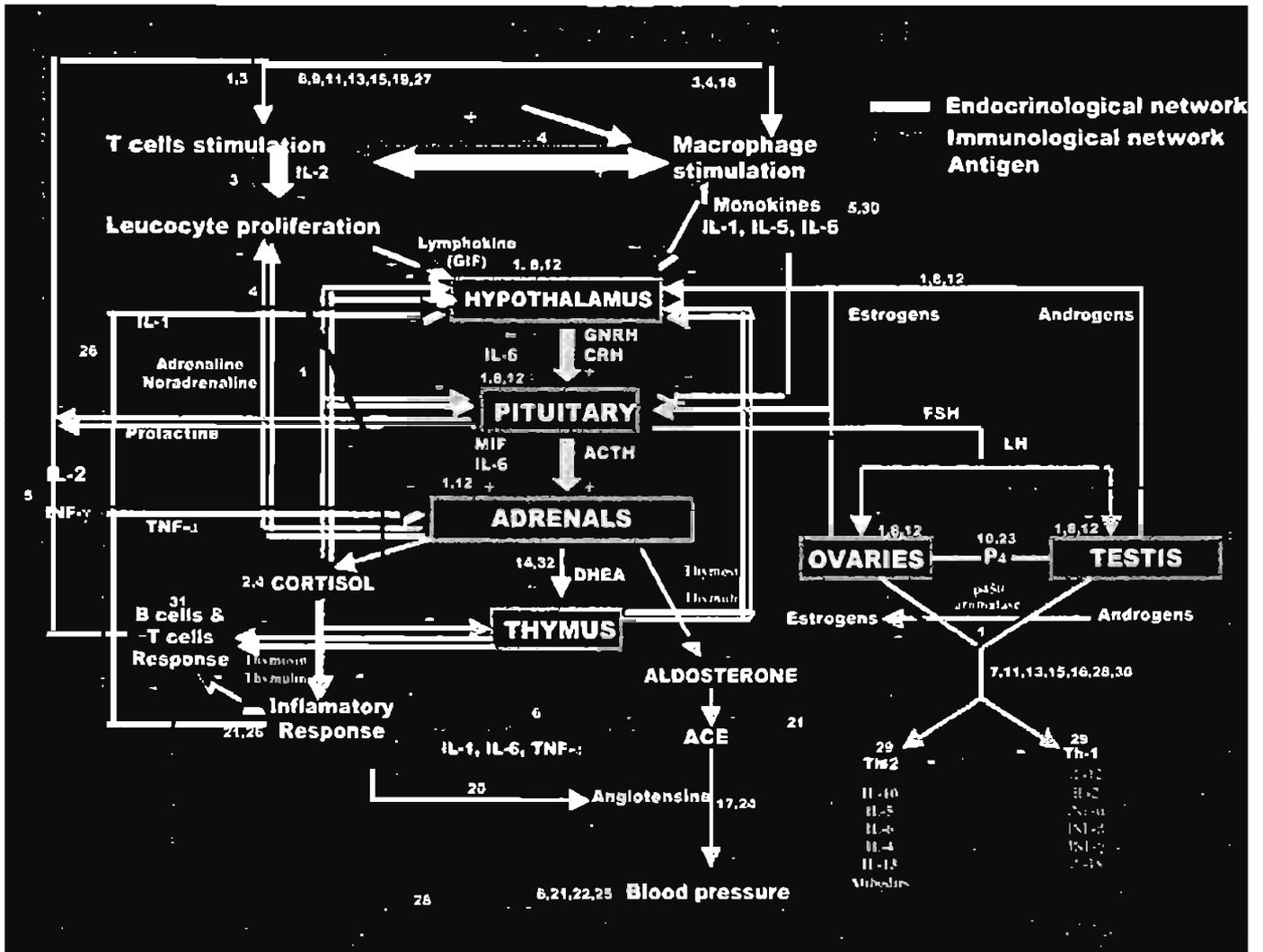


FIGURE 1. The HINEP network circuitry. The magnitude and complexity of the network includes practically all the host's sexual hormones and many of the immunological components described connecting among themselves and with the parasites systems. Arrows (←, ↑, →, ↓) denote connections between nodes; each points to the direction of the signal. ± Signs refer to stimulatory or inhibiting effects. The numbers near each connection code denote the references cited in the figure: (1) Spinedi et al. (2002), (2) Esch (2002), (3) Medzhitov and Janeway (2002), (4) Murtaugh and Foss (2002), (5) Henri et al. (2002), (6) Pramparo (2002), (7) Hughes and Randolph (2001), (8) Verhelyi (2001), (9) Roberts et al. (2001), (10) Thaker et al. (2001), (11) Liesenfeld et al. (2001), (12) Morales-Montor, Baig et al. (2001), (13) Taylor-Robinson (2001), (14) Kuris et al. (2001), (15) Remouc et al. (2001), (16) Ganley et al. (2001), (17) Salzet and Verger-Bocquet (2001), (18) Zhang et al. (2000), (19) Soliman et al. (2001), (20) Feterowski et al. (2001), (21) Peeters et al. (2001), (22) Chae et al. (2001), (23) Barnea (2001), (24) Franco et al. (2001), (25) Gavras (2001), (26) Weinstock and Elliott (2000), (27) Grossman (1989), (28) Zhang et al. (2000), (29) Balemba et al. (1998), (30) Benedetto et al. (2000), (31) Hunter and Reiner (2000), and (32) Freilich et al. (2000).

and schistosomiasis of mice and humans, respectively, Immune-SD is observed in IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . In contrast, infection by *Leishmania mexicana* shows no dimorphism in IL-4, IL-10, and IL-12, whereas in infections with other species of *Leishmania*, there is a clear increase in IL-4 and IL-10 in males measured at the site of the lesions. In schistosomiasis, IL-10 production is clearly dimorphic (higher levels favoring females). Murine leishmaniasis exhibited the least dimorphic TH2 cytokine profile of the 5 infections, which contrasts with its very significant favorable female bias toward infection. In male-biased murine cysticercosis, IFN- $\gamma$  was higher in males; IL-2, IL-6, and proliferative responses were equal in both sexes, and IL-10 was higher in females. In addition, in murine cysticercosis, there was a reversal in the sexual bias toward IL-4 with time of

infection. Males have higher amounts of IL-4 than females in early infection, but this is reversed in chronic infection. No change in profiles with time of infection was reported for the other 4 parasitic infections. These observations support the suspicion that the relationship between SD to infection, and the immune system's mediating effects are not simple and clearly involve many of the immune effectors. The host's immune response does not seem to be gender specific because no clear sex-related strategy can be detected. One would expect that hosts would have evolved immunological responses that are complementary to parasite strategies at different times of infection, number of parasites, location in the host's tissues, and offensive and defensive mechanisms. For example, extracellular stages of the parasite would be vulnerable to antibodies and

TABLE II. Host-parasite relationships in which several infection and some immune parameters were measured at some point during infection. The immune parameters collected varied in each infection.

