

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Programa de Maestría en Ciencias de la Salud

Caracterización parcial de la proteína PE_PGRS33
(Rv1818c) de *Mycobacterium tuberculosis*, en un
sistema de procesamiento y presentación de antígeno

in vitro

TRABAJO DE TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

Q.B. Paola del Carmen Gastélum Aviña

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2010

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el Trabajo Individual Escrito de **Paola del Carmen Gastélum Aviña**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Dra. Adriana Garibay Escobar
Director Académico

Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Secretario

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Vocal

Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Suplente

AGRADECIMIENTOS

No hay palabras que logren expresar lo mucho que quiero agradecer a todas aquellas personas que colaboraron y me orientaron durante la realización de este trabajo, ya que sin su apoyo, no hubiera sido posible.

A Dios, por no dejarme perder la fe en los momentos más difíciles y darme las fuerzas necesarias para salir adelante después de cada tropiezo.

A mis padres: Mamá: porque has estado conmigo en todo momento, por tu cariño y confianza. Papá: por tu apoyo, cariño y tus sabios consejos. Gracias a los dos por compartir conmigo este logro.

A mi “Abue”, tía Cecy y tía Ofe(†): por su apoyo y cariño incondicional; por encomendarme siempre con Dios para que saliera adelante. Tía Ofe, gracias por esperarme en tu silla esos fines de semana y hasta el final de tus días, para que te contara mis éxitos y fracasos,

A mi familia: tíos y primos, por creer en mí, por su apoyo y cariño incondicional. Ivonne y Juan de Dios, gracias por todos los consejos, por haber estado pendiente de mi salud, así como de mi alimentación física y del alma.

A mi maestra, amiga y asesora Adriana Garibay, por sus consejos, su amistad, su orientación y apoyo en los momentos difíciles.

Al Dr. Carlos Velázquez, por no perder la fe y creer en mí, por sus consejos y apoyo en todo momento.

Al Dr. Ramón Robles, Dra. Olivia Valenzuela y Dr. Eduardo Ruiz por su apoyo en la revisión de este trabajo y por brindarme sus conocimientos en esta etapa de mi desarrollo profesional.

A la Dra. Clara Espitia, del Depto. de Inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la UNAM; por proporcionar la proteína utilizada en este estudio.

Al Laboratorio Ramos por el apoyo en espacio y equipo para la realización de la primera etapa de este estudio.

Al Dr. Humberto Aztiazarán, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo; por el apoyo en espacios y equipos, durante las etapas de huelga.

A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio: Lucila, Jael, Caro Figueroa, Caro Jasso, Dora, Efraín, Gaby, Patty, Ivonne, Nubia, Glauss, Anita, Martín, Estela, Marcos, Moisés, y todos los estudiantes de servicio social, por su gran ayuda y por compartir sus vivencias y experiencias, que hicieron de nuestro “segundo hogar” un lugar más ameno.

A mis grandes amigas y cómplices: Denisse y “brujas”: Betty, Hiesu, “Chapis”, Consuelo, Lilian y Zulema, por todos los momentos que hemos compartido, por las aventuras, desveladas, titulaciones, triunfos y fracasos; gracias por sus palabras de apoyo en esos momentos tan difíciles. “Mija”, gracias por tu amistad, por las noches largas de estudio, trabajo, fiestas y pláticas y por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Alicia, Chary, Caro, Pau y Aarón, que durante la última etapa de este proyecto, compartieron sus tardes de “caffenio” y experiencias dentro y fuera del salón de clases.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera.

A mi Familia y compadres (mamá, papá, “abue”, tía Cecy, Familia Aviña, Ivonne, Juan de Dios, Roberto, Adriana, Katty, Ricardo): por su cariño y apoyo incondicional.

A mi tía Ofe(†), por tus enseñanzas, consejos, por cuidar de mí y por ser una abuela más. Siempre te recordaré.

A mi asesora Adriana Garibay, por ser más que una maestra, por ser una amiga en todo momento y por enseñarme a “enseñar”.

A mis sinodales, por el apoyo durante todas las etapas de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio (Lucila, Jael, Caro Figueroa, Caro Jasso, Dora, Efraín, Gaby, Patty, Ivonne, Nubia, Glauss, Anita, Martín, Estela, Marcos, Moisés): por su amistad y por todos los momentos que compartimos juntos.

A mis amigas (Denisse, Betty, Hiesu, “Chapis”, Consuelo, Lilian y Zulema): por su amistad incondicional y por todas las experiencias vividas.

A ustedes debo este logro y con ustedes lo comparto.

“Lo que tenemos que aprender lo aprendemos haciendo”. *Aristóteles*

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
ANTECEDENTES	6
Relevancia de los Factores de Virulencia de <i>M. tuberculosis</i>	6
Proteína PE_PGRS33 (Rv1818c) de <i>M. tuberculosis</i>	8
Respuesta Inmune en la Tuberculosis	11
Activación de los Linfocitos T	15
Predicción de Péptidos de Unión a Moléculas de MHC	
Clase II de la Proteína PE_PGRS33 de <i>M. tuberculosis</i>	16
Métodos de Análisis de la Activación de los LcT	19
Marcadores de Activación	21
Síntesis de Citocinas	22
Medición de la IL-2	23
Citometría de Flujo	25
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Proteína PE_PGRS33	28
Líneas Celulares	28
Anticuerpos Monoclonales	29

Inmunofenotipificación de los Hibridomas de Células T por Citometría de Flujo	30
Evaluación de la Activación de los Hibridomas de Células T por Citometría de Flujo	31
Ensayo de Activación	32
Tinción Intracelular	33
Evaluación de la Capacidad de Síntesis de IFN-γ de los Hibridomas de Células T Activados por Citometría de Flujo	36
Adquisición y Análisis	37
Digestión Enzimática de la Lisozima de Huevo de Gallina (HEL)	39
Purificación e Identificación de los Epítopes de la Lisozima HEL que Estimulan la Activación del Hibridoma 3A9	40
RESULTADOS	42
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	92
REFERENCIAS	94
ANEXOS	105

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Alanina
ABTS	Ácido 2,2'-azino-6,3-dietilbenstiazolinsulfónico
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATF	Ácido trifluoroacético
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
BFA	Brefeldina
BSA	Albúmina sérica bovina
CPA	Célula presentadora de antígeno
D	Ácido aspártico
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
D5F	Medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino
E	Ácido Glutámico
ELISA	Inmunoensayo absorbente ligado a enzimas
ELISPOT	Ensayo de manchas ligado a enzimas
FACS	Separador de células activado por fluorescencia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL1	Canal de fluorescencia 1
FL2	Canal de fluorescencia 2
g	gravedades
G	Glicina
HEL	Lizosima de huevo de gallina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
I	Ionomicina
I	Isoleucina

I-A ^k	Haplotipo de MHC clase II de ratón
IFN-γ	Interferón Gamma
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-12	Interleucina-12
IL-12R	Receptor de IL-12 o CD25
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
K	Lisina
KDa	KiloDalton
L	Leucina
LcT	Linfocito T
LcT CD4 ⁺	Linfocito T que expresa CD4
LcT CD8 ⁺	Linfocito T que expresa CD8
<i>M. africanum</i>	<i>Mycobacterium africanum</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
<i>M. microtti</i>	<i>Mycobacterium microtti</i>
MTT	Sal de Tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazoliumbromuro]
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	Asparagina
NK	Células asesinas naturales
nm	Nanómetros
NO	Monóxido de nitrógeno
P	Prolina
PBA	Regulador de fosfatos adicionado con albúmina
PBS	Regulador de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Dominio abundante de Prolina y Ácido glutámico

PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína clorofila peridina
PGRS	Secuencia polimórfica repetida abundante en Guanina y Citosina
PHA	Fitohemaglutinina
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinasa C
PMA	Forbol miristato acetato
PTKs	Tirosina quinasa específicas
Q	Glutamina
R	Arginina
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
S	Serina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SFB	Suero Fetal Bovino
STV	Streptavidina
T	Treonina
TCR	Receptor de células T
TH1	Linfocitos T Cooperadores 1
TH2	Linfocitos T Cooperadores 2
TLR2	Receptor tipo Toll 2
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Valina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Y	Tirosina

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Respuesta inmune celular contra <i>M. tuberculosis</i>	14
2. Surco de unión a péptidos de la molécula IA ^k	18
3. Métodos de análisis de la activación de los linfocitos T	27
4. Fenotipo de los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33 de <i>M. tuberculosis</i>	43
5. Cinética de producción de IL-2	45
6. Expresión de la IL-2 intracelular por citometría de flujo	47
7. Gráficas de puntos de la expresión de las moléculas de superficie CD3, IA ^k y TCR de las células M12.A ^k .C3F6 y 3A9	48
8. Fenotipo del hibridoma 3A9 específico para la lisozima de huevo de gallina (HEL)	51
9. Gráficas de puntos de la expresión de IL-2 en los ensayos de presentación con el hibridoma 3A9.	52
10. Cinética de expresión del marcador de activación CD69	55
11. Cinética de expresión del marcador de activación CD25	57
12. Cinética de expresión del marcador de activación CD62L	58
13. Cinética de expresión del IFN- γ	60
14. Expresión de las moléculas de superficie IA ^k - β , CD3- ϵ y TCR- β de la célula presentadora de antígeno y el hibridoma 2F9.E7	62
15. Expresión de las moléculas IL-2, CD25 y CD69 del hibridoma 2F9.E7	63
16. Expresión de las moléculas CD3, CD69, CD25 e IL-2 del hibridoma 2F9.E7 activado con PHA	65
17. Esquema del ensayo de activación de las células mononucleares de bazo de ratón de la cepa C3H/HeJ	68

18. Inmunofenotipificación de las células mononucleares de bazo de ratón C3H/HeJ	69
19. Análisis de la expresión de IL-2 por las células mononucleares de bazo	71
20. Análisis de la expresión de CD69 por las células mononucleares de bazo.	72
21. Evaluación de la producción de IL-2 por ELISA indirecto	73
22. Evaluación de la activación de las células mononucleares de bazo del ratón en presencia y ausencia de BFA por la proliferación de las células CTLL-2	75
23. Sitios de corte de la enzima tripsina en la secuencia de aminoácidos de la proteína PE_PGRS33 generados por el programa PEPTIDE CUTTER	82
24. Evaluación de las fracciones recuperadas de la digestión enzimática de HEL por la proliferación de células CTLL-2	84
25. Electroforesis de los controles de la digestión enzimática en solución de la lisozima HEL.	86

LISTA DE TABLAS

	Página
I. Condiciones de estimulación y tinción para evaluar la activación de hibridomas de células T por citometría de flujo	35
II. Gradiente de los solventes que se utilizó para el análisis por HPLC	41
III. Porcentaje de células que expresan las moléculas de superficie CD3, IA ^k y TCR	49
IV. Porcentaje de células que expresan IL-2 por citometría de flujo	54
V. Secuencia de aminoácidos de la proteína PE_PGRS33 de <i>M. tuberculosis</i>	77
VI. Predicción de los ligandos de unión de proteína PE_PGRS33 a las moléculas de MHC clase II de raton (IA ^k) generados por la base de datos SYFPEITHI	78
VII. Predicción de los ligandos de unión de proteína PE_PGRS33 a las moléculas de MHC clase II de raton (IA ^k) generados por la base de datos del Dr. Unanue	79
VIII. Predicción de péptidos generados por la digestión enzimática de la proteína PE_PGRS33 de <i>M. tuberculosis</i> mediante el algoritmo PEPTIDE CUTTER	81

RESUMEN

La tuberculosis, causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, es la enfermedad infecciosa de mayor incidencia a nivel mundial y representa un serio problema de salud pública. Se conoce de la importancia que tiene la respuesta inmune celular en el combate de la tuberculosis, por lo que la identificación de los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* que inducen esta respuesta y activan a los linfocitos T, resulta de gran interés. El objetivo de este trabajo, fue caracterizar parcialmente la proteína PE_PGSR33 de *M. tuberculosis* en un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*; utilizando los hibridomas de células T específicos contra la proteína, generados previamente (Gastélum 2008). Para ello se evaluó la activación de los hibridomas por su capacidad de síntesis de IL-2 utilizando varias metodologías, como citometría de flujo, proliferación de células CTLL-2 y ELISA indirecto. En este trabajo, se establecieron las condiciones óptimas para evaluar la activación de los hibridomas de células T por citometría de flujo, mediante la expresión de IL-2 y otros marcadores de activación como CD69 y CD25; y se identificó el fenotipo CD3⁺CD4⁺CD8⁻ de los 5 hibridomas específicos contra la proteína PE_PGSR33: 3C2.D4, 3C2.F5, 3C2.E7, 2F9.E7 y 2F9.B7. Además, se realizó un análisis de los posibles ligandos de unión de la proteína a moléculas MHC II (IA^k) por 2 bases de datos y se compararon con las predicciones de los péptidos generados por la digestión con la enzima tripsina obtenidos por el programa PEPTIDE CUTTER. Al comparar ambas predicciones, se encontró que es factible obtener dichos ligandos; por lo tanto, en este estudio se establecieron las condiciones óptimas para la digestión enzimática con tripsina y la purificación de los productos de la digestión por HPLC en fase reversa; que ayudarán a la caracterización bioquímica e inmunológica de la proteína, en futuras investigaciones.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y es la primera enfermedad declarada como emergencia global por la Organización Mundial de la Salud. La TB es considerada como una enfermedad muy compleja, en la que participan factores del hospedero (constitución genética, respuesta inmunológica), de la bacteria (genes y factores de virulencia) y del medio ambiente (pobreza, desnutrición, hacinamiento) (Hernández y col., 2004; Rook y Hernández-Pando, 1996).