Parasite	Host	Dimorphism	Prevalence	Intensity	INF- $\gamma$	TNF	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12	IgA	Specific proliferation	Reference
<i>Leishmania mexicana</i>	Mice	Yes	$\bar{q} < \delta$	$\bar{q} < \delta$	$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} < \delta$		$\bar{q} = \delta$	$\bar{q} = \delta$	$\bar{q} = \delta$	$\bar{q} = \delta$			Sastry and Alexander (1995)
<i>Leishmania</i> spp	Hamster	Yes	$\bar{q} < \delta$	$\bar{q} < \delta$				$\bar{q} < \delta$	$\bar{q} < \delta$					Travi, Arceaga et al. (2002)
<i>Schistosoma haematobium</i>	Human	Yes	$\bar{q} < \delta$	$\bar{q} < \delta$	$\bar{q} < \delta$	$\bar{q} < \delta$			$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} < \delta$	Remoue et al. (2001)
<i>Taenia crassiceps</i>	Mice	Yes	$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} < \delta^*$		$\bar{q} = \delta$	$\bar{q} < \delta^*$ $\bar{q} > \delta^+$	$\bar{q} = \delta$	$\bar{q} > \delta^*$	$\bar{q} = \delta$		$\bar{q} = \delta$	Terrazas et al. (1998) Li (1999)
<i>Plasmodium chabaudi</i>	Mice IL-10	Yes	$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} < \delta$	$\bar{q} > \delta$		$\bar{q} = \delta$						Roberts et al. (1995), Walker et al. (1997)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Mice	Yes	$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} > \delta$	$\bar{q} < \delta$	$\bar{q} < \delta$					$\bar{q} < \delta$		$\bar{q} < \delta$	

\* In acute infection.  
+ In chronic infection.

complement because of their direct effect on the parasite's external surface (Philipp et al., 1980). Such antibody-mediated damage has been documented to affect some parasite life cycle stages but certainly not all, i.e., tachyzoites in toxoplasmosis (Johnson and Sayles, 2002), early larvae in cysticercosis (Restrepo et al., 2001), merozoites in malaria (Daly and Long, 1995), trophozoites in amoebiasis (Ghosh et al., 1998), and promastigotes in leishmaniasis (Rafati et al., 2001). However, some of the extracellular stages of parasites manage to escape from the circulation and become sequestered inside their target cells, apparently unscathed by antibodies or other harmful immune effectors. An immune response against intracellular parasites would largely depend on the expression of parasite antigens on the infected cell's membrane (Kyes et al., 2001) and the triggering of innate immune effectors. Attraction of effector leukocytes (polymorphonuclear leukocytes, eosinophils, and basophils), cytotoxic T lymphocytes, and natural killer (NK) cells to the site of parasite infection should aid in parasite destruction or at least in containment of their growth or dispersal. Thus, an inclination toward TH2 profiles, with high levels of antibody production, would be most appropriate against extracellular stages of parasites. A TH1 response, which kills infected cells, would be most effective against intracellular parasites (Sher et al., 1992). If female hosts truly favor TH2 responses, they should be more resistant to extracellular parasites and to intracellular infections in their initial stages when the parasites are migrating toward their protected intracellular locations. In contrast, if androgens favor TH1 responses, then males should handle intracellular parasites more effectively, especially during late stages of infection. Despite the attractive congruence of these speculations on immunity and SD to infections, Table II shows no clear sign of such patterns in the strategies of hosts or parasites. Lack of congruity between expected and observed results most likely come from unsound expectations regarding the role of the immune system in sexually dimorphic parasitic infections.

A detailed understanding of the mechanisms leading to the destruction of host or parasite or to a mutually tolerable stalemate requires further research and the application of a more potent and discerning technology. It might also be useful to use other conceptual approaches in exploring host-parasite systems, i.e., SD and host-parasite specificity, among others. Most research on these topics uses a reductionist approach, attempting to link microscopic events and effectors. However, the network or systems approach, where some functions are distributive to the entire network and not localized in some of its parts, is rarely considered (Olrvai and Barabasi, 2002; Strohman, 2003).

#### THE HOST-IMMUNO-NEURO-ENDOCRINE-PARASITE NETWORK IN CHARGE OF INFECTION AND SD

The usual experimental strategy for examining the mechanisms of immunoenocrine interactions is to add a sexual hormone or a cytokine to an isolated component of the immune, neurological, or endocrine system and then to measure its response. With results obtained by this approach and also with some of the in vivo data in Tables I and II, we constructed a flowchart of the immune and neuroendocrine systems that included all interactions across species, sexes, cells, and types of responses. The result was an all-encompassing host-immuno-

neuro-endocrine-parasite (HINEP) network connecting components within and between the systems of the host and the parasite (Fig. 1). The magnitude and complexity of the HINEP network includes practically all sexual hormones and many of the known immunological components. Simple inspection suggests the networks possible relevance to many other biological scenarios other than infection. Some of the events in the immunoendocrine network involve cellular differentiation, reproduction or death and de novo synthesis of receptors. The prominent and varied connections of the HINEP network with other hormones, well known to be related to stress and the inflammatory process (Besedovsky and del Rey, 2002; Dantzer et al., 2002), suggest that the network can also influence innate immune mechanisms (Yokoyama and Scalzo, 2002). The HINEP network of the host is related directly with the parasite (Morales-Montor, Baig et al., 2001; Morales-Montor, Mohamed et al., 2001), affecting its reproductive capacity through sexual and adrenal steroids that favor the expression of genes related to cellular differentiation and proliferation (Escobedo et al., 2004). The HINEP network contains circuits with forward and backward regulation, producing a great range of effects on the parasite or the host using several venues. Because some of the events in the HINEP network involve cellular reproduction and de novo synthesis of receptors, the network would seem capable of adapting and evolving.

There are other immunoendocrine networks described in the literature, which focus on the connections of the immune system with adrenals and nervous system, but secondarily or not at all with the gonads (Besedovsky and del Rey, 2002). The HINEP network presented in this study adds to the existing networks by incorporating the gonads and sex steroids as intrahost connections and the parasites' physiological systems as interhost connections.

Sex steroids act on a variety of immunocompetent cells affecting clonal expansion, phagocytosis, apoptosis, antigen presentation, and physiological responses to cytokines and chemokines. Thus, there is no question regarding the capacity of sex hormones to modulate the immune response. The significant question is, rather, what is their end effect on the host-parasite relationship and at which point does it act in each gender of host? A node in the network likely to be present under a strong sex-steroid modulation of acquired immunity includes the TH1-TH2 immune responses (Rook et al., 1994; Martin, 2000). Conflicting effects of androgens and estrogens on TH1-TH2 may possibly adjust the relationship of each host sex with the parasite and achieve either "pacifist" coexistence or "belligerent" confrontation. Antigen presentation, clonal expansion, cell activation, or apoptosis and effector macrophage functions, inflammation, and chemotactic responses are also likely candidates for significant hormonal control. The exploration of direct sex-steroid effects is as yet incomplete, and their end effects on the whole immune system, especially when acting in unison, are seldom studied. As can be gathered from the summary of a single hormone's actions on some of the immune parameters cited in Table III, estradiol seems to stimulate TH2, but there is no proof that it shuts down TH1 other than in experiments using mitogens instead of antigens. Similarly, testosterone decreases some B-cell-associated effector functions by reducing the levels of some TH2 cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) but has not been shown to interfere with TH1 functions. Dehydroe-

piandrosteredione (DHEA) stimulates TH1 immune parameters without apparent effect on TH2. DHT has effects similar to testosterone. Progesterone downregulates effector mechanisms (NK cytotoxic activity and macrophage cytokine and nitric oxide production), and prolactin also acts on the TH1-TH2 modulation node. Based on these observations and considering they probably are not independent effectors, however, it would be adventurous to predict a single hormone's end effect on a host's immunological protection or vulnerability to infection. This is even more likely when many of the sex hormone levels are not independent effectors and some hormones are probably operating simultaneously on the host's immune system when confronted with a parasite. Furthermore, more complexity and less predictability are to be expected from the likelihood of immune cytokines acting directly on the parasite, as do the sex steroids.

Notwithstanding the problem in understanding how real physiological networks actually work, their nodes might differ in terms of the number of connections. Herein lies the only hope for understanding relatively simple cause-effect relationships in parasitism. Firing of the most connected nodes may extend widely and rapidly throughout the network, inducing a significant change of phase in its equilibrium state and prompting the emergence of new properties (Oltvai and Barabasi, 2002; Strohman, 2003). Identification of the most connected nodes would be a way to begin their study as principal participants in SD to infection. To clarify the relationship existing between a host's SD and immunity with susceptibility to infection, we must look for these hierarchic nodes in the HINEP network. Some of them may be apparent at sexual maturity, but others might be more difficult to identify, having operated in the early ontology of the female or male immune and endocrine systems and then disappearing by the time of sexual maturation. One could hypothesize that important neuroendocrine system connections with the immune system are established during embryonic development, when gonadal differentiation occurs (Klein et al., 2002; Sinski et al., 2003) and principal criteria for immunological self- and danger signal recognition also appear to be set (Matzinger, 2002; Medzhitov and Janeway, 2002).

To illustrate the HINEP network's explanatory and predictive properties of parasite infections, circuits that are turned on in experimental cysticercosis and schistosomiasis are illustrated with different colors in Figure 1. The circuits are not identical, but in both, IL-6 is a prominent feature, and the consequences of its overexpression, i.e., feminization, a TH2-leaning immune response, would be expected in other infections with all the rest being equal. In the network, there are also circuits capable of masculinizing the infected female if P-450 aromatase is directly inhibited, or by inhibition of GNRH in the hypothalamus, mediated or not by IL-6, or by enhancing the expression of 5 $\alpha$ -reductase type II by means of an IL yet to be identified. In the opposite direction, the DHEA upregulation of TH1, for instance, endows the endocrine system with an ability to participate in immunological defense, a prediction that has yet to be verified in TH1-sensitive infections (Baszler et al., 1999; Suzuki, 1999; Rogers et al., 2002). In the network's schistosomiasis example, the parasite actively induces an immune response, which progressively leans toward TH2. Then, the increase in IL-6 expression in the hypothalamus stimulates CRH production, which, in turn, stimulates pituitary adrenocorticotropin hormone (ACTH) (Morales-Montor, Newhouse et al.,

TABLE III. Effects and mechanisms of action by hormones on immunocompetent cells.\*

Hormone	Effect on immune system cells	References
Estradiol	Polyclonal B cell activator; promotes B cells into plasma cells; ↓ bone marrow and thymus mass; ↑ IL-10 and IL-6 secreting cells; ↓ IFN- $\gamma$ and IL-2 production; downregulates NK activity; upregulates phagocytosis by macrophages; ↑ serotonin and histamine release	Mandrup-Poulsen et al. (1995), Gaillard and Spinedi (1998), Chen et al. (2001), Roberts et al. (2001), Verthelyi (2001), Spinedi et al. (2002), Kitaya et
DHT	↓ T-cell response to mitogen; ↓ mast cell secretion; ↓ IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$ production; ↑ IL-2, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ mRNA	Bijlsma et al. (2002), Morales-Montor, Baig, Hallal-Calleros (2002), Tanriverdi et al. (2003) et al. (2003), Maret et al. (2003), Ou et al. (2003)
Testosterone	↓ B-cell response to mitogen; ↓ mast cell secretion of histamine and serotonin; ↓ IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$ production	Zhang et al. (2000), Bijlsma et al. (2002), Morales-Montor, Baig, Hallal-Calleros (2002), Tanriverdi et al. (2003)
Progesterone	↓ NK cytotoxic activity; ↑ TNF- $\alpha$ secretion; ↓ macrophage cytokine secretion; ↓ NO production	Mandrup-Poulsen et al. (1995), Gaillard and Spinedi (1998), Verthelyi (2001), Spinedi et al. (2002)
Cortisol	↓ Prostaglandins and leukotrienes production; modulates T- and B-cell maturation; affects trafficking and activation of proinflammatory cells; ↓ the production of IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, and TNF- $\alpha$	Derijk and Berkenbosch (1991), Mandrup-Poulsen et al. (1995), Loria et al. (1996), Nussdorfer and Mazzocchi (1998), Feterowski et al. (2001), Besedovsky and del Rey (2002), Esch (2002), Morales-Montor, Mohamed et al. (2003)
DHEA	↑ IL-2 production; ↑ IFN- $\gamma$ production; ↓ IL-6 secretion; ↓ TNF- $\alpha$ production; protects against neurooxidative damage; ↑ T-cell immunity; ↑ DTH reaction	Derijk and Berkenbosch (1991), Mandrup-Poulsen et al. (1995), Loria et al. (1996), Nussdorfer and Mazzocchi (1998), Feterowski et al. (2001), Besedovsky and del Rey (2002)
CRH	↑ IL-1 and IL-6 production; ↑ chemotaxis and superoxide production; ↑ B-cell proliferation; ↑ expression of T cells IL-2 receptors	Derijk and Berkenbosch (1991), Mandrup-Poulsen et al. (1995), Nussdorfer and Mazzocchi (1998), Besedovsky and del Rey (2002), Esch (2002)
ACTH	↑ Antibody production; cytokine secretion and proliferation	Pancani and Ottaviani (1995), Nussdorfer and Mazzocchi (1998), Ottaviani et al. (1999)
Prolactin	↑ Lymphocyte proliferation in response to antigen and mitogens; ↑ IFN- $\gamma$ and IL-2 secretion; ↓ cell death mechanisms in immune cells; induces NK cells to their differentiation to prolactin-activated killer cells	Derijk and Berkenbosch (1991), Matera et al. (2001), McMurray (2001), Yu-Lee (2002)
VIP	↓ Production of proinflammatory agents; ↑ production of anti-inflammatory cytokines; both functions in activated macrophages; ↑ Th2 cell differentiation	Delgado et al. (2001), Voice et al. (2002), Ganea and Delgado (2003)
GH	↑ Adhesion of thymocytes to thymic epithelial cells; ↑ release of thymocytes from thymic nurse cells; ↑ intrathymic T-cell traffic	Sternberg (1997), Weinstock and Elliott (2000)
Thyroid hormones	Affects primary B-cell development because of reduced proliferation of immature B-cell precursors	Dorshkind and Horseman (2001)
Vasopresin and oxitinin	↑ Cell proliferation	Dorshkind and Horseman (2001)
Enkephalins	Low doses: ↑ activates B and T cells; high doses: immunosuppression	Dorshkind and Horseman (2001)
Endorphins	↓ Antibody production and proliferation	Machelska and Stein (2002)
hCG	↓ Proliferation of T and NK and induction of T suppressors	Pope (1990)
Melatonin	Affects thymocyte maturation and differentiation	Hotchkiss and Nelson (2002)

\* Abbreviations and symbols: DHEA, dehydroepiandrosterone; DHT, dihydrotestosterone; CRH, corticotrophin; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; VIP, vaso-intestinal peptide; GH, growth hormone; hCG, human chorionic gonadotrophin; DTH, delayed-type hypersensitivity; ↓, decrease activity; ↑, increase activity.

2001). Concomitantly, IL-6 and migration inhibitory factor could be regulating ACTH production directly in the pituitary gland. The ACTH production, in turn, stimulates adrenal glands to produce cortisol and DHEA, together with TNF- $\alpha$ , which can directly inhibit parasite growth. Infection triggers the immune response of the host by mediating the neuroendocrine system at HPA axis level (Morales-Montor, Mohamed et al., 2003). The consequent microenvironment could be more permissive for the establishment and growth of the schistosome. The network also

exhibits the possibility of HPA axis hormones to act directly on the parasite, affecting its reproductive capacity through adrenal steroids that favor the expression of genes related to cellular differentiation and proliferation (Morales-Montor, Mohamed et al., 2001). On the other hand, in cysticercosis, the nodes of interaction are by way of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis. Infection with the metacestode results in a feminization process and in a TH1-TH2 shift of the host's immune response. The cysticerci actively induce a TH2 immune re-

response. Then, the increase in IL-6 production in turn stimulates estradiol production by directly activating the enzyme P-450 aromatase and at the same time increasing pituitary follicle-stimulating hormone levels. Estradiol would then cycle back to favor the TH2 response further. In turn, the decreased testosterone production inhibits the TH1-dependent cellular response. The consequence is the change of the host's hormonal microenvironment from restrictive (male) to permissive (female) for cysticerci growth. The network also illustrates the possibility that the host's sex hormones may act directly on the parasite, affecting its reproductive capacity through sex steroids that favor the expression of genes related to cellular differentiation and proliferation in many animal species (Fig. 1).