En la actualidad, una persona de cada tres está infectada con *M. tuberculosis*, y cada 15 segundos fallece una persona en el mundo, por lo tanto, la tuberculosis es considerada como la enfermedad infecciosa más importante. Sin embargo, solamente del 5 al 10% de la población infectada tiene el riesgo de desarrollar la tuberculosis activa en un plazo de uno a dos años después de la infección (Dye y col., 1999; Van Crevel y col., 2002).

Anualmente se registran cerca de diez millones de nuevos casos de tuberculosis y tres millones de muertes, representando un serio problema de salud pública a nivel mundial. En los países en vías de desarrollo, donde la incidencia de tuberculosis es alta, la mayoría de la población no puede tener acceso al tratamiento y en muchos casos, los fármacos antituberculosos no son efectivos por la aparición de cepas bacterianas multidrogasresistentes.

Por lo tanto, es prioritario el desarrollo de una vacuna más efectiva contra la tuberculosis que brinde una mayor protección a la mayoría de la población; dado que la eficacia protectora de la BCG (Bacilo Calmette-Guerin), la única

vacuna disponible para la prevención de la tuberculosis en los humanos, es muy variable (Flynn y Chan, 2001; Haile y Kallenius, 2005; Newport, 2003).

Por otra parte, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es considerado como un importante factor de riesgo para la tuberculosis, no solo porque la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) incrementa el riesgo de reactivar la infección latente de *M. tuberculosis*, sino que también incrementa la rápida progresión de la tuberculosis inmediatamente después de la infección o reinfección; poniendo de manifiesto la gran importancia que la respuesta inmune tiene en el control de la tuberculosis. La importancia que tiene la respuesta inmune celular en el control de la tuberculosis, es mundialmente conocida, por lo que estudios sobre la inducción de esta respuesta contra antígenos de *M. tuberculosis*, son cada vez más solicitados (Aaron y col., 2004; Dawn y Flynn, 2004; www.tuberculosisTextbook.com).

Para que se genere una respuesta celular eficiente contra *M. tuberculosis*, se necesita la activación de las células T, que tras reconocer específicamente determinantes antigénicos de la micobacteria asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II de las células presentadoras de antígeno (CPA); activan su mecanismo de transducción de señal y transcripción de genes, y codifican para la síntesis de citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ principalmente. Siendo el IFN- γ la citocina de mayor relevancia para erradicar la enfermedad, al inducir en los macrófagos infectados la síntesis de citocinas y sustancias microbicidas (Boyer y col., 1988; Van Crevel y col., 2002).

Sin embargo, *M. tuberculosis* puede evadir la respuesta inmune celular mediante diferentes mecanismos, como lo es la expresión selectiva de genes

que le confieren a la micobacteria la capacidad de infectar y sobrevivir dentro de los macrófagos. Algunos de los genes que se expresan preferentemente pertenecen a la familia de genes PE, en donde la mayoría de los miembros de esta familia están implicados en la replicación y sobrevivencia del bacilo en el granuloma.

Un miembro de esta familia de proteínas es la PE_PGRS33, la cual se puede considerar como el prototipo de la familia de genes PE, ya que presenta como ventajas el encontrarse en la superficie de la micobacteria y quedar expuesta al ambiente extracelular permitiéndole interactuar con las células del huésped (Delogu G y col., 2004; Ramakrishnan y col., 2000). La PE_PGRS33 presenta una secuencia de genes polimórficos, que le confieren la característica de variabilidad antigénica y evadiendo así a la respuesta inmune del hospedero (Cole ST y col., 1998; Gey van Pittius y col., 2006). Se encuentra asociada a las cepas del complejo de *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microtti*) (Karboul y col., 2006); pero sobre todo, el dominio constante amino terminal de su estructura (PE), es el responsable de la inducción de la respuesta inmune celular contra esta proteína (Delogu G y col., 2001). Es por ello que la proteína PE_PGRS33 representa un paso crucial hacia el mejor entendimiento de la patogénesis inducida por el bacilo tuberculoso.

Para poder evaluar la inducción de la respuesta inmune celular de esta proteína, en un sistema *in vitro* de procesamiento y presentación de antígeno, se necesitan herramientas biológicas como los hibridomas de células T; que permitan la caracterización inmunológica de la proteína y la identificación de los epítopes inmunodominantes. La gran ventaja de generar estos hibridomas, es que expresan un receptor de células T (TCR) con la especificidad de las células T activadas de ratón, y proliferan abundantemente en ausencia de factores de crecimiento o células nodrizas (feeder); por lo que son muy útiles

para estudios de especificidad en el reconocimiento antigénico por el complejo MHC-TCR.

En un estudio previo (Gastélum-Aviña, 2008) se generaron 5 hibridomas específicos contra la proteína PE_PGRS33 (3C2, 2F9, 7E7, 2B6 y 3E7), los cuales nos permitirán utilizarlos en futuras investigaciones, para identificar los epítopes o determinantes antigénicos de la proteína, responsables de la inducción de la respuesta inmune celular contra esta proteína.

Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue caracterizar parcialmente la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*, en un sistema de presentación de antígeno *in vitro*; utilizando los hibridomas de células T específicos contra la proteína y evaluar su activación, por la capacidad de síntesis de citocinas, como la IL-2.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar parcialmente la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* en un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la expresión de los marcadores de linaje CD3, CD4 y CD8 de los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33.
- Establecer un método para evaluar la activación de hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33, por citometría de flujo, mediante la síntesis de IL-2 e IFN- γ .
- Evaluar la activación de los hibridomas de células T, en un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*, mediante la síntesis de IL-2 e IFN- γ y la expresión de marcadores por citometría de flujo.
- Establecer las condiciones óptimas para obtener e Identificar los epítopes de la proteína PE_PGRS33 que estimulan la activación de los hibridomas de células T, mediante la síntesis de IL-2.

ANTECEDENTES

Relevancia de los Factores de Virulencia de *M. tuberculosis*

M. tuberculosis se caracteriza por poseer además de su membrana celular, una pared celular con una alta composición de ácidos grasos, ácidos micólicos y peptidoglicanos (única en su tipo dentro de los procariotes); que le confiere las características de su arquitectura y la capacidad de resistir ciertos agentes antimicrobianos (Brennan y Nikaido, 1995). Por lo que la identificación y caracterización de las proteínas localizadas en esta fracción celular pueden ser utilizadas en el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas, de prevención e inmunoprofilaxis (Issar, 2003). Además, las proteínas de la membrana también pueden ser una clave en el desarrollo de vacunas, porque están involucradas en la interacción huésped-patógeno y pueden ser utilizadas por la micobacteria como factores de virulencia del huésped (Cimino y col., 2006; Riley, 2006).

Por otra parte, las estructuras expresadas en la superficie celular de la micobacteria, interactúan con los mecanismos de inmunidad innata del hospedero, influyendo en la producción de citocinas y en el inicio de una respuesta inflamatoria. Esta respuesta inicial, se debe principalmente a la producción del factor de necrosis tumoral (TNF), el cual es importante para la formación y mantenimiento del granuloma. La inducción de la fuerte respuesta inflamatoria y la formación del granuloma resultan ventajosas para la sobrevivencia de *M. tuberculosis*, debido a la diseminación de la micobacteria a través de la degradación eventual del granuloma. Sin embargo, algunas cepas de *M. tuberculosis* suprimen la respuesta inflamatoria y permiten la progresión

temprana de la enfermedad, mientras otras cepas inducen la infección latente mediante una fuerte respuesta inflamatoria (Dheenadhayalan y col., 2006).

Dado los recientes avances en las técnicas de manipulación genética y a la información disponible de la secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis*, (Camus y col., 2002; Cole y col., 1998), se ha podido caracterizar varias proteínas de la micobacteria. Se ha encontrado la existencia de una familia de multigenes conocida como PE, que representa cerca del 4% del genoma de *M. tuberculosis*, la cual se divide en dos subfamilias: PE (38 genes) y PE_PGRS (61 genes). Ambas familias presentan un dominio amino terminal altamente conservado, abundante en prolina y ácido glutámico; pero la familia PE_PGRS se diferencia por presentar en su dominio carboxilo terminal, múltiples repeticiones en “tandem” polimórficas de Glicina-Glicina-Alanina o Glicina-Glicina-Asparagina (Campuzano y col., 2007; Chaitra y col., 2005; Cole y col., 1998; Gey van Pittius y col., 2006).

Los genes PE_PGRS presentan estructuras repetitivas que pueden ser blanco de recombinación homóloga, la cual pudiera explicar el alto polimorfismo observado en estas secuencias, demostrado por análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) con cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* obtenidas de aislados clínicos. Estas observaciones sugieren que los genes PE y PE_PGRS pueden ser expresados diferencialmente entre las cepas (Delogu y col., 2006; Singh y col., 2001; Talarico y col., 2007).

La función de los miembros de las familias PE y PE_PGRS no se conoce en detalle, pero existe evidencia que indica que la mayoría de estos miembros están involucrados en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped, por lo que le confieren a la micobacteria la capacidad de sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos infectados y granulomas. Además, la

mayoría de los miembros de ambas familias se encuentran asociados a la pared celular, por lo que pueden interactuar con componentes extracelulares como la fibronectina e inducir tanto la respuesta inmune celular, como la humoral (Balaji y col., 2007; Banu y col., 2002; Delogu y Brennan, 2001; Espitia y col., 1999).

Por lo anterior, estas familias de proteínas resultan sumamente interesantes desde el punto de vista inmunológico; ya que representan una fuente de variación antigénica para *M. tuberculosis* en el orden de evadir la respuesta inmune del hospedero y como antígenos de superficie celular que interaccionan con las moléculas de los macrófagos (Banu y col., 2002; Flores y Espitia, 2003; Ramakrishnan y col., 2000).

Proteína PE_PGRS33 (Rv1818c) de *M. tuberculosis*

Recientemente se ha encontrado una proteína PE_PGRS33 codificada por el gen Rv1818c de *Mycobacterium tuberculosis* compuesta por 498 aminoácidos; que presenta en su dominio PE amino terminal, una alta homología con los miembros de la familia PE (Cole y col., 1998; Delogu y Brennan, 2001).

La proteína PE_PGRS33 representa el prototipo de la familia PE porque es expresado por miembros del complejo de *M. tuberculosis* y algunas otras especies que infectan humanos y está implicado en la replicación, así como en la persistencia del bacilo en los granulomas. La proteína se localiza en la membrana celular micobacteriana, principalmente en los polos celulares de la micobacteria, por lo que se encuentra expuesta al ambiente extracelular;

sugiriendo que la proteína está involucrada en la interacción con los macrófagos y linfocitos del huésped (Delogu y col., 2004; Karboul y col., 2006).

Algunos antígenos bacterianos que interactúan con las células T durante la presentación de antígeno, inducen la apoptosis de estas células. La apoptosis de células T es considerada como un importante mecanismo de regulación de la respuesta inmune, y está involucrado con la pérdida de funciones efectoras durante muchas enfermedades infecciosas. Sin embargo, aún no se conoce en detalle el mecanismo por el cual ciertos antígenos antimicobacterianos inducen la apoptosis de células T (Balaji y col., 2007).

Por otra parte, se han realizado estudios con el gen Rv1818c que sugieren que este miembro de la familia PE participa en la persistencia de la micobacteria y por lo tanto en la patogénesis de la tuberculosis. Uno de ellos, utilizando mutagénesis mediada por transposón de la cepa de *M. bovis* BCG, en un gen homólogo a Rv1818c de *M. tuberculosis*. Se evaluaron los cambios morfológicos de la cepa silvestre o “wild type” y la cepa recombinante y se encontró que esta última, presentó un crecimiento disperso en el medio de cultivo líquido y una disminución de la habilidad para infectar y sobrevivir dentro de los macrófagos. Pero una vez que el gen mutante se restaura, se vuelve a comportar como la cepa silvestre (Brennan y col., 2001; Talarico y col., 2007).