The HINEP network's prowess, with its manifold forward and backward regulations in operation, is congruent with the variegated profiles of Infection-SD and Immune-SD in the various host-parasite systems. It does not, however, necessarily imply or deny that there will be differences between sexes in the final results of a given confrontation with a parasite, reached perhaps by different mechanisms in different host sexes. A functional feature of complicated, random, or scale-free networks is its stability before random perturbations, whereas strategic perturbations "break" them to pieces (Oltvai and Barabasi, 2002; Strohman, 2002). This could explain why there are some sex-unbiased parasitic diseases. Perhaps only a few parasites are capable of triggering a profound general change in the state of the network that results in Infection-SD, a property limited to those parasites connecting with the complex hierarchical immunological nodes of the network and the sex steroids.

#### IS THE HINEP NETWORK INVOLVED IN OTHER MEDICAL AND BIOLOGICAL PUZZLES?

The literature search revealed an extremely complex HINEP network, involving hormones and cytokines that predict potent interactions in events generally attributed to the exclusive operation of single systems in response to simple precepts (reproduction and defense). Therefore, much plasticity and multifunctionality in a network are not without risk. Absence of control could lead to the loss of tolerance and autoimmune problems (Derijk and Berkenbosch, 1991; Lechner et al., 1996) or be involved in the immune compromise of aging (Panerai and Ottaviani, 1995), in the pathophysiology of some infections in which inflammation is a prominent effector of pathology (Mandrup-Poulsen et al., 1995; Henri et al., 2002), or even in some combination of all the above. Moreover, the HINEP network could connect parasite infections with other diseases that seem alien to the immunological and endocrinological domains, such as arterial hypertension (Peeters et al., 2001), atherosclerosis (Chae et al., 2001), and cancer (Herrera and Ostrosky-Wegman, 2001; Polat et al., 2002).

Many other biological questions emerged from the review of the literature on SD, each pointing to avenues for future research. We shall focus on 2 of the more prominent ones, which, in turn, involve many subsidiary possibilities. First, why is there SD in the immune response? Second, is there evidence to suggest that parasites have influenced the evolution of their hosts' Immune-SD?

The very complexity of the HINEP network hints at reasons for Immune-SD other than the self or foreign concept. Perhaps

it has evolved as the best mechanism for individuals of either sex to confront infection successfully, even if by different mechanisms, and also to solve with precision gender-specific challenges, like pregnancy (Grossman, 1989), or perhaps the consequences of their territorial, mating, and social behaviors (Zuk, 1994; Kavaliers et al., 2001).

The selective pressure driving evolution toward Immune-SD, matching in importance the defense of the host against infection, is to permit reproduction in a dioecious species without much immunological compromise (Grossman, 1989; Gaillard and Spinedi, 1998; Agrawal and Lively, 2001; Charles et al., 2002; Moore and Wilson, 2002; Owens, 2002; Potti et al., 2002; Tella et al., 2002). This compromise could be achieved by a transient, immunologically specific allowance of female pregnancy with an offspring that is half-foreign, designed in terms of immunoendocrine signaling that does no damage to an effective response to a pathogen (Martal et al., 1995; Matzinger, 2002; Medzhitov and Janeway, 2002). Pregnancy demands for immunological allowance would originate from the advantage of species diversification gained through gender dichotomy. Its satisfaction would call for occasionally fastidious but transient immunoendocrine regulation by hormones and cytokines so that the fetus is not damaged (Barnea, 2001). Immune-SD may provide males with the specialized ability to better cope with their more stressful and dangerous lives when displaying their sex-specific behaviors (Kavaliers et al., 2001; Spinedi et al., 2002). Thus, the hosts that get the best trade-off between the need to diversify and the need to survive would appear to have the better chances to evolve. Even the parasite could benefit from the host's Immune-SD. For example, the parasite-restrictive males in the case of murine cysticercosis may be regarded as behaviorally enhanced vehicles toward the parasite's final destiny in the gut of carnivores (Willis and Poulin, 2000; Gourbal et al., 2001). In turn, the cysticercus-permissive females, when infected with the eggs of *T. crassiceps*, would act as the optimal hosts for their massive reproduction (Poulin and Thurn, 1996; Zuk and McKean, 1996; Panhuis et al., 2001).

The level of complexity introduced in the decision-making process of immune events by the powerful HINEP network regulatory capacity promises to enlighten persistent immunological puzzles such as tolerance and autoimmunity, the connection with infection of seemingly unrelated physiopathological events such as hypertension and cancer, and the role of Immune-SD in species diversification and individual behavior. The roles of sex steroids in the ontological development of the immune system and in acquired and innate immune responses promise invaluable insights and beg for more research.

#### CONCLUSIONS

There are many exceptions to the female host supremacy paradigm in parasitic infections of mammals, too many to leave unquestioned. Indeed, testosterone is involved in the immunoendocrine interactions triggered by infection, but so are many other hormones and cytokines that act as a network in which the contributions of its single effectors are unclear. Instead, important properties, like infection and immune sex-associated differences, may emerge from the network as a whole. The role of the host's immune system as the only effector of SD in parasitism is not clear; it is insufficiently explored, and it is not

uniformly implemented, even in the most studied host-parasite systems. Finally, the parasite's direct response to the hormonal environment of each host sex has been overlooked as a significant contributor to host SD in parasitic infections. In fact, it would appear that the conflicting findings in murine *T. crassiceps* cysticercosis with the female supremacy paradigm in parasite infections provoke even greater sensitivity to the host's sex steroids, i.e., parasite driven estrogenization and deandrogenization of infected male mice and permissiveness of the female mice TH2 inclined immune profile toward cysticercus proliferation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), IN217401, to J.M.-M. and C.L. and by The National Council of Science and Technology of México (CONACYT, 136430-N and 40072) to J.M.-M., E.G.E., M.A.De L., J.A.V., A.C., and T.R.-G. are CONACYT Ph.D. fellows, and L.I.Del C. and M.H.-E. have research assistants scholarships from Sistema Nacional de Investigadores. CONACYT, I. Perez-Montfort and R. Halpern corrected the English in the original version and the text's literary structure. We are grateful to Raymond T. Damian (University of Georgia), Chris Hall (Barry College of Medicine), and Marco A. Jose (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) for their valuable criticism and suggestions on the manuscript. Very special recognition is given to Gerald W. Esch, Austin MacInnis, and the several unknown colleagues (referees) of the *Journal of Parasitology* who patiently struggled with the manuscript to make it acceptably intelligible.

#### LITERATURE CITED

- ADDIS, C. J. 1946. Experiments on the relation between sex hormones and the growth of tapeworms (*Hymenolepis diminuta*) in rats. *Journal of Parasitology* 32: 574-580.
- AGRAWAL, A. F., AND C. M. LIVELY. 2001. Parasites and the evolution of self-fertilization. *International Journal of Organic Evolution* 55: 869-879.
- ANDERSON, Y., J. SYDNEY, AND J. KNOX JR. 1984. Orders and families of recent mammals of the world. John Wiley & Sons, Cambridge, U.K., 686 p.
- BALEMBIA, O. B., G. K. MBASSA, R. J. ASSEY, C. K. KAIWA, A. E. MAKUNDI, A. BARNARD, J. M. BEHNKE, A. R. GAGE, H. BROWN, AND P. R. SMITHURST. 1998. The role of parasite-induced immunodepression, rank and social environment in the modulation of behaviour and hormone concentration in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences* 265: 693-701.
- BARNARD, C. J., J. M. BEHNKE, A. R. GAGE, H. BROWN, AND P. R. SMITHURST. 1998. The role of parasite-induced immunodepression, rank and social environment in the modulation of behaviour and hormone concentration in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences* 265: 693-701.
- BARNEA, E. R. 2001. Embryo maternal dialogue: From pregnancy recognition to proliferation control. *Early Pregnancy* 5: 65-66.
- BARRABES, A., T. H. DUONG, F. REYNOUARD, AND C. COMBESCOL. 1980. Experimental *Schistosoma mansoni* parasitosis in golden hamsters. Effects on the intensity of parasitism, and on the rate of antibodies' circulation, after administration of estrogen, testosterone, or progesterone. *Annals of Parasitological Human Compend* 55: 671-677.
- BASZLER, T. V., M. T. LONG, T. F. McELWAIN, AND B. A. MATHISON. 1999. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *International Journal of Parasitology* 10: 1635-1646.
- BELL, H. A., E. C. FITCHES, R. E. DOWN, G. C. MARRIS, J. P. EDWARDS, J. A. GATEHOUSE, AND A. M. GATEHOUSE. 1999. The effect of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* 45: 983-991.
- BENEDETTO, N., A. FOLGORE, F. GORGA, E. FINAMORE, M. RAO, AND F. GALLIERO. 2000. Interactions between cytokines and growth hormone for resistance to experimental. *News in Microbiology* 23: 167-183.
- BENFEN, W. P., P. UERICHI, W. N. KUHN-VELTEN, H. W. VOHR, AND F. WUNDERLICH. 1997. Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: Persistence after withdrawal of testosterone. *Journal of Endocrinology* 153: 275-281.
- BESEDOVSKY, H. O., AND A. DEL REY. 2002. Introduction: Immune-neuroendocrine network. *Frontiers in Hormone Research* 29: 1-14.
- BIJLSMA, W. R., B. A. TONINO, S. M. RICHARDS, M. LIU, B. D. SULLIVAN, AND D. A. SULLIVAN. 2002. Androgen influence on lymphocyte gene expression. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 506: 143-151.
- BOJALIL, R., L. I. TERRAZAS, T. GOVEZENSKY, E. SCIUTTO, AND C. LARRALDE. 1993. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 79: 384-389.
- BUTCHER, A., R. WILLIAMS, D. WHITAKER, S. LING, P. SPEED, AND F. MORAN. 2002. Improving linkage analysis in outcrossed forest trees—an example from *Acacia mangium*. *Theoretical Applied Genetics* 104: 1185-1191.
- CHAC, C. U., R. T. LEE, N. RIFAI, AND P. M. RIDKER. 2001. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 38: 399-403.
- CHARLES, S., S. MORAND, J. L. CHASSE, AND P. AUGER. 2002. Host patch selection induced by parasitism: Basic reproduction ratio  $r(0)$  and optimal virulence. *Theoretical Population Biology* 62: 97-109.
- CHEN, H., Y. CHEN, W. TIAN, S. LEI, AND R. PENG. 2001. Effects of estradiol and isoflavonoid on the expression of adhesion molecules on neutrophils. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 32: 27-31.
- CRUZ-REVILLA, C., G. ROSAS, G. FRAGOSO, F. LOPEZ-CASILLAS, A. TOLEDO, C. LARRALDE, AND E. SCIUTTO. 2000. *Taenia crassiceps* cysticercosis: Protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *Journal of Parasitology* 86: 67-74.
- CULBERTI, K. L., G. W. ESCH, AND R. E. KUHN. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). III. The relationships between larval biomass and the uptake and incorporation of C-leucine. *Experimental Parasitology* 32: 272-281.
- DAI, Y., T. M., AND C. A. LONG. 1995. Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. *Journal of Immunology* 55: 236-243.
- DANTZER, R., J. P. KONSMAN, R. M. BLUTHI, AND K. W. KELLEY. 2002. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: Parallel or convergent? *Autonomous Neuroscience* 85: 60-65.
- DEL BRUTTO, O. H., E. GARCIA, O. TAJAMAS, AND J. SOTELO. 1988. Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Archives of Internal Medicine* 148: 544-546.
- DELGADO, M., C. ABAD, C. MARTINEZ, M. G. JEARRANZ, A. ARRANZ, R. P. GOMARIZ, AND J. LICHTA. 2001. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: Potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *Journal of Molecular Medicine* 80: 16-24.
- DERUK, R., AND F. BERKENBOSCH. 1991. The immune-hypothalamo-pituitary-adrenal axis and autoimmunity. *International Journal of Neuroscience* 59: 91-100.
- DOPRAIDO, J. C., M. P. LEAL, J. A. ANSELMO-FRANCI, II, F. DE ANDRADE, AND J. K. KLOETZEL. 1998. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 84: 100-105.
- , A. M. LEVY, M. P. LEAL, E. BERNARD, AND J. K. KLOETZEL. 1999. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 85: 826-829.
- DORSHKIND, K., AND N. D. HORSEMAN. 2001. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessays* 23: 288-294.
- ESCH, T. 2002. Health in stress: Change in the stress concept and its