En un estudio similar, se expresó el gen Rv1818c, en una cepa no patogénica (*Mycobacterium smegmatis*), la cual normalmente no expresa el gen. Se observó que la cepa recombinante presentaba características específicas a las cepas virulentas, ya que es capaz de persistir dentro de cultivos de macrófagos de médula ósea *in vitro*, así como en los tejidos murinos después de una infección intraperitoneal; en comparación con la cepa silvestre. Este resultado no se observa en las cepas de *M. smegmatis* que contienen el vector solo o que expresan sólo el dominio PE de PE_PGRS33. Sin embargo,

es la proteína completa, que contiene el dominio PGRS la que se requiere para aumentar la persistencia de la cepa *M. smegmatis* recombinante en las células y tejidos del huésped (Dheenadhayalan y col., 2006).

En este estudio, se encontró el posible mecanismo por el cual la cepa recombinante de *M. smegmatis* persiste en los cultivos de macrófagos, el cual sugiere que la proteína PE_PGRS33 puede estimular una fuerte respuesta inflamatoria, mediante la inducción en la producción del TNF. El aumento de TNF y la formación del granuloma, resulta ventajoso para la sobrevivencia y transmisión de la micobacteria a través de la degradación eventual del granuloma. Esto sugiere que tras la infección con *M. smegmatis* recombinante resulta en una cascada de eventos que modifica el perfil de citocinas de las células del huésped, las cuales incluyen una secreción aumentada de TNF, dependiente de la vía del receptor tipo Toll 2 (TLR2), la inducción de necrosis celular y el aumento en la persistencia de la micobacteria dentro de los tejidos del huésped (Basu y col., 2007; Dheenadhayalan y col., 2006).

Por otra parte, se evaluó la respuesta inmune humoral y celular inducida por la proteína PE_PGRS33, durante la infección por *M. tuberculosis* en un modelo murino, utilizando constructos de ADN del gen PE_PGRS33 y del gen que codifica solo para el dominio PE, y se observó el desarrollo de una respuesta inmune humoral específica contra la proteína PE_PGRS, pero no contra la proteína recombinante PE, sugiriendo de esta manera que la respuesta humoral se debe solamente a los epítopes presentes en el dominio PGRS. Al evaluar la habilidad de secretar IFN- γ de los esplenocitos de ratones inmunizados, con los dos constructos de ADN después de una reestimulación *in vitro*, con cultivos de macrófagos de médula ósea del ratón infectados con la micobacteria, se observó que solo los esplenocitos de los ratones inmunizados con PE secretaron cantidades significativas de IFN- γ , sugiriendo con ello que el

dominio PE puede inducir una respuesta inmune celular efectiva (Delogu y Brennan, 2001).

Además se evaluó la eficacia de 3 inmunizaciones con ambos constructos de ADN, como vacuna en un modelo experimental de tuberculosis en el ratón, los cuales después de ser inmunizados e infectados vía aérea, se les extrae el pulmón y bazo para realizar una cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) y un análisis histopatológico. Se encontró la misma cantidad de UFC en ambos órganos en los ratones inmunizados con el constructo completo PE_PGRS33, en comparación con los ratones inmunizados solo con el vector; además de que se encontró un infiltrado celular de 50 a 60% y presencia de granulomas. En cambio, el número de UFC en pulmón y bazo de ratones inmunizados solo con el constructo PE, fue menor en comparación con los ratones inmunizados con el vector, pero esta disminución no fue tan significativa como en los ratones inmunizados con *M. bovis* BCG como control. Sin embargo, en el análisis histopatológico se encontró poco infiltrado celular del 20 al 30% (Delogu y Brennan, 2001).

Respuesta Inmune en la Tuberculosis

La respuesta inmune contra antígenos específicos resulta en una amplia variedad de actividades biológicas. Estas actividades incluyen la estimulación de la producción de citocinas por las células inmunes, la expresión de antígenos de superficie específicos de la activación, y la proliferación de clones antígeno-específicas (Collins, 2000).

La respuesta inmune celular contra *M. tuberculosis* es fundamental para combatir la infección, ya que en la mayoría de los casos (90% de la población

infectada) resulta eficiente y no progresa a la enfermedad. Sin embargo, el riesgo de desarrollarla aumenta considerablemente con la presencia de alteraciones en el sistema inmune, como la coinfección por el VIH. En el 10% de la población infectada restante, la micobacteria no puede ser eliminada completamente y puede persistir en estado de latencia por años. Una vez que la micobacteria ha ingresado al organismo a través de gotas de aerosol provenientes de personas infectadas, entra a las vías respiratorias, donde los macrófagos alveolares representan la primera línea de defensa contra este patógeno (Van Crevel y col., 2002; <http://www.tuberculosisTextbook.com>).

Los macrófagos son las principales células que participan en el control de la tuberculosis, pues fagocitan y destruyen a las micobacterias, además de que regulan al sistema inmunológico a través de la secreción de diversas citocinas. Las interacciones iniciales entre la micobacteria y el macrófago tienen lugar a través de los receptores celulares como son: los receptores de Fc, de complemento, de manosa, de proteína surfactante, CD14 y CD43. No se sabe si la bacteria interactúa con uno o más receptores durante la infección, pero se cree que el macrófago responde dependiendo del tipo de receptor con el que la micobacteria interactúa (Hernández y col., 2004).

Cuando el macrófago ingiere a la micobacteria, se forma una vacuola intracelular conocida como fagosoma, la cual posteriormente madura a través de la progresiva acidificación y la posterior fusión con el lisosoma. Finalmente el fagosoma maduro contiene enzimas y un ambiente ácido necesario para desnaturalizar y degradar el material fagocítico. Sin embargo, la micobacteria puede desarrollar diferentes mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped, incluyendo la inhibición de la actividad antimicrobiana de los macrófagos y el escape de la vía de maduración fagosomal (Gomes y col., 1999; Pedroza-González y col., 2004; Rook y Hernández-Pando, 1996).

La capacidad de los macrófagos para eliminar a la micobacteria depende de la respuesta inducida por las citocinas producidas por la activación del macrófago como la IL-12. Esta citocina es la principal mediadora del desarrollo de una respuesta tipo TH1 y una reacción de hipersensibilidad de tipo tardío, cruciales en el control de la infección; promoviendo la síntesis de IFN- γ por parte de los linfocitos T (LcT) CD4+, LcT CD8+ y células NK. Por otra parte, tanto el IFN- γ como la IL-12 son esenciales para el desarrollo de LcT citotóxicos CD8+ capaces de matar a macrófagos infectados por *M. tuberculosis* e inducir la proliferación linfocitaria incrementando así, el número de células inmunocompetentes que contribuyen a mantener bajo control a las micobacterias (Doherty y Anderson, 2005; Van Crevel y col., 2002; Zúñiga y col., 2000).

El IFN- γ producido por los LcT, activa a los macrófagos, induciendo en ellos la síntesis de enzimas como la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). La iNOS genera la producción de óxido nítrico (NO), el cual reacciona con los radicales libres de oxígeno formando compuestos muy inestables, que contribuyen con la eliminación de la micobacteria. Por otro lado, los macrófagos activados también secretan grandes cantidades de IL-1, citocina que al igual que el TNF contribuye a activar a los macrófagos y además estimula la producción de IL-2 y su receptor (figura 1) (Hernández y col., 2004; Rook y Hernández, 1996).

Estudios recientes han mostrado que defectos genéticos en la vía TH1 de la IL-12 e IFN- γ , o en sus receptores, puede resultar en el incremento de la susceptibilidad a infecciones micobacterianas (Garibay y col., 2003; Jouanguy y col., 1999; Rook y col., 2007; Zúñiga y col., 2000; www.tuberculosisTextbook.com).

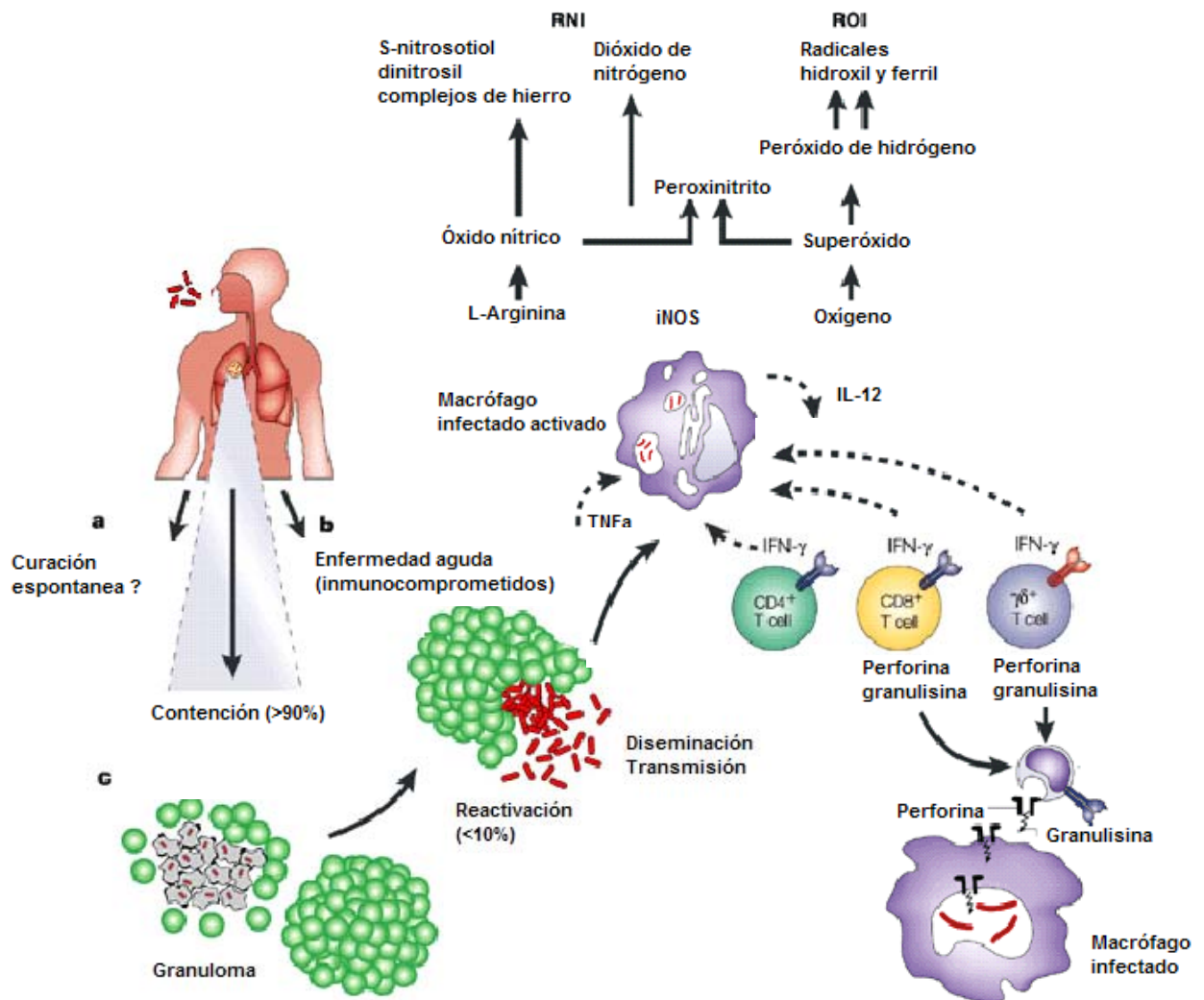


Figura 1. Respuesta inmune celular contra *M. tuberculosis*. La respuesta inmune celular contra *M. tuberculosis* resulta en una amplia variedad de actividades biológicas, que incluye la estimulación de la producción de citocinas por las células inmunes, como IL-12 e IFN- γ ; y la activación de linfocitos T citotóxicos CD8+ y macrófagos que contribuyen con la eliminación de la micobacteria. (Imagen modificada de Kaufmann. Nature Reviews Immunology. 2001. 1:20-30).

Activación de los Linfocitos T

La activación de los LcT representa el primer paso en el desarrollo de la respuesta inmune antígeno específica. Esta activación depende de una cascada de eventos regulados, que resultan en la expresión de receptores de citocinas, producción y secreción de citocinas y en la expresión de marcadores de activación de la superficie celular, que eventualmente dirigen la respuesta inmune (Reddy y col., 2004; Collins, 2000).

Los LcT reconocen antígenos proteicos unidos a moléculas del MHC. El mecanismo involucrado en la producción del complejo MHC-péptido se conoce como procesamiento de antígeno. Este procesamiento se lleva a cabo dentro de las CPA (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) e involucra la proteólisis de los antígenos proteicos para producir péptidos, que son unidos a moléculas del MHC, así como el transporte de los complejos formados MHC-péptido hacia la superficie celular. La presentación de antígeno resulta de la expresión de los complejos MHC-péptidos en la superficie de las CPA y el reconocimiento de éstos por los LcT (Germain, 1994; Germain y Margulies, 1993).

Finalmente los LcT son activados por la interacción de su receptor TCR con moléculas de MHC unidas a péptidos, localizadas en la superficie de las CPA. Es decir, los LcT reconocen secuencias lineales de residuos de aminoácidos, de péptidos derivados de proteínas bioquímicamente procesadas dentro de las CPA, conocidos como epítopes. Estos epítopes son reconocidos en la superficie de las CPA en asociación con las moléculas de MHC clase II y solamente son seleccionados los péptidos inmunodominantes que exhiben una alta afinidad por las moléculas de MHC (Nelson y col., 1992; Stone y col., 2001).

Para el caso de los LcT citotóxicos CD8+, estos péptidos son generalmente de 8 a 10 aminoácidos de longitud y se unen con moléculas del MHC clase I, mientras que los LcT cooperadores CD4+ reconocen péptidos de 12 a 25 aminoácidos de longitud y se unen a moléculas del MHC clase II. Por lo tanto, la identificación y caracterización de estos péptidos o epítopes resulta interesante para evaluar y monitorear la respuesta inmune mediada por células (Turner y col., 2001).

El reconocimiento antigénico es un proceso muy sensible, donde pocos complejos péptido-MHC (1-50) son suficientes para activar una cascada de eventos celulares que inducen la producción de citocinas, la división celular o la muerte celular. Entre los eventos celulares generados por la interacción MHC-péptido-TCR se encuentran: la fosforilación de las subunidades del receptor, la inducción de la vía de señalización y la regulación de diferentes factores de transcripción. Además, se requiere de la participación de moléculas de adhesión y moléculas coestimuladoras tanto de los LcT como de las CPA, en el sitio de sinapsis inmunológica, para la completa activación celular (Cochran y col., 2000; Evavold y col., 1994; Germain, 1994; Kalergis y col., 2001).

Predicción de Péptidos de Unión a Moléculas de MHC Clase II de la Proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*

Como se mencionó anteriormente, el MHC de clase II, es una glicoproteína de membrana que se expresa en todas las CPA profesionales y es la responsable de presentar fragmentos del antígeno a las células T para que se activen; por lo que se han realizado varios estudios para caracterizar los diferentes haplotipos de MHC, tanto en humano, como en ratón y así poder definir su estructura y afinidad a péptidos. El haplotipo I-A^k (MHC clase II de

ratón) es uno de los haplotipos mayormente estudiado, y se ha encontrado que la molécula presenta un surco de unión a péptidos constituido por “pockets” o bolsillos (denominados P1, P2...P9) donde se unen los aminoácidos individualmente, se ha visto también que estos péptidos tienen una longitud variable de 13 a 25 aminoácidos, siendo solamente 9 los que constituyen el motivo de unión al surco del MHC (Fremont y col., 1998; Gugasyan y col., 1998; Suri y col., 2006).

Por estudios de cristalografía y espectrometría de masas, se ha logrado identificar cuales son los aminoácidos que preferentemente se unen a los “pockets” del haplotipo I-A^k, encontrándose que los aminoácidos situados en los “pockets” P1 (D), P4 (I), P6 (Q) y P9 (S), son los que determinan la especificidad y la unión al MHC, mientras que los aminoácidos unidos a los “pockets” P2 (Y), P5 (L) y P8 (N) son los que interaccionan con el TCR. Siendo el ácido aspártico situado en P1 el de mayor relevancia en la interacción MHC-péptido (figura 2) (Fremont y col., 1998; Suri y col., 2005).

Un método cada vez más utilizado para identificar los epítopes antigénicos de una proteína, responsables de la inducción de la respuesta inmune celular, es hacer uso de los algoritmos y modelos matemáticos existentes, que permiten hacer estimaciones sobre los posibles péptidos de unión a las moléculas de MHC de clase I y II de diferentes especies. Esta información está disponible en programas como el SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/home.htm>). De tal manera que, con las predicciones de los epítopes potenciales de células T y los hibridomas generados previamente (Gastélum-Aviña, 2008), podamos contribuir con la búsqueda de conocimientos que permita comprender los mecanismos de inducción de la respuesta inmune celular mediada por la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* (Yu y col., 2002).

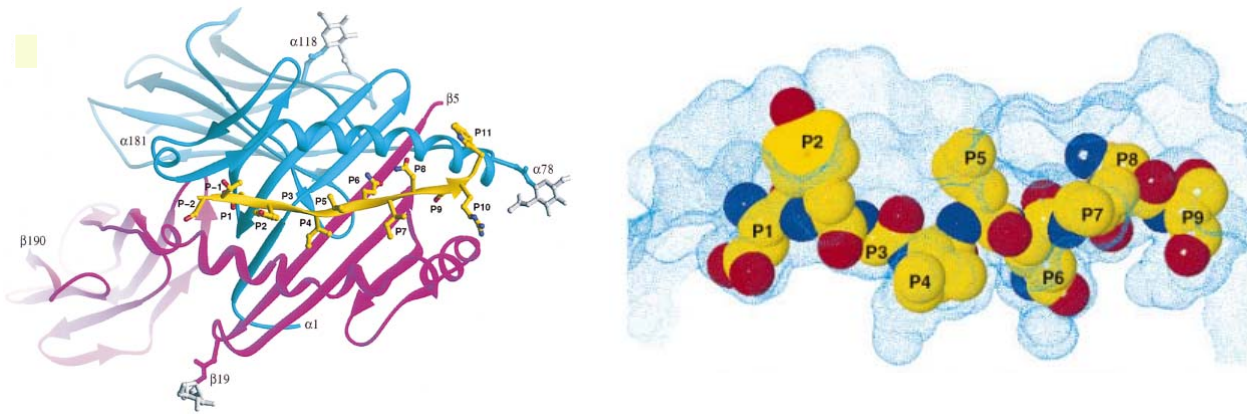
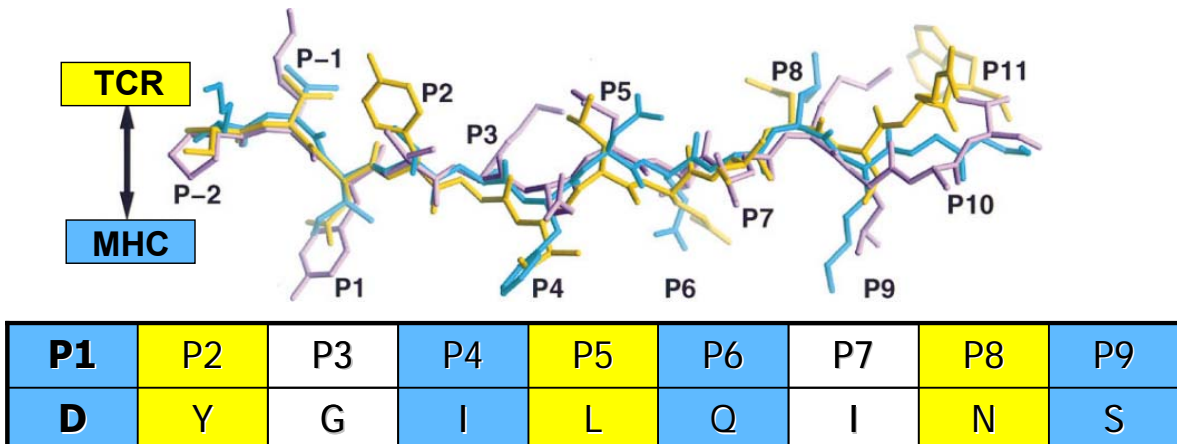


Figura 2. Surco de unión a péptidos de la molécula I-A^k. Los aminoácidos situados en los “pockets” P1 (D), P4 (I), P6 (Q) y P9 (S), son los que determinan la especificidad y la unión al MHC, mientras que los aminoácidos unidos a los “pockets” P2 (Y), P5 (L) y P8 (N) son los que interactúan con el TCR. Siendo el ácido aspártico situado en P1 el de mayor relevancia en la interacción MHC-péptido (Fremont y col., 1998; Suri y col., 2005).

Las bases de datos disponibles para predecir péptidos de unión a moléculas de MHC, permite encontrar los epítopes de células T que se unen a los diferentes tipos de alelos del MHC para una secuencia de aminoácidos dada. Para este estudio, se sometió la secuencia de aminoácidos de la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*, en las bases de datos SYFPEITHI y otra generada por el grupo de investigación del Dr. Emil R. Unanue (Departamento de Patología e Inmunología, Universidad de Washington, Estados Unidos), (<http://beckerexhibits.wustl.edu/mig/bios/unanue.html>); para encontrar los aminoácidos que presentan una mayor afinidad al surco de unión del MHC II (haplotipo I-A^k de ratón).

Métodos de Análisis de la Activación de los LcT

La activación de los LcT puede evaluarse *in vitro* induciendo este proceso en las células T, de forma dependiente e independiente de antígeno. La activación dependiente de antígeno se lleva a cabo mediante la vía MHC-TCR evaluando de esta manera, la respuesta a determinado antígeno como proteínas de *M. tuberculosis*.

Una vez que se lleva a cabo la presentación del antígeno específico, se inicia el proceso de activación de los LcT por las vías de señalización, las cuales consisten en: la inducción de proteínas tirosina quinasas específicas (PTKs), la ruptura de la fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), la activación de la proteína quinasa C (PKC) y la elevación de la concentración de calcio intracelular. Esta cascada de eventos se transmite hacia el núcleo y resulta en la expansión clonal de los LcT, la sobrerregulación de los marcadores de activación en la superficie celular, la diferenciación a células efectoras, la inducción de citotoxicidad o secreción de citocinas y la inducción de apoptosis.

Es por esto, que uno de los principales métodos para analizar la activación de los LcT, es medir la proliferación celular tras la estimulación *in vitro* de los LcT, vía antígeno específico o con anticuerpos agonistas del TCR.

Por otra parte, se pueden utilizar agentes mitógenos que inducen la activación policlonal de los linfocitos, independiente de la interacción MHC-péptido. Entre los agentes farmacológicos mayormente utilizados para la activación de los LcT, están los ésteres de forbol como el forbol miristato acetato (PMA) y los ionóforos de calcio como la ionomicina (I), los cuales inducen la activación de la proteína quinasa C (PKC) y el aumento del calcio intracelular, respectivamente. Dado que el calcio participa como un mensajero transmembranal durante las señales de activación de los linfocitos.

También se utilizan lectinas de origen vegetal, las cuales son glicoproteínas que se unen a carbohidratos en forma reversible y específica en los receptores celulares, como la fitohemaglutina (PHA) y la concanavalina A. Éstas, se unen directamente al TCR causando la activación de los LcT de manera independiente a la vía MHC (Reddy y col., 2004; Sharon y Lis, 1989).

Además se pueden utilizar polisacáridos provenientes de bacterias gram negativas como el lipopolisacárido y toxinas bacterianas como las de *Staphylococcus aureus* (TSS-1) o enterotoxinas, que son conocidas como superantígenos. Los superantígenos son potentes activadores policlonales de LcT, los cuales unen la porción V β del TCR y lo entrecruzan con la parte externa del MHC, fuera del surco de unión al antígeno; de esta forma, se entrecruzan de modo inespecífico los LcT con las CPA. El resultado es que un gran número de clones de LcT que sintetizan grandes cantidades de citocinas (Petersson y col., 2004).

Sin embargo, por muchos años el estudio de la respuesta inmune celular estuvo limitada por la dificultad de producir y mantener clones de LcT humanos antígeno específico *in vitro*; por lo que en las últimas décadas se desarrolló una técnica que permite fusionar células T antígeno específico, con células provenientes de tumor (inmortal), para generar hibridomas de células T. Estos hibridomas resultan más convenientes de usar para estudios *in vitro* de la presentación de antígenos por las CPA, ya que representan una fuente ilimitada de células (Canaday y col., 2003). Los hibridomas de células T son utilizados principalmente, como una herramienta para detectar complejos MHC-péptido expresados en cualquier tipo celular; y una vez que son activados por los complejos específicos, los hibridomas de células T pueden secretar IL-2, la cual se puede cuantificar por Inmunoensayo ELISA, conocido también como inmunoanálisis enzimático o bien, por bioensayos con células CTLL-2 (Harding, 2007). Además, se puede evaluar el papel de los LcT cooperadores, como su actividad y funcionalidad, especificidad de su receptor, seguimiento a infecciones o inmunizaciones y clarificación de los mecanismos de procesamiento de antígeno y selección de epítopes, entre otros (Dzhambazov y col., 2003).

Por lo tanto, se puede evaluar la respuesta inmune celular inducida por antígenos de *M. tuberculosis*, en un sistema *in vitro* de procesamiento y presentación de antígeno con los hibridomas de células T; que permitan la caracterización inmunológica de los antígenos y la identificación de los epítopes inmunodominantes.