- significance for prevention, health and life style. *Gesundheitswesen* 64: 73–81.
- ESCOBEDO, G. C., LARRALDE, A., CHAVARRIA, M. A., CERIBÓN, AND J. MORALES-MONTOR. 2004. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex-steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. *Journal of Parasitology*. [In press.]
- FALLON, P. G., E. J. RICHARDSON, F. M. JONES, AND D. W. DUNNE. 1998. Dehydroepiandrosterone sulfate treatment of mice modulates infection with *Schistosoma mansoni*. *Clinical Diagnostics Laboratory Immunology* 5: 251–253.
- FETEROVSKI, C., H. WFIGHARDT, K. EMMANUILIDIS, T. HARTUNG, AND B. HOLZMANN. 2001. Immune protection against septic peritonitis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis. *European Journal of Immunology* 31: 1268–1277.
- FLEURY, A., T. GOMEZ, I. ALVAREZ, D. MEZA, M. HUERTA, A. CHAVARRIA, R. A. CARRILLO-MEZO, C. LLOYD, A. DESSEIN, P. M. PREUX, M. DUMAS, C. LARRALDE, E. SCIUTTO, AND G. FRAGOSO. 2003. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 22: 139–145.
- FRANCO, M. E., TAPIA, J., SANTAMARIA, I., ZAFRA, R., GARCIA-TORRES, K., L. GORDON, H. PONS, B. RODRIGUEZ-ITURBE, R. J. JOHNSON, AND J. HERRERA-ACOSTA. 2001. Renal cortical vasoconstriction contributes to development of salt-sensitive hypertension after angiotensin II exposure. *Journal of the American Society of Nephrology* 12: 2263–2271.
- FREEMAN, R. S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi. 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40: 969–990.
- FREILICHT, D., S. FERRIS, M. WALLACE, L. LEACH, A. KALLEN, J. FRINCKE, C. AHLEM, M. HACKER, D. NELSON, AND J. HEBERT. 2000. 16 Alpha-bromoepiandrosterone, a dehydroepiandrosterone (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 63: 280–283.
- GAILLARD, R. C., AND E. SPINEDI. 1998. Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: Evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domestic Animal Endocrinology* 15: 345–352.
- GANEVA, D., AND M. DE GAIXO. 2003. The neuropeptides VIP/PACAP and T-cells: Inhibitors of activators? *Current Pharmacological Discoveries* 9: 997–1004.
- GANLEY, L., S. BABU, AND T. V. RAJAN. 2001. Course of *Brugia malayi* infection in C57BL/6J NOS2<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> mice. *Experimental Parasitology* 98: 35–43.
- , AND T. V. RAJAN. 2001. Endogenous testosterone levels do not affect filarial worm burdens in mice. *Experimental Parasitology* 98: 29–34.
- GAVRAS, H. P. 2001. Issues in hypertension: Drug tolerability and special populations. *American Journal of Hypertension* 14: 231S–236S.
- GHOSH, P. K., S. GUPTA, L. R. LEON, R. GHOSH, B. H. RUIZ-ORDAZ, AND L. ORTIZ-ORTIZ. 1998. Intestinal amoebiasis: Antibody-secreting cells and humoral antibodies. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 1: 1–7.
- GOURBAL, B. E., M. RIGBI, G. PETIT, AND C. GABRIEL. 2001. Parasite-altered host behavior in the face of a predator: Manipulation or not? *Parasitology Research* 87: 186–192.
- GROSSMAN, C. 1989. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, facts and hypothesis. *Journal of Steroid Biochemistry* 34: 241–251.
- HANSEN, S. A., I. FOLSTAD, AND K. E. ERIKSTAD. 2003. Reduced immunocompetence and cost of reproduction in common eiders. *Oecologia* 136: 457–464.
- HARDER, J., R. ELIASSON, E. PONTIS, M. D. BALLINGER, AND P. REICHARD. 1992. Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* by S-adenosylmethionine. *Journal of Biological Chemistry* 15: 25548–25552.
- HENRI, S., C. CHEVILLARD, A. MERGANI, P. PARIS, J. GAUDART, C. CAMILLA, H. DESSEIN, E. MONTERO, N. E. ELWALI, O. K. SAEED, M. MAGZOUB, AND A. J. DESSEIN. 2002. Cytokine regulation of peritoneal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- $\gamma$  is associated with protection against fibrosis and TNF- $\alpha$  with aggravation of disease. *Journal of Immunology* 15: 929–936.
- HERRERA, L., AND P. OSTROSKY-WEGMAN. 2001. Do helminths play a role in carcinogenesis? *Trends in Parasitology* 17: 172–175.
- HERRIG, E. P. 1997. Phylogeny and historical reconstruction: Host-parasite systems as keystones in biogeography and ecology. *In Biodiversity II: Understanding and protecting our biological resources*, M. L. Reaka-Kudla (ed.). Joseph Henry Press, New York, p. 243.
- HOTCHKISS, A. K., AND R. J. NELSON. 2002. Melatonin and immune function: Hype or hypothesis? *Critical Reviews in Immunology* 22: 351–371.
- HUERTA, L., L. I. TERRAZAS, E. SCIUTTO, AND C. LARRALDE. 1992. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *Journal of Parasitology* 78: 471–476.
- HUGHES, V. L., AND S. F. RAMDOLPH. 2001. Testosterone depresses innate and acquired resistance to ticks in natural rodent hosts: A force for aggregated distributions of parasites. *Journal of Parasitology* 87: 49–54.
- HUNTER, C. A., AND S. L. REINER. 2000. Cytokines and T-cells in host defense. *Currents Opinions in Immunology* 12: 413–418.
- JOHNSON, L. L., AND P. C. SAYLES. 2002. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infection and Immunity* 70: 185–191.
- KAVALIERS, M., E. CHOLERIS, AND D. D. COLWELL. 2001. Brief exposure to female odors “emboldens” male mice by reducing predator-induced behavioral and hormonal responses. *Hormones and Behavior* 40: 497–509.
- , AND D. D. COLWELL. 1993. Multiple opioid system involvement in the mediation of parasitic-infection induced analgesia. *Brain Research* 623: 316–320.
- KITAYA, K., J. YASUDA, T. NAKAYAMA, S. FUSHIKI, AND H. HONJO. 2003. Effect of female sex steroids on human endometrial CD16 neg CD56 bright natural killer cells. *Fertility and Sterility* 79: S730–S734.
- KLEIN, S. L. 2000. The effects of hormones on sex differences in infection: From genes to behavior. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 24: 627–638.
- , H. R. GAMBLE, AND R. J. NELSON. 1999. Role of steroid hormones in *Trichinella spiralis* infection among voles. *American Journal of Physiology* 277: R1362–R1367.
- , A. L. MARSON, A. L. SCOTT, G. KETNER, AND G. E. GLASS. 2002. Neonatal sex steroids affect responses to Seoul virus infection in male but not female Norway rats. *Brain Behavioral Immunology* 16: 736–746.
- KURTIS, J. D., R. MTALIB, F. K. ONYANGO, AND P. E. DUFFY. 2001. Human resistance to *Plasmodium falciparum* increases during puberty and is predicted by dehydroepiandrosterone sulfate levels. *Infection and Immunity* 69: 123–128.
- KYES, S., P. HORROCKS, AND C. NEWBOLD. 2001. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annual Reviews of Microbiology* 55: 673–707.
- LARRALDE, C., J. MORALES, I. TERRAZAS, T. GOVEZENSKY, AND M. C. ROMANO. 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 52: 575–580.
- LECHNER, O., Y. HU, M. JAFARIAN-TEHRANI, H. DIETRICH, S. SCHWARZ, M. HILKOLD, F. HAOUR, AND G. WICK. 1996. Disturbed immunocendocrine communication via the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in murine lupus. *Brain Behavioral Immunology* 4: 337–350.
- LI, C., I. CORRALIZA, AND J. LANGHORN. 1999. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infection and Immunity* 67: 4435–4442.
- LIESENFELD, O., T. A. NGUYEN, C. PHARKE, AND Y. SUZUKI. 2001. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Journal of Parasitology* 87: 1491–1493.
- LORIA, R. M., D. A. PADGETT, AND P. N. HUYNH. 1996. Regulation of the immune response by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *Journal of Endocrinology* 150: S209–S220.
- MACHELSKA, H., AND C. STUN. 2000. Pain control by immune-derived opioids. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27: 533–536.