Marcadores de activación

Existen diferentes métodos para monitorear la activación de los LcT, uno de ellos es evaluar la expresión de marcadores de activación de la superficie

celular, los cuales se expresan dependiendo del estado de activación de las células; es decir, hay marcadores de activación tempranos y tardíos. Entre los más importantes destacan el CD69 (temprano) y el CD25 (tardío) (Reddy y col., 2004; Stone y col., 2001).

El CD69 es una glicoproteína que no se encuentra presente en la superficie de los LcT en reposo, pero se expresa una vez que el LcT es activado por la estimulación del TCR/CD3 con ésteres de forbol como el PMA. Cuando la PKC es activada simultáneamente por el PMA, la estimulación del CD69 induce la expresión del gen de IL-2 e IFN- γ , aumenta la expresión de CD25 y finalmente la proliferación del LcT dependiente de IL-2. El CD69 es considerado como el marcador más temprano de activación en células inducidas por el antígeno o por agentes inductores como PMA, ionomicina o PHA. Por lo que esta molécula resulta muy útil para analizar la activación de los linfocitos *in vitro*, por ser un marcador rápido y sensible (Mardiney y col., 1996; Testi y col., 1989).

El CD25, o receptor de IL-2 (IL-2R) es considerado como el principal marcador de la activación celular, ya que su expresión se induce en los LcT después de la activación por la estimulación con el complejo MHC-TCR o con agentes mitógenos (Reddy y col., 2004).

Síntesis de Citocinas

Además de la inducción de los marcadores de activación, los linfocitos activados pueden producir diferentes citocinas las cuales reflejan el estado de activación y diferenciación de la célula. Las citocinas son mediadores de la respuesta inmune las cuales actúan a través de su receptor específico en las células.

En la infección por *M. tuberculosis* hay una interacción entre macrófagos y LcT que induce la activación de los mismos, induciendo la síntesis de citocinas de tipo TH1 como son IL-2, IL-12 e IFN- γ principalmente; por lo que el análisis de éstas, resulta interesante para evaluar la respuesta inmune celular inducida contra *M. tuberculosis*.

La IL-12 producida por los macrófagos activados induce la producción de interferón gamma (IFN- γ) en los LcT, la cual es una citocina esencial en la respuesta inmune protectora del hospedero contra la tuberculosis. Además, los LcT activados producen IL-2 la cual dirige la expansión de los LcT antígeno específico principalmente (Doherty y Anderson, 2005; Reddy y col., 2004; Van Crevel y col., 2002).

El papel central del IFN- γ en el control de la tuberculosis se ha demostrado por la alta susceptibilidad a la infección micobacteriana en ratones “knockout” del gen de IFN- γ ; y en humanos, por las mutaciones en el receptor de IFN- γ . Por lo tanto, la identificación de los antígenos inmunodominantes micobacterianos, que activan a los linfocitos T para que proliferen y secreten IFN- γ , pudieran ser utilizados para el desarrollo de vacunas efectivas contra la tuberculosis (Van Crevel y col., 2002; Skeiky y col., 2000).

Medición de la IL-2

La unión del antígeno con el TCR estimula la producción de IL-2 y la expresión de su receptor IL-2R (CD25), y la interacción IL-2/IL-2R estimula el crecimiento, diferenciación y sobrevivencia de los LcT por la expresión de genes específicos. Por lo tanto, la unión de la IL-2 con su receptor juega un papel importante en la regulación de la activación de LcT (Rose y col., 1992).

La evaluación de la síntesis de IL-2 por los LcT activados se puede llevar a cabo por diferentes metodologías, siendo el ELISA el más utilizado para evaluar la producción de la citocina. Esta técnica se fundamenta en la interacción antígeno-anticuerpo, la cual combina la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de un ensayo enzimático. Esta metodología, resulta útil para medir las concentraciones de antígenos solubles como citocinas, quimiocinas, mediadores inflamatorios y sus receptores; así como inmunoglobulinas, componentes solubles de antígenos y moléculas de adhesión presentes en los diferentes fluidos biológicos y sobrenadantes de cultivos celulares (Crowther, 2001).

El ELISA tipo “sandwich”, es un ensayo inmunoenzimático que se basa en la adsorción no covalente de anticuerpos de captura antígeno-específico purificados a placas de poliestireno, que permitirán la unión de los analitos solubles presentes en una muestra. Posteriormente, se adiciona un segundo anticuerpo de detección antígeno específico, conjugado a una enzima, que permita evidenciar la unión antígeno-anticuerpo, tras la adición de una solución del sustrato enzimático acoplado a un cromógeno. La intensidad del color desarrollado por el cromógeno será proporcional a la cantidad del analito presente en la muestra y se puede medir espectrofotométricamente (Crowther, 2001).

Por otra parte, además del ELISA, la producción de citocinas puede ser detectada a nivel celular por: ensayo de manchas ligado a enzimas (ELISPOT), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativo, análisis de hibridación *in situ* y citometría de flujo.

Otro método empleado en los ensayos de presentación de antígeno, es el que utiliza una línea celular dependiente de IL-2 para su crecimiento, como la

CTLL-2, para medir la activación de hibridomas. La CTLL-2 es un LcT citotóxico, el cual expresa constitutivamente el receptor de IL-2 y se usa en bioensayos de proliferación para evaluar la presencia de la IL-2 en cultivos de LcT o hibridomas de células T activados. La proliferación de las CTLL-2 se puede medir por la incorporación de timidina tritiada en el ADN de las células o por ensayos colorimétricos como la reducción de una sal de tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazoliumbromuro] al compuesto formazán, ocasionado por el metabolismo de las células activas. Sin embargo, aunque esta línea celular es utilizada frecuentemente para medir la activación celular de manera indirecta, el cultivo continuo de ésta, provoca pérdida de la sensibilidad y confiabilidad de la misma (Khatri y col., 2007; Weston y col., 1998).

Citometría flujo

En los últimos años el estudio de las citocinas a nivel celular por citometría de flujo, se ha convertido en una herramienta indispensable en el área de la biología celular; así como en determinar el patrón de citocinas que producen las subclases de LcT y su relación con las enfermedades. La citometría de flujo es un procedimiento altamente eficiente para caracterizar poblaciones celulares y poder identificar el fenotipo celular, así como muchos parámetros estructurales y funcionales, utilizando anticuerpos fluoromarcados.

Entre las muchas ventajas que presenta esta metodología, es que se pueden analizar un número muy elevado de células en pocos segundos, detectar la expresión de diferentes citocinas, receptores de citocinas, marcadores de activación y cuantificar la intensidad de fluorescencia. Además, el análisis multiparamétrico en la citometría permite la detección simultánea de una, dos o más citocinas, las cuales cuando se combinan con la determinación

del fenotipo celular permite la detección de los perfiles TH1 y TH2 de los LcT (Collins, 2000).

Dos importantes descubrimientos en los años 90 revolucionaron esta área de la biología. Primero, se describió un método por microscopía de fluorescencia para detectar citocinas intracelulares utilizando: la fijación con paraformaldehído, la permeabilización de la célula con detergentes que perforan la membrana celular, como la saponina, para que penetre el anticuerpo a las células y una tinción indirecta por inmunofluorescencia. Después se adaptó este método para evaluar a las células estimuladas en presencia de monensina o brefeldina (BFA) la cual inhibe el transporte vesicular de proteínas, acumulando las citocinas en el aparato de Golgi. Esto resulta en el aumento de la señal de la citocina, la cual facilita su detección sin esperar su secreción al medio de cultivo y disminuyendo así, el tiempo de análisis aún cuando el número de células productoras de citocinas sea pequeño (Jung y col, 1993).

Los LcT en reposo no producen o producen poca cantidad de citocinas, por lo que la estimulación *in vitro* se requiere para inducir la expresión del gen de las citocinas. El PMA y la ionomicina son los agentes estimulantes mayormente utilizados para este fin. Por lo tanto, la detección de citocinas intracelulares por citometría de flujo es un ensayo rápido, sencillo y semicuantitativo, que permite hacer diferentes mediciones simultáneamente, sin separar o clasificar previamente las poblaciones celulares, para determinar las especies productoras de citocinas en una población celular heterogénea (figura 3) (Baran y col., 2001; Collins, 2000; Garibay y col, 2003; Jung y col, 1993).

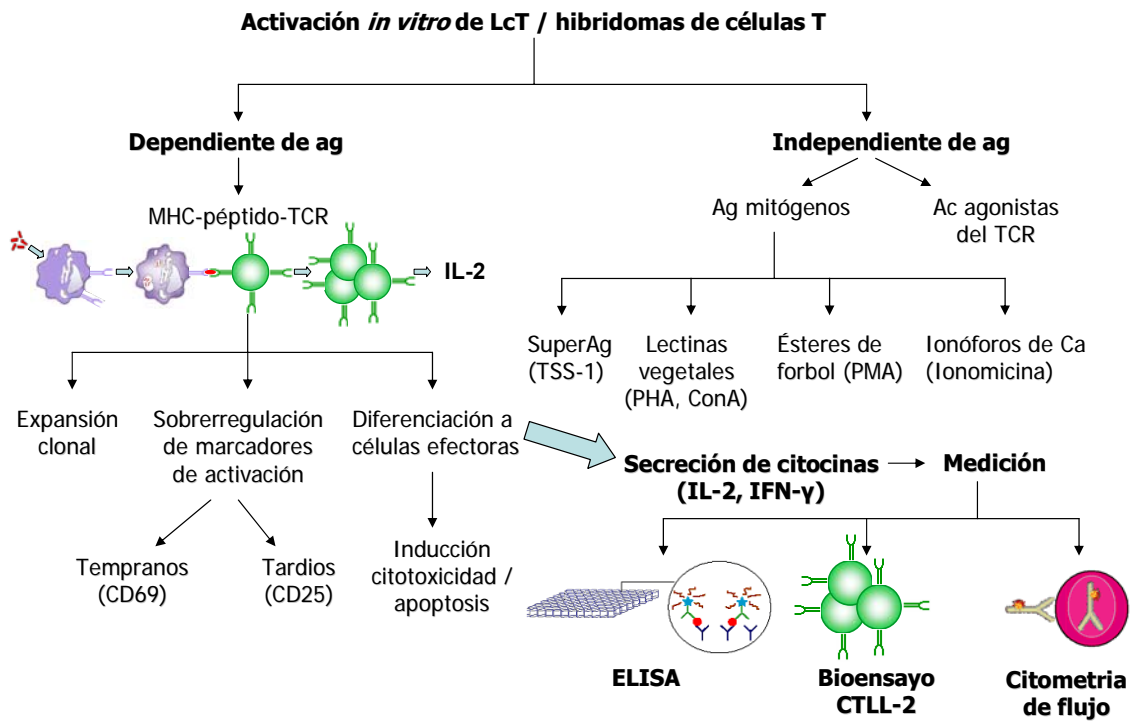


Figura 3. Métodos de análisis de la activación de los linfocitos T. La activación de los LcT puede evaluarse *in vitro* induciendo este proceso en las células T, de forma dependiente e independiente de antígeno. Existen diferentes métodos para monitorear esta activación de los LcT, como evaluar la expresión de marcadores de activación de la superficie celular y la medición de las citocinas producidas, las cuales reflejan el estado de activación y diferenciación de los linfocitos T (Reddy y col., 2004; Stone y col., 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Proteína PE_PGRS33

La proteína PE_PGRS33 de *Mycobacterium tuberculosis* que se utilizó en este estudio, fue proporcionada amablemente por la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, del Departamento de Inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, a una concentración de 0.75 mg/mL en solución reguladora Tris-HCl 80mM-pH 8.0. La masa molecular relativa de la proteína es de 40.7 KDa y el punto isoeléctrico de 3.9.

Líneas Celulares

Para la realización del estudio se utilizaron las siguientes líneas celulares: M12.A^k C3.F6, línea celular proveniente de linfoma de células B de ratón; hibridoma 3A9, específico para la lisozima de huevo de gallina (HEL) e hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* (3C2.F5, 3C2.D4, 3C2.E7, 2F9.B7 y 2F9.E7). Estos hibridomas fueron generados mediante la fusión de la línea celular BW5147 $\alpha\beta^{-}$, con las células obtenidas de ganglios linfáticos popítleos de ratones C3H/HeJ, inmunizados con una emulsión de la proteína PE_PGRS33 y adyuvante completo de Freund; utilizando polietilenglicol 1500 como agente fusionante (Gastélum-Aviña, 2008). Las líneas celulares M12.A^k C3.F6 y 3A9 fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Emil Unanue, del Departamento de Patología e Inmunología de la Universidad de Washington, Estados Unidos. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂, en Medio Eagle

Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFB), inactivado por calentamiento.

Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales fluoromarcados anti-ratón que se utilizaron para las tinciones celulares son los siguientes: anti-CD3-FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD4-PE, anti-CD8-PE, anti-IL2-PE (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD69-PE, anti-IFN- γ -PE (BD-Pharmingen, San Diego CA, USA), anti-IgG2b-PE (control de isotipo para IL-2) (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-IgG1-FITC (control de isotipo para CD3), STV-PE, STV-PerCP. Los anticuerpos 40F-biotina y CD25-biotina se utilizaron para realizar una tinción indirecta con la STV-PE y STV-PerCP respectivamente. Los fluorocromos FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina) y PerCP (proteína clorofila peridina) emiten luz a una longitud de onda de 530 nm, 585 nm y 650 nm respectivamente.

Los anticuerpos monoclonales anti-ratón que se utilizaron en el ELISA son: anticuerpo de rata anti-IL-2 y anticuerpo de rata anti-IL-2-biotina, ambos obtenidos de BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA. Se utilizó STV-HRP (Zymed, Carlsbad, CA, USA) junto con el anticuerpo anti-IL-2-biotin para detectar la reacción inmunoenzimática.

Inmunofenotipificación de los Hibridomas de Células T por Citometría de flujo

Los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* se ajustaron a una concentración final de 0.5×10^6 células/mL, utilizando para ello una cámara de Neubauer y el colorante azul de tripano. Las células de cada hibridoma se resuspendieron en 5 mL de medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (D5F) y se colocaron en tubos de ensaye FACS para citometría de flujo, 1 mL por tubo.

Posteriormente se llevó a cabo la tinción de superficie, para evaluar la expresión del marcador de linaje o fenotipo de los linfocitos T; utilizando los siguientes anticuerpos fluoromarcados: anti-mouse-CD3-Biotina, STV-PE, anti-mouse-CD4-FITC y anti-mouse-CD8-FITC.

Primero, las células de cada hibridoma se centrifugaron a 500 xg por 7 minutos y se decantó el sobrenadante. Al botón celular obtenido de uno de los tubos, se le adicionó una mezcla de anticuerpos anti-CD3-Biotina y anti-CD4-FITC en un volumen final de 100 μ L; y al segundo tubo se le adicionó 100 μ L de anti-CD3-Biotina y anti-CD8-FITC a una concentración final de 0.5 μ g/mL de cada anticuerpo.

Las células de los otros 3 tubos restantes, se utilizaron como controles de tinción y se utilizó el mismo volumen y concentración final de anticuerpos que los otros tubos. Las células del primer tubo se mantuvieron sin teñir, solamente se resuspendieron en medio de cultivo D5F/Azida (Azida de sodio al 0.02 %) y se utilizaron como control para ajustar la fluorescencia. El otro tubo se marcó con un anticuerpo irrelevante al sistema, como control de isotipo del anti-CD4-FITC y anti-CD8-FITC el cual es el anti-mouse-IgG1-FITC, que tiene el

mismo isotipo del los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 (IgG1). El tercer tubo se utilizó como control de la interacción Estreptavidina-Biotina, para lo cual, las células fueron teñidas solamente con STV-PE.

Las células sin teñir y marcadas, se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos, en ausencia de luz. Posteriormente se lavaron con 3 mL de regulador de fosfatos adicionado de albúmina (PBA 0.1% BSA) y se centrifugó a 650 xg por 5 minutos a temperatura ambiente.

Después de desechar el sobrenadante, las células teñidas con el anti-CD3-Biotina y anti-CD4 o anti-CD8-FITC, se incubaron con 100 μ L de STV-PE bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo de la primera incubación; así como el lavado posterior. Finalmente, después del lavado, el botón celular se resuspendió en 200 μ L de medio de cultivo y las células se fijaron con 200 μ L de p-formaldehído al 2% y se filtraron sobre tela de organza para su posterior adquisición en un citómetro de flujo FACScalibur® (Becton Dickinson) (Anexo 1).

Evaluación de la Activación de los Hibridomas de Células T por Citometría de Flujo

Con la finalidad de evaluar la activación de los hibridomas de células T por citometría de flujo, se implementó una técnica para medir la expresión de IL-2 intracelular, así como los marcadores de activación celular CD69 y CD25 (IL-2R). Para ello, se utilizó la proteína lisozima de huevo de gallina (HEL) como un antígeno modelo, un hibridoma de células T específica para la proteína HEL (3A9) y la célula presentadora de antígeno (M12.A^k C3.F6).

Para estandarizar la medición de la IL-2 intracelular mediante citometría de flujo, se realizó una cinética de expresión de la IL-2 entre 10 y 16 horas, para establecer el tiempo óptimo de activación del hibridoma 3A9 con su antígeno-específico HEL.

Ensayo de Activación

Se realizaron bioensayos de hibridomas de células T, en un sistema de procesamiento y presentación de la proteína PE_PGRS33 *in vitro*, utilizando como células presentadoras una línea proveniente de linfoma de células B (M12.A^k.C3F6), las cuales presentan el mismo haplotipo de MHC II que los hibridomas de células T (I-A^k). Se evaluaron los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33: 3C2.D5, 3C2.F4, 3C2.E7, 2F9.B7 y 2F9.E7. Los hibridomas y la línea M12.A^kC3.F6 se contabilizaron, para ajustar la concentración final de cada una a 1×10^6 células/mL y se ajustó la concentración de la proteína PE_PGRS33 a 0.5 μ M con medio D5F (Anexo 2).

Posteriormente, se calculó el número total de células necesarias para llevar a cabo el ensayo, en base al número de pozos que se requieren, y se colocaron en placas de 96 pozos: 100 μ L (100,000 células) de la suspensión de hibridomas de células T, 50 μ L (50,000 células) de la suspensión de células M12.A^kC3.F6 y 50 μ L de la proteína PE_PGRS33, por pozo. Se utilizaron como control negativo de activación: 100,000 hibridomas, 50,000 células M12.A^kC3.F6 y 50 μ L de medio D5F por pozo, en lugar de la proteína. Se incubaron a los tiempos definidos por la cinética de expresión de IL-2 (16 horas).

Por otra parte, se utilizaron como control máximo de activación, hibridomas estimulados con PMA e Ionomicina, a una concentración final de 25

ng/mL y 10 µg/mL respectivamente. Estos agentes farmacológicos se adicionaron a las células, 4 horas antes de terminar el ensayo de activación. La concentración final del control sin teñir y el control máximo de activación, se ajustó a 750,000 células/mL y se adicionaron 200 µL de la suspensión a cada pozo, para que hubiera el mismo número de células que los pozos con hibridomas y CPA (150,000 células).

Para poder analizar posteriormente la expresión de IL-2 por citometría de flujo, fue necesario adicionar un reactivo como la BFA, que inhibe el transporte vesicular de las células y retiene la citocina sintetizada en el interior del aparato de Golgi, y de esta manera, realizar una tinción intracelular. Por lo tanto, se adicionó BFA a una concentración final de 10 µg/mL a cada uno de los pozos, durante las últimas 4 horas del ensayo de activación, dado que la BFA fue tóxica a mayor tiempo.

Tinción Intracelular

Se llevó a cabo una tinción intracelular de los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33, para evaluar la expresión de IL-2 y CD3, la expresión de los marcadores de activación de superficie CD69 y CD25, y la expresión de las moléculas de I-A^k por las CPA. La expresión de CD3 permitió evaluar solamente la IL-2 proveniente de los hibridomas y no de la CPA, durante el ensayo de presentación de antígeno, ya que es un marcador de linaje de LcT.

Se comparó la expresión de IL-2 entre los pozos con CPA e hibridomas activados en presencia de la proteína y los pozos con las CPA y los hibridomas, en ausencia de la proteína; y también se evaluó la expresión de la molécula I-

A^k en las células M12.A^k.C3F6, utilizando el anticuerpo 40F específico contra esta molécula.

Además se utilizaron varios controles, entre ellos: controles sin teñir (pozo con solo hibridomas de células T y otro pozo con hibridomas, CPA y la proteína), control de isotipo del anticuerpo anti-IL-2 (IgG2b), control de isotipo del anticuerpo anti-CD3 (IgG1) y control de streptavidina (STV). Este último, se utilizó porque la tinción con el anticuerpo 40F, se realizó de manera indirecta, con el anticuerpo 40F biotinilado y la STV marcada con ficoeritrina (PE). En la tabla I, se observa el esquema de los sistemas y controles, con las diferentes condiciones de activación y tinción, para cada uno de los pozos.

Posterior a las 16 horas de incubación, se adicionó 100 µL de medio D5F/Azida a cada uno de los pozos y se centrifugó a 650 xg por 5 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y al botón celular se le adicionó 100 µL de la solución cytofix-cytoperm (Becton Dickinson) para permeabilizar las células y que el anticuerpo pudiera internalizarse. Las células se resuspendieron uniformemente y se incubaron por 20 minutos en ausencia de luz a 4 °C. Después se lavaron 2 veces con 200 µL de la solución “perm-wash” (Becton Dickinson), centrifugando a 650 xg, por 5 minutos a 4 °C.

De igual manera, se descartó el sobrenadante y se adicionó la mezcla de anticuerpos fluoromarcados correspondiente para cada pozo, a una concentración final de 0.5 µg/mL y un volumen final de 100 µL y después se resuspendieron uniformemente las células. A los pozos de los controles sin teñir, se le adicionaron 100 µL de D5F/Azida. Se incubaron las células 30 minutos, a 4 °C y en la oscuridad y posteriormente se lavaron 2 veces con la solución “perm-wash” de la misma manera y se decantó el sobrenadante.

Tabla I. Condiciones de estimulación y de tinción para evaluar la activación de hibridomas de células T por citometría de flujo.

Sistemas y controles	Condiciones de activación	Condiciones de tinción (Anticuerpos anti-ratón fluoromarcados)
1) Control sin teñir	Hibridoma	---
2) Control máximo de activación	Hibridoma + PMA/I ^a	Anti-CD3-FITC + anti-IL-2-PE
3) Control sin teñir	Hibridoma + CPA + PE_PGRS33	----
4) Sistema de expresión IL2	Hibridoma + CPA + D5F	Anti-CD3-FITC + anti-IL-2-PE
5) Sistema de expresión IL2	Hibridoma + CPA + PE_PGRS33	Anti-CD3-FITC + anti-IL-2-PE
6) Sistema de expresión I-A ^k	Hibridoma + CPA + D5F	40F-biotina → STV-PE ^b
7) Sistema de expresión I-A ^k	Hibridoma + CPA + PE_PGRS33	40F-biotina → STV-PE ^b
8) Sistema de expresión CD69 y CD25	Hibridoma + CPA + D5F	Anti-CD3-FITC + anti-CD69-PE + anti-CD25-biotina→STV-PerC ^b
9) Sistema de expresión CD69 y CD25	Hibridoma + CPA + PE_PGRS33	Anti-CD3-FITC + anti-CD69-PE + anti-CD25-biotina→STV-PerC ^b
10) Control de isotipo anti-IL2-PE (IgG2b)	Hibridoma + CPA + PE_PGRS33	Anti-IgG2b-PE
11) Control de isotipo anti-CD3-FITC (IgG1)	Hibridoma + CPA + PE_PGRS33	Anti-IgG1-FITC
12) Control STV	Hibridoma + CPA + PE_PGRS33	STV-PE / STV-PerCP

(^a) Hibridomas activados con 25 ng/mL de PMA y 10 µg/mL de Ionomicina (I). (^b) Tinción indirecta utilizando el sistema biotina-streptavidina (STV). CPA, Célula Presentadora de Antígeno.

Se adicionaron 100 μ L de D5F/Azida a los pozos ya teñidos y se pasaron a tubos de ensaye FACS, a excepción de las células que se tiñeron con STV-PE. Las células a las que se le adicionó el anticuerpo 40F-biotina o CD25-biotina, se les añadió en este paso, 100 μ L de STV-PE y se incubaron 20 minutos a 4 °C y en la oscuridad. Después se lavaron 2 veces, y al botón celular resultante se le adicionó 200 μ L de medio de cultivo y las células se transfirieron a tubos de FACS.

Finalmente, se adicionaron 200 μ L de p-formaldehído al 2% a cada tubo y se filtraron las células sobre tela de organza para su posterior adquisición. La adquisición de las células se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACScanto® (Becton Dickinson).

Evaluación de la Capacidad de Síntesis de IFN- γ de los Hibridomas de Células T Activados por Citometría de Flujo

Para evaluar si los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*, son capaces de producir IFN- γ , se llevó a cabo un ensayo de activación mediante un sistema de presentación de antígeno *in vitro*, y se midió la expresión de IFN- γ intracelular por citometría de flujo.