- MANDRUP-POULSEN, T., J. NERUP, J. I. REIMERS, F. POXTOT, H. U. ANDERSEN, A. KARLSEN, U. BJERRE, AND R. BERGHOLDT. 1995. Cytokines and the endocrine system. I. The immuno-endocrine network. *European Journal of Endocrinology* 133: 660–671.
- MAREL, A., J. D. COUDERT, L. GARIDOU, G. FOUCRAS, P. GOURDY, A. KRUST, S. DUPONT, P. CHAMBON, P. DRUET, F. BAYARD, AND J. C. GUER. 2003. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development *in vivo*. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *European Journal of Immunology* 33: 512–521.
- MARTAL, J., M. P. DE LA LLOSA-HERMIER, N. CHENE, L. HUYNI, S. MILLET, R. L'HARIDON, A. ASSAL, N. ROIGNANT, AND G. CHAOUAT. 1995. Trophoblastic interferons and embryonal immune tolerance. *Contraception, Fertility and Sexuality* 23: 562–572.
- MARTIN, J. T. 2000. Sexual dimorphism in immune function: The role of prenatal exposure to androgens and estrogens. *European Journal of Pharmacology* 29: 251–261.
- MATERA, L., M. MORI, AND A. GALETTO. 2001. Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. *Lupus* 10: 728–734.
- MATZINGER, P. 2002. The danger model: A renewed sense of self. *Science* 296: 301–305.
- McMURRAY, R. W. 2001. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: Actions and interactions. *International Immunopharmacology* 1: 995–1008.
- MEDZHITOV, R., AND C. A. JANEWAY JR. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298–300.
- MOCK, B. A., AND C. A. NACY. 1988. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. *Infection and Immunity* 56: 3316–3319.
- MOJAMED-ALI, Q., N. E. ELWALI, A. A. ABDELHAMEED, A. MERGANI, S. RAHOUD, K. E. FLAGIB, O. K. SAIED, L. ABEL, M. M. MAGZOUB, AND A. J. DESSEIN. 1999. Susceptibility to periportal (Symmers) fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infections: Evidence that intensity and duration of infection, gender, and inherited factors are critical in disease progression. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1298–1306.
- MOORE, S. L., AND K. WILSON. 2002. Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. *Science* 297: 2015–2018.
- MORALES, J., C. LARRALDE, M. ARTEAGA, T. GOVIZENSKY, M. C. ROMANO, AND G. MORALI. 1996. Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *Journal of Parasitology* 82: 689–693.
- , T. VELASCO, V. TOVAR, G. FRAGOSO, A. FLEURY, C. BELTRAN, N. VILLALOBOS, A. ALUJA, L. F. RODARTE, E. SCILITTO, AND C. LARRALDE. 2002. Castration and pregnancy of rural porcines significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Veterinary Parasitology* 30: 41–48.
- MORALES-MONTOR, J., I. ARRIETA, L. J. DEL CASTILLO, M. RODRIGUEZ-DORANTES, M. A. CERBON, AND C. LARRALDE. 2004. Remote sensing of intraperitoneal parasitism by the host's brain: Regional changes of *c-fos* gene expression in the brain of feminised cysticercotic male mice. *Parasitology* 128: 1–9.
- , S. BAIG, C. HALLAL-CALLEROS, AND R. T. DAMIAN. 2002. *Taenia crassiceps*: Androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Experimental Parasitology* 100: 209–216.
- , A. KABBANI, AND R. T. DAMIAN. 2002. Do interleukin-6 and macrophage-migration inhibitory factor play a role during sex-associated susceptibility in murine cysticercosis? *Parasitology Research* 88: 901–904.
- , R. MITCHELL, K. DEWAY, C. HALLAL-CALLEROS, AND R. T. DAMIAN. 2001. Immunoendocrine interactions during chronic cysticercosis determine male mouse feminization: Role of IL-6. *Journal of Immunology* 167: 4527–4533.
- , C. HALLAL-CALLEROS, M. ROMANO, AND R. T. DAMIAN. 2002. Inhibition of P-450 aromatase prevents feminization and induces protection during cysticercosis. *International Journal for Parasitology* 32: 1379–1387.
- , F. MOHAMED, A. BAGHDADI, S. BAIG, C. HALLAL-CALLEROS, AND R. T. DAMIAN. 2003. *Schistosoma mansoni* infection in baboons induces the expression of mRNA for IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and macrophage migration inhibitory factor in hypothalamus, pituitary and adrenal glands. *International Journal for Parasitology*. [In press.]
- , A. M. GHADER, S. BAIG, C. HALLAL-CALLEROS, AND R. T. DAMIAN. 2001. *In vitro* effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* 87: 1132–1139.
- , E. NEWHOUSE, F. MOHAMED, A. BAGHDADI, AND R. T. DAMIAN. 2001. Altered levels of hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones in baboons and mice during the course of infection with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Infectious Diseases* 183: 313–320.
- MOSSMANN, H., W. P. BENTEN, C. GALANOS, M. FREUDENBERG, W. N. KUHN-VELTEN, H. REINAUER, F. REYNOUARD, A. BARRABES, R. LACROIX, AND C. COMBESCOT. 1984. Effect of 17 beta-estradiol, progesterone and testosterone on *Dipetalonema vitae* parasitosis in the castrated female golden hamster *Cricetus auratus*. *Annals of Parasitological Human Compendis* 59: 237–244.
- MURTAUGH, M. P., AND D. L. FOSS. 2002. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87: 109–121.
- NAKAZAWA, M., M. R. FANTAPPIE, G. L. FREEMAN JR., S. ELIOT-SANTOS, N. J. OLSEN, W. J. KOVACS, W. E. SECOR, AND D. G. COLLY. 1997. *Schistosoma mansoni*: Susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. *Experimental Parasitology* 85: 233–240.
- NUSSDORFER, G. G., AND G. MAZZOCCHI. 1998. Immune-endocrine interactions in the mammalian adrenal gland: Facts and hypotheses. *International Reviews Cytology* 183: 143–184.
- OLTVAY, Z. N., AND A. L. BARABASI. 2002. Systems biology: Life's complexity pyramid. *Science* 298: 763–764.
- OTTAVIANI, E., A. FRANCHINI, AND S. GLENZANI. 1999. ACTH and its role in immune-neuro-endocrine functions. A comparative study. *Current Pharmacological Discoveries* 5: 673–681.
- OU, H. J., J. Y. KIM, AND H. G. JEONG. 2003. 17 Beta-estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 18: 1129–1134.
- OWENS, I. P. 2002. Ecology and evolution: Sex differences in mortality rate. *Science* 297: 2008–2009.
- PACHECO-LOPEZ, G., E. ESPINOSA, H. M. ZAMORANO-ROJAS, V. RAMIREZ-AMAYA, AND F. BERMUDEZ-RATTONI. 2002. Peripheral protein immunization induces rapid activation of the CNS, as measured by *c-fos* expression. *Journal of Neuroimmunology* 131: 50–59.
- PANLRAI, A. E., AND E. OTTAVIANI. 1995. Immunoendocrine reshaping with age. *International Reviews in Immunology* 12: 75–84.
- PANHUIS, T. M., R. BUTLIN, M. ZUK, AND T. TREGENZA. 2001. Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 364–371.
- PEETERS, A. C., M. G. NETEA, M. C. JANSSEN, B. J. KULLBERG, J. W. VAN DER MEER, AND T. THIN. 2001. Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *European Journal of Clinical Investigation* 31: 31–36.
- PHILIPP, M., R. M. PARKHOUSE, AND B. M. OGLETHORPE. 1980. Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. *Nature* 287: 538–540.
- POLAT, A., L. CINEEL, D. DUSMEZ, O. AYDIN, AND R. EGILMEZ. 2002. Expression of cell-cycle related proteins in *Helicobacter pylori* gastritis and association with gastric carcinoma. *Neoplasma* 49: 95–100.
- POPE, R. M. 1990. Immunoregulatory mechanisms present in the maternal circulation during pregnancy. *Baillieres Clinical Rheumatology* 4: 33–52.
- POTTI, J., J. A. DAVILA, J. L. TELLA, O. FRIAS, AND S. VILLAR. 2002. Gender and viability selection on morphology in fledgling pied flycatchers. *Molecular Ecology* 11: 1317–1326.
- POULIK, R., AND J. R. THURN. 1996. Sexual inequalities in helminth infections: A cost of being a male? *American Naturalist* 147: 287–295.
- PRAMPARO, P. 2002. The epidemiology of hypertension in South America. *Journal of Human Hypertension* 16: S3–S6.
- RAFATI, S., A. H. SALMANIAN, K. HASHEMI, C. SCHAEFF, S. BEHVI, AND N. FASEL. 2001. Identification of *Leishmania major* systemic pro-