Se ajustó la concentración celular de cada uno de los hibridomas y de las células M12.A^k.C3F6, a 1×10^6 células/mL. Se colocó por pozo, 100 μ L de la suspensión de hibridomas, 50 μ L de la suspensión de CPA y 50 μ L de la suspensión 0.5 μ M de la proteína PE_PGRS33 o en su lugar 50 μ L de medio D5F, a placas de cultivo de 96 pozos y se incubó por 16 horas a 37 °C, en una

atmósfera de CO₂. Se adicionó BFA a una concentración final de 15 ng/mL a cada uno de los pozos, durante las últimas 4 horas del ensayo de activación.

Posteriormente, se centrifugaron las células a 500 xg por 7 minutos y se decantó el sobrenadante. Las células se permeabilizaron con 100 µL de la solución “cytofix-cytoperm” (Becton Dickinson) y se incubaron por 20 minutos en ausencia de luz a 4 °C. Después se lavaron 2 veces con 200 µL de la solución “perm-wash” (Becton Dickinson), centrifugando a 650 xg, por 5 minutos a 4°C. Al botón celular obtenido de cada uno de los pozos, se le adicionó una mezcla de anticuerpos anti-CD3-FITC y anti-IFN-γ-PE en un volumen final de 100 µL; a una concentración final de 0.5 µg/mL de cada anticuerpo. Se utilizaron células sin teñir como control, a las cuales se les adicionó 100 µL de medio D5F/Azida y células teñidas con el control de isotipo anti-CD3.

Las células sin teñir y marcadas, se incubaron a 4 °C por 30 minutos, en ausencia de luz. Posteriormente se lavaron 2 veces con 200 µL de la solución “perm-wash” (Becton Dickinson) y se centrifugaron. El sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en 200 µL de medio de cultivo y se transfirieron a tubos FACS, las cuales se fijaron con 200 µL de p-formaldehído al 2%. Finalmente, las células se filtraron sobre tela de organza para su posterior adquisición.

Adquisición y Análisis

La adquisición de las células se realizó en un citómetro de flujo FACSCanto® (Becton Dickinson) y se adquirieron 10 000 eventos totales. Para el análisis de los resultados, de la expresión de CD3, CD4, CD8, IL-2, I-A^k, IFN-

y y de los marcadores de activación CD69 y CD25, se utilizó el programa FACSDiva.

Para el análisis de la expresión de los marcadores de fenotipo CD4 y CD8 de los hibridomas de células T, se estableció una región R1 sobre la población de hibridomas marcados con anti-CD3-FITC, el cual se detectó en el citómetro por el canal de fluorescencia FL1. Posteriormente se interpretó la lectura del canal de fluorescencia FL2, como los hibridomas marcados con anti-CD4-PE o anti-CD8-PE. Estos resultados de la inmunofenotipificación se evaluaron con el programa WinMDi, ya que las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur® (Becton Dickinson).

Por otra parte, para evaluar activación de los hibridomas de células T, se estableció nuevamente una región R1 sobre la población de los hibridomas marcados con anti-CD3-FITC, para posteriormente evaluar la expresión de IL-2, CD69, CD25 e IFN- γ , y de esta manera poder excluir la expresión de estas moléculas en la población de CPA. Las lecturas de la fluorescencia emitida por los anticuerpos fluoromarcados unidos a IL-2, CD69 e IFN- γ , se midió en el canal de fluorescencia FL2; y para la lectura del CD25, en el FL3. Se comparó la expresión de estas moléculas entre los hibridomas que fueron estimulados con la proteína, y los que no.

Finalmente para medir la expresión de la molécula I-A^k en las CPA, se estableció una región R1 en la población M12.A^k.C3F6, y se midió la lectura en el canal FL2, para el anticuerpo 40F-biotina-STV-PE.

La interpretación y el análisis de los resultados de los datos de tamaño, complejidad celular y fluorescencia, fueron analizados con el software FACSDiva y se presentaron en forma de gráficas de puntos ("dot plot") e histogramas con la intensidad de fluorescencia, para cada uno de los hibridomas. Finalmente se comparó la expresión de las diferentes moléculas

entre los hibridomas activados y los hibridomas no activados (ausencia de la proteína en el sistema de presentación).

Digestión Enzimática de la Lisozima de Huevo de Gallina (HEL)

Para llevar a cabo una digestión enzimática de cualquier proteína, se necesita desnaturalizar previamente la proteína y romper los enlaces disulfuro presentes en ella. Para la digestión de la lisozima HEL, se disolvió 1 mg de la ésta en 100 μ L de solución reguladora TRIS-HCl 100 mM . urea 6 M, y se le adicionó 5 μ L de una solución de DTT 200 mM. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se adicionó 20 μ L de una solución de iodoacetamida 200 mM y se dejó incubar a temperatura ambiente y en ausencia de luz, por una hora. Después de este tiempo, se adicionó 775 μ L de agua ultra pura para reducir la concentración de urea inicial de 6 M a 0.6 M.

Posterior a la desnaturalización y reducción de la proteína, se llevó a cabo su digestión enzimática en solución. Para ello, se adicionó 100 μ L de una solución de tripsina comercial, cuya relación molar de la enzima con respecto a la proteína a digerir fue de 1:50. La mezcla de reacción se dejó incubar a 37 °C durante 12 H.

Para obtener los productos de la digestión, se adicionó 100 μ L de una solución de ácido trifluoroacético (ATF) al 1% y se centrifugó a 600 g por 25 minutos para precipitar los péptidos obtenidos durante la digestión. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 100 μ L de agua ultra pura y se almacenó a -20 °C para posteriormente determinar los productos de la digestión mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa.

Como control negativo del proceso de digestión se utilizó un tubo con la mezcla de reacción (urea, DTT, iodoacetamida y tripsina) en las mismas condiciones, pero sin proteína (Anexo 4).

Purificación e Identificación de los Epítomos de la Lisozima HEL que Estimulan la Activación del Hibridoma 3A9

Los péptidos obtenidos de la digestión enzimática en solución, de la lisozima, se separaron por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) en fase reversa utilizando una columna Varian (c18, 250 x 4.6; 300-5) y agua grado HPLC.

Las soluciones que se utilizaron durante el análisis por HPLC fueron las siguientes: solvente A (Agua 99.94% - ATF 0.06% v/v) y solvente B (ACN 80% - ATF 0.052%). El volumen de muestra que se inyectó fue de 20 μ L, la cual fue previamente filtrada por una membrana de 0.22 μ m. El detector se ajustó a una longitud de onda de 210 – 240 nm, y el flujo que se utilizó fue de 1 mL/min y se colectaron fracciones cada minuto durante 130 minutos.

El gradiente de los solventes que se utilizó para las corridas cromatográficas se muestra en la tabla II.

Después de la obtención de los péptidos de la lisozima purificados por HPLC, se evaluó la activación de los hibridomas de células T por bioensayo con células CTLL, utilizando estos péptidos para los ensayos de activación. El procedimiento que se llevó a cabo fue igual a los mencionados anteriormente.

Tabla II. Gradiente de los solventes que se utilizó para el análisis por HPLC.

Tiempo (min)	% Solvente A	% Solvente B
0	98	2
5	98	2
10	96	4
15	92	8
20	85	15
60	65	35
85	60	40
100	25	75
110	5	95
130	2	98

RESULTADOS

Los Hibridomas 3C2.D4, 3C2.F5, 3C2.E7, 2F9.B7 y 2F9.E7 Expresan los Marcadores CD3 y CD4

Se realizó una inmunofenotipificación de los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33: 3C2.D4, 3C2.F5, 3C2.E7, 2F9.B7 y 2F9.E7. Se evaluó la expresión de los marcadores de linaje de los linfocitos T (CD3, CD4 y CD8), utilizando los anticuerpos fluoromarcados anti-mouse-CD3-Biotina, STV-PE, anti-mouse-CD4-FITC y anti-mouse-CD8-FITC.

En la figura 4 se observan los histogramas que muestran la intensidad de fluorescencia de los 2 fluorocromos utilizados (PE y FITC) para los 5 hibridomas específicos.

En los histogramas se observa una sola población CD3⁺ y CD4⁺, para las 3 subclonas del hibridoma 3C2 (3C2.D4, 3C2.F5, 3C2.E7) y las 2 subclonas del hibridoma 2F9 (2F9.B7, 2F9.E7), y no se observan poblaciones CD8⁺. Por lo tanto el fenotipo de los 5 hibridomas es CD3⁺CD4⁺ CD8⁻.

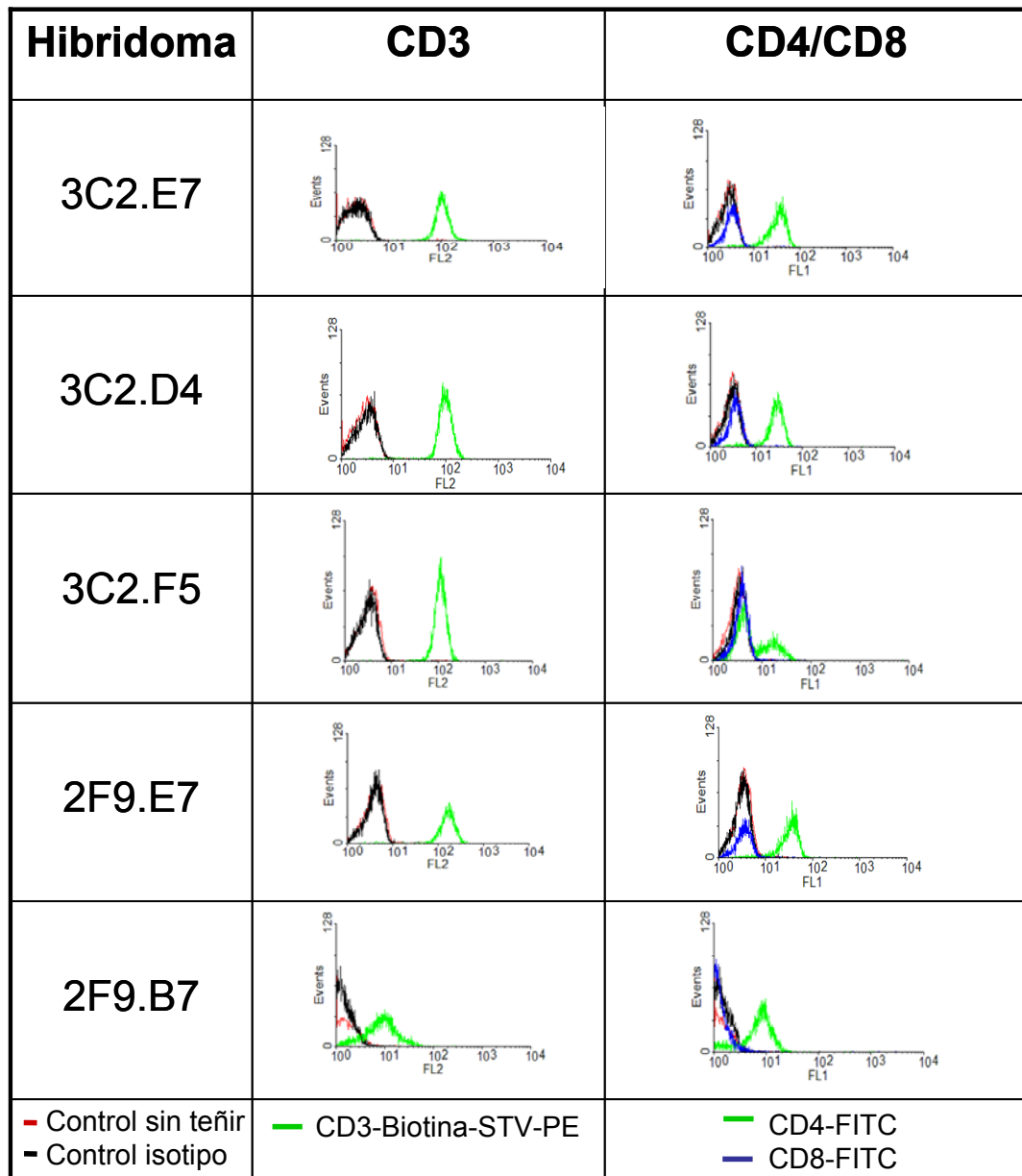


Figura 4. Fenotipo de los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*. El fenotipo de los 5 hibridomas fue CD3⁺CD4⁺CD8⁻ y se utilizaron para la tinción los anticuerpos fluoromarcados anti-mouse-CD3-Biotina, STV-PE, anti-mouse-CD4-FITC y anti-mouse-CD8-FITC. (FL1, canal de fluorescencia 1 para el fluorocromo FITC; FL2, canal de fluorescencia 2 para el fluorocromo PE; STV, Estreptavidina).