- kinases as targets of the immune response in humans. *Molecular and Biochemical Parasitology* 113: 35–43.
- REMOUE, F., D. TO VAN, A. M. SCHACHT, M. PICQUET, O. GARRAUD, J. VERCRUYSSSE, A. LY, A. CAPRON, AND G. RIVEAU. 2001. Gender-dependent specific immune response during chronic human *Schistosoma haematobium*. *Clinical and Experimental Immunology* 124: 62–68.
- RESTREPO, B. I., M. I. AGUILAR, P. C. MELBY, AND J. M. TEALE. 2001. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: Evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65: 366–370.
- REYNOUARD, F., A. BARRABES, R. LACROIX, AND C. COMBESCOT. 1984. Effect of 17 beta-estradiol, progesterone and testosterone on *Dipetalonema vitae* parasitosis in the castrated female golden hamster *Cricetus auratus*. *Annals of Parasitology and Human Compendis* 59: 237–244.
- RIVERO, J. C., Y. INOUE, N. MURAKAMI, AND Y. HORII. 2002a. Androgen- and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in Wistar rats. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 64: 457–461.
- , ———, AND ———. 2002b. Age- and sex-related changes in susceptibility of Wistar rats to *Strongyloides venezuelensis* infection. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 64: 519–521.
- ROBERTS, C. W., S. M. CRUCKSHANK, AND J. ALEXANDER. 1995. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infection and Immunity* 63: 2549–2555.
- , W. WALKER, AND J. ALEXANDER. 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical Microbiological Reviews* 14: 476–488.
- RODRIGUEZ-SOSA, M., J. R. DAVID, R. BOJALIL, A. R. SATOSKAR, AND L. I. TERRAZAS. 2002. Cutting edge: Susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by TH2 response induced via STAT6 signaling. *Journal of Immunology* 168: 3135–3139.
- ROGERS, K. A., G. K. DEKREY, M. L. MBOW, R. D. GILLESPIE, C. I. BRODSKYN, AND R. G. TITUS. 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiological Letters* 209: 1–7.
- ROOK, G. A., R. HERNANDEZ-PANDO, AND S. L. LIGHTMAN. 1994. Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunology Today* 15: 301–303.
- SALZET, M., AND M. VERGER-BOCQUET. 2001. Elements of angiotensin system are involved in leeches and mollusks immune response modulation. *Brain Research* 19: 137–147.
- SATOSKAR, A., AND J. ALEXANDER. 1995. Sex-determined susceptibility and differential IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Immunology* 84: 1–4.
- SCHUSTER, J. P., AND G. A. SCHAUH. 2001. Experimental Chagas disease: The influence of sex and psychoneuroimmunological factors. *Parasitology Research* 87: 994–1000.
- SCIUTTO, E., G. FRAGOSO, M. L. DIAZ, F. VALDEZ, R. M. MONTOYA, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, AND C. LARRALDE. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77: 243–246.
- , K. MANOUTCHARIAN, G. GEVORKIAN, G. ROSAS-SALGADO, M. HERNANDEZ-GONZALEZ, L. HERRERA-ESTRELLA, J. CABRERA-PONCE, F. LOPEZ-CASILLAS, C. GONZALEZ-BONILLA, A. SANTIAGO-MACHUCA, F. RUIZ-PEREZ, J. SANCHEZ, F. GOLDBAUM, A. ALUJA, AND C. LARRALDE. 2002. New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Archives of Medical Research* 33: 371–378.
- , L. TRUEBA, D. LEMUS, R. M. MONTOYA, M. L. DIAZ, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, G. TAPIA, AND C. LARRALDE. 1990. Cysticercosis vaccine: Cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* 12: 687–696.
- SIEB, A., R. T. GAZZINELLI, I. P. OSWALD, M. CLERICI, M. KULLBERG, E. J. PEARCE, J. A. BERZOFKY, T. R. MOSMANN, S. L. JAMES, AND H. C. MORSE III. 1992. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunological Reviews* 127: 183–204.
- SINISI, A. A., D. PASQUALI, A. NOTARO, AND A. BELLASTELLA. 2003. Sexual differentiation. *Journal of Endocrinological Investigations* 26: S23–S28.
- SMITH, J. K., G. W. ESCH, AND R. E. KUHN. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *International Journal for Parasitology* 2: 261–263.
- , M. PARRISH, G. W. ESCH, AND R. E. KUHN. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda)—II. RNA and DNA synthesis in the ORF and KBS strains determined by autoradiography. *International Journal for Parasitology* 2: 383–389.
- SOLIMAN, S., A. S. MARZOUK, A. J. MAIN, AND A. A. MONIASSER. 2001. Effect of sex, size, and age of commensal rat hosts on the infestation parameters of their ectoparasites in a rural area of Egypt. *Journal of Parasitology* 87: 1308–1316.
- SPINEDI, E., R. C. GAILLARD, AND A. CHISARI. 2002. Sexual dimorphism of neuroendocrine-immune interactions. *Frontiers in Hormone Research* 29: 91–107.
- SPOLSKI, R. J., J. CORSON, P. G. THOMAS, AND R. E. KUHN. 2000. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunology* 6: 297–305.
- STERNBERG, E. M. 1997. Neural-immune interactions in health and disease. *Journal of Clinical Investigations* 100: 2641–2617.
- STROHMAN, R. 2002. Maneuvering in the complex path from genotype to phenotype. *Science* 296: 701–703.
- . 2003. Thermodynamics—old laws in medicine and complex disease. *Nature Biotechnology* 21: 477–479.
- SUZUKI, Y. 1999. Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology* 201: 255–271.
- TANRIVERDI, F., L. F. SILVEIRA, G. S. MACCOLI, AND P. M. BOULOUX. 2003. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Immune function and autoimmunity. *Journal of Endocrinology* 176: 293–304.
- TAYLOR-ROBINSON, A. 2001. Th1/Th2-regulated arginase availability modulates *Leishmania* infection. *Trends in Parasitology* 17: 262–263.
- TELLA, J. L., A. SCHEUERLEIN, AND R. E. RICKLEFS. 2002. Is cell-mediated immunity related to the evolution of life-history strategies in birds? *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences* 22: 1059–1066.
- TERRAZAS, A., R. NOWAK, N. SERAFIN, G. FERREIRA, F. LEVY, AND P. POINDRON. 2002. Twenty-four-hour-old lambs rely more on maternal behavior than on the learning of individual characteristics to discriminate between their own and an alien mother. *Developmental Psychobiology* 40: 408–418.
- TERRAZAS, L. L., R. BOJALIL, T. GOVEZENSKY, AND C. LARRALDE. 1994. A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 80: 563–568.
- , ———, ———, AND ———. 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 84: 74–81.
- , M. CRUZ, M. RODRIGUEZ-SOSA, R. BOJALIL, F. GARCIA-TAMAYO, AND C. LARRALDE. 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research* 85: 135–141.
- THAKER, H. K., L. TACCONI, AND M. H. SNOW. 2001. Neurocysticercosis in pregnancy. *Brain Journal of Neurosurgery* 15: 284.
- TICUJA, R., Y. HORII, S. MAKIMURA, N. ISHIKAWA, K. TSUCHIYA, AND Y. NAWA. 1995. Effect of testosterone on the mucosal defence against intestinal helminths in Indian soft-furred rats, *Millardia melitada* with reference to goblet and mast cell responses. *Parasite Immunology* 17: 479–484.
- TOENIES, S. A., R. J. SPOLSKI, K. A. MOONEY, AND R. E. KUHN. 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/TH2-type response. *Parasitology* 118: 623–633.
- TRAVI, B. L., L. T. ARTEAGA, A. P. LEON, AND G. H. ADLER. 2002. Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 887–892.
- , Y. OSORIO, P. C. MELBY, B. CHANDRASEKAR, I. ARTEAGA, AND

- N. G. SARAVIA. 2002. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infection and Immunity* 70: 2288–2296.
- VERTHELYI, D. 2001. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *International Immunopharmacology* 1: 983–993.
- VOICE, J. K., G. DORSAM, R. C. CHAN, C. GRINNINGER, Y. KUNG, AND E. J. GOETZL. 2002. Immunoefector and immunoregulatory activities of vasoactive intestinal peptide. *Regulatory Peptides* 15: 199–208.
- WALKER, W., C. W. ROBERTS, D. J. FERGUSON, H. JEBBARI, AND J. ALEXANDER. 1997. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. *Infection and Immunity* 65: 1119–1121.
- WATANABE, K., S. HAMANO, K. NODA, M. KOGA, AND I. TADA. 1999. *Strongyloides ratti*: Additive effect of testosterone implantation and carbon injection on the susceptibility of female mice. *Parasitology Research* 85: 522–526.
- WEINSTOCK, J. V., AND D. ELLIOTT. 2000. The somatostatin immunoregulatory circuit present at sites of chronic inflammation. *European Journal of Endocrinology* 143: S15–S19.
- WILLIS, C., AND R. POULIN. 2000. Preference of female rats for the odours of non-parasitised males: The smell of good genes? *Folia Parasitologica (Praha)* 47: 6–10.
- YOKOYAMA, W. M., AND A. A. SCALZO. 2002. Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. *Microbes and Infection* 15: 1513–1521.
- YU-LEE, L. Y. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Progress in Hormone Research* 57: 435–455.
- ZHANG, H., J. ZHAO, P. WANG, AND Z. QIAO. 2001. Effect of testosterone on *Leishmania donovani* infection of macrophages. *Parasitology Research* 87: 674–676.
- ZHANG, Z., L. CHEN, S. SAITO, O. KANAGAWA, AND F. SENDO. 2000. Possible modulation by male sex hormone of Th1/TH2 function in protection against *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection in mice. *Experimental Parasitology* 96: 121–129.
- ZUK, M. 1994. Immunology and the evolution of behavior. In *Behavioral mechanisms in evolutionary ecology*. L. A. Real (ed.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois, p. 354.
- , AND K. A. MCKEAN. 1996. Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. *International Journal for Parasitology* 26: 1009–1023.