Cinética de Producción de la IL-2 por el Hibridoma 3A9

Se realizó una cinética de producción de la IL-2 de los ensayos de presentación de antígeno *in vitro* con el hibridoma 3A9; recuperando el sobrenadante de los ensayos de activación desde las 4 hasta las 24 horas. Lo anterior, con la finalidad de conocer el tiempo aproximado en el que se secreta la citocina al medio de cultivo. Se evaluaron los sobrenadantes de los ensayos de activación, midiendo la proliferación de las células CTLL-2.

En la figura 5 se observa el resultado de la cinética de los ensayos de activación. A partir de las 16 horas de cultivo, el hibridoma activado secretó la IL-2 al medio de cultivo (anexo 3).

Cinética de Expresión de la IL-2 por el Hibridoma 3A9

Con la finalidad de establecer un método para evaluar la activación de los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33 por citometría de flujo; se realizó una cinética de expresión de la IL-2 entre 10 y 16 horas, para determinar el tiempo óptimo de activación, que permita medir la expresión de la IL-2 intracelular. Para ello, se utilizó el hibridoma 3A9 con su antígeno-específico HEL (la secuencia de aminoácidos del epítipo reconocido por 3A9 es ${}_{46}\text{NTDGSTDY}\text{GILQINSR}_{61}$).

El tiempo de esta cinética se definió en base al resultado de la cinética de producción de IL-2 (figura 5), ya que se encontró que a partir de las 16 horas se secreta al medio, por lo tanto; para poder evaluar la expresión de la citocina intracelularmente por citometría de flujo, el ensayo de activación debe durar menos de 16 horas.

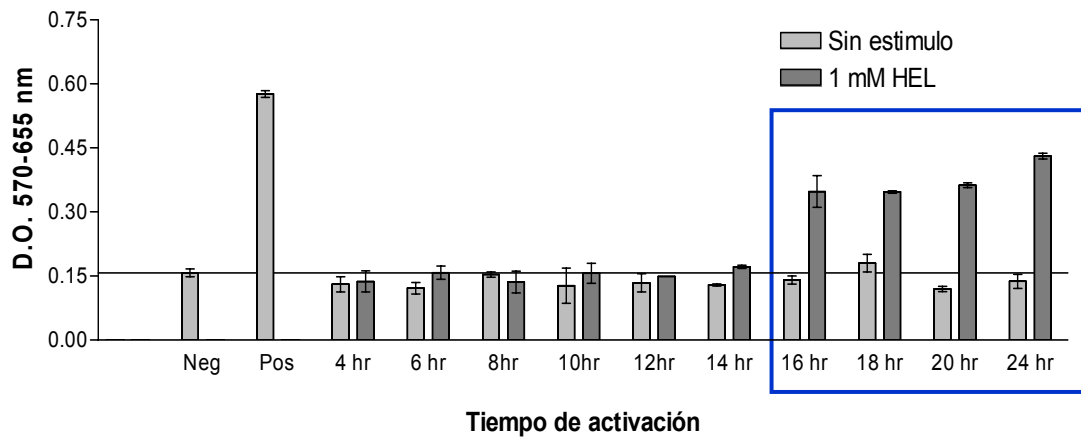


Figura 5. Cinética de producción de IL-2. Se realizaron ensayos de presentación de antígeno con el hibridoma 3A9 y el antígeno HEL a una concentración de 1 mM, a diferentes tiempos de estimulación (4 - 24 horas). El sobrenadante de los ensayos de activación se evaluó midiendo la proliferación de las células CTLL-2. En la figura se observa que a partir de las 16 horas de presentación, la IL-2 fue secretada al medio de cultivo y favoreció la proliferación de las células CTLL-2. Se utilizaron como controles internos: células CTLL-2 más IL-2 (100 U/mL) (positivo) y células CTLL-2 más medio D5F (negativo). La línea basal indica el valor de la D.O. del control negativo 0.16.

Se evaluaron 3 tiempos de activación (10, 13 y 16 horas), pero para poder medir la IL-2 intracelularmente, se adicionó brefeldina (BFA) a una concentración final de 10 µg/mL, durante las últimas 4 horas del ensayo de presentación.

En la figura 6 se observa que la expresión de la IL-2 intracelular, se pudo detectar por citometría de flujo, después de las 16 horas de estímulo del hibridoma.

Las Células M12.A^k C3.F6 Expresan la Molécula IA^k-β y el Hibridoma 3A9 Expresa el Receptor TCR-β

La expresión de las moléculas directamente involucradas en la presentación de antígenos se evaluó por citometría de flujo. Se determinó la expresión de la cadena β de la molécula IA^k, en la línea celular M12.A^k C3.F6 y la expresión de la cadena β del receptor de linfocitos T (TCR) en el hibridoma 3A9.

Después del ensayo de activación *in vitro* del hibridoma 3A9 con su antígeno específico, se marcaron las células con el anticuerpo anti-CD3-FITC, para determinar la población CD3⁺ que representa al hibridoma 3A9 y distinguirlo de las células presentadoras M12.A^k C3.F6 que no expresan la molécula CD3. El porcentaje de células CD3⁺ (3A9) fue del 59.6% y el resto (40.4%) corresponde a la población C3F6 (figura 7), (tabla III).

A

	Ensayo de activación		BFA
T1 (10 hr) →	6 hr	+	4 hr
T2 (13 hr) →	9 hr	+	4 hr
T3 (16 hr) →	12 hr	+	4 hr

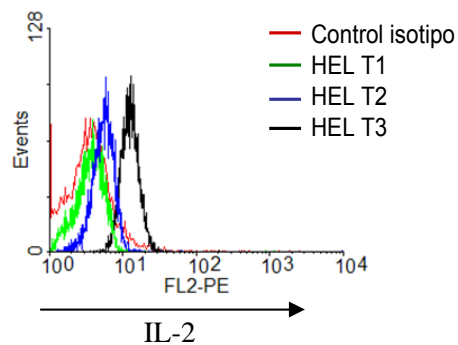
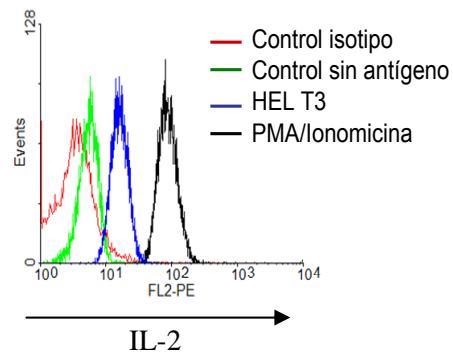
B**C**

Figura 6. Expresión de la IL-2 intracelular por citometría de flujo. Para evaluar la expresión de IL-2 del hibridoma 3A9 después de los ensayos de activación, las células se permeabilizaron con una solución “cytofix-cytoperm” (Becton Dickinson) y fueron teñidas con los anticuerpos fluoromarcados anti-CD3-FITC y anti-IL-2-PE. **A.** Esquema de los 3 tiempos (T1, T2 y T3) que se utilizaron para los ensayos de presentación. **B.** Histograma que muestra la expresión de IL-2 a los 3 tiempos del ensayo de activación con la lisozima de huevo de gallina. **C.** Histograma que muestra la expresión de IL-2 del ensayo de presentación de antígeno a las 16 horas (T3), con el control negativo (ausencia de antígeno) y el control positivo de activación (PMA a una concentración de 25 ng/mL e Ionomicina a 1 µg/mL). Se utilizó como control de isotipo del anticuerpo anti-IL2 (IgG2b), el anticuerpo anti-IgG2b-PE.

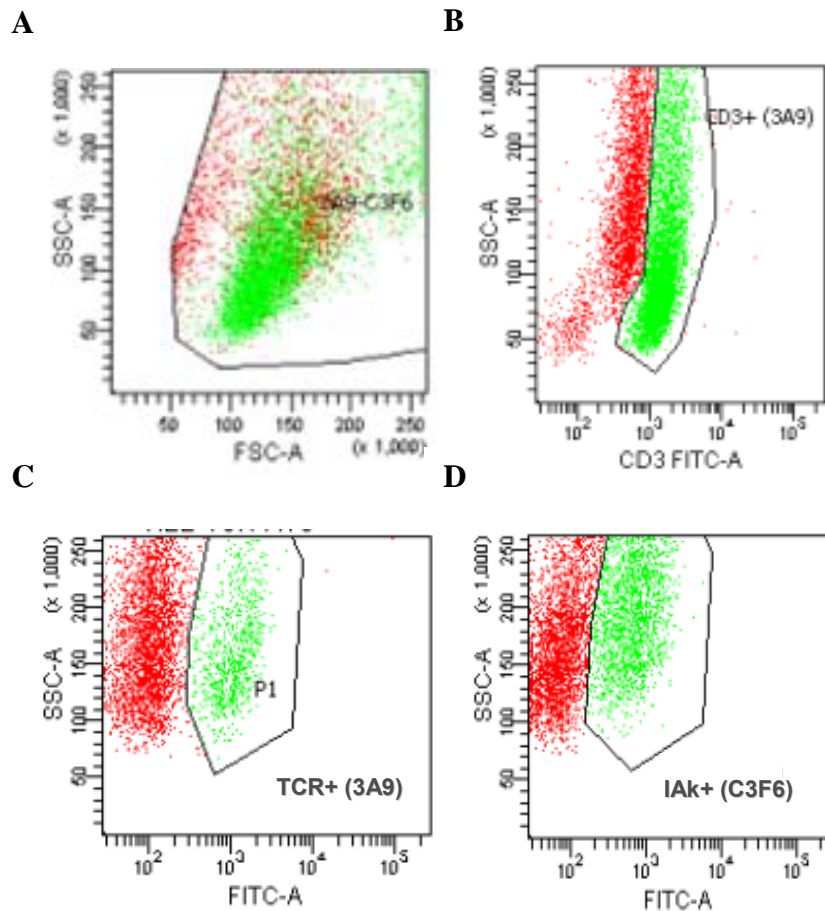


Figura 7. Gráficas de puntos de la expresión de las moléculas de superficie CD3, IA^k y TCR de las células M12.A^k C3.F6 y 3A9. **A.** Gráfica de puntos de tamaño y complejidad celular de las 2 poblaciones celulares. **B.** Gráfica de puntos que muestra la expresión de la molécula CD3, para distinguir la población del hibridoma 3A9 (CD3⁺). **C.** Gráfica de puntos que muestra la expresión del receptor TCR en el hibridoma. **D.** Gráfica de puntos que muestra la expresión de la molécula IA^k en las células presentadoras.

Tabla III. Porcentaje de células que expresan las moléculas de superficie CD3, IA^k y TCR.

Población	No. Eventos	% Subpoblación (Parent)	% Total
3A9-C3F6	10,000	100.0	100.0
└─> CD3 ⁺ (3A9)	5,960	59.6	59.6
└─> TCR ⁺	2,431	40.8	24.3
└─> CD3 ⁻ (C3F6)	40,400	40.4	40.4
└─> IA ^k	2,610	64.6	26.1

Se adquirieron 10,000 eventos para cada condición, y los datos fueron analizados con el software FACSDiva. El porcentaje de células CD3⁺ que representa al hibridoma 3A9 fue del 59.6%, del cual, sólo el 40.8% expresó la cadena β del TCR. El porcentaje de células que no expresaron la molécula CD3 fue del 40.4% y la expresión de la cadena β de la molécula IA^k en esta población fue del 64.6%.

Cabe señalar, que el 100% de la población de hibridomas 3A9, expresó la molécula CD3 en un análisis independiente, en el que se fenotipificó este hibridoma a manera de control. En la figura 8, se observa el resultado de la tinción del hibridoma con los anticuerpos anti-CD3-Biotina conjugado con STV-PE, y los anticuerpos anti-CD4-FITC y anti CD8-FITC. El fenotipo del hibridoma 3A9 es CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻.

Por otro lado, se encontró que sólo el 40.8% de la población CD3⁺ o 3A9, expresó la cadena β del TCR y el 64.6% de la población CD3⁻ o M12.A^k C3.F6 expresó la cadena β de la molécula IA^k. Lo anterior hace suponer que el ensayo de presentación no se da en las mejores condiciones (tabla III).

El Hibridoma 3A9 no Expresa IL-2 Detectable por Citometría de Flujo

Se realizaron ensayos de presentación de antígeno con el hibridoma 3A9, para evaluar su activación por citometría de flujo. Se evaluó la expresión de la IL-2 intracelular bajo las condiciones obtenidas en la cinética de expresión de ésta, es decir, 16 horas. Cuatro horas antes de terminar el ensayo se adicionó brefeldina y así, evitar que la citocina se secretara al medio.

Para el análisis de la expresión de IL-2, primero se seleccionó la población CD3⁺, para poder evaluar únicamente al hibridoma; el porcentaje de células con este fenotipo fue de aproximadamente un 60%. De esta población se comparó la expresión de la IL-2, entre las células provenientes de los ensayos de presentación, en ausencia y presencia del antígeno correspondiente (figura 9).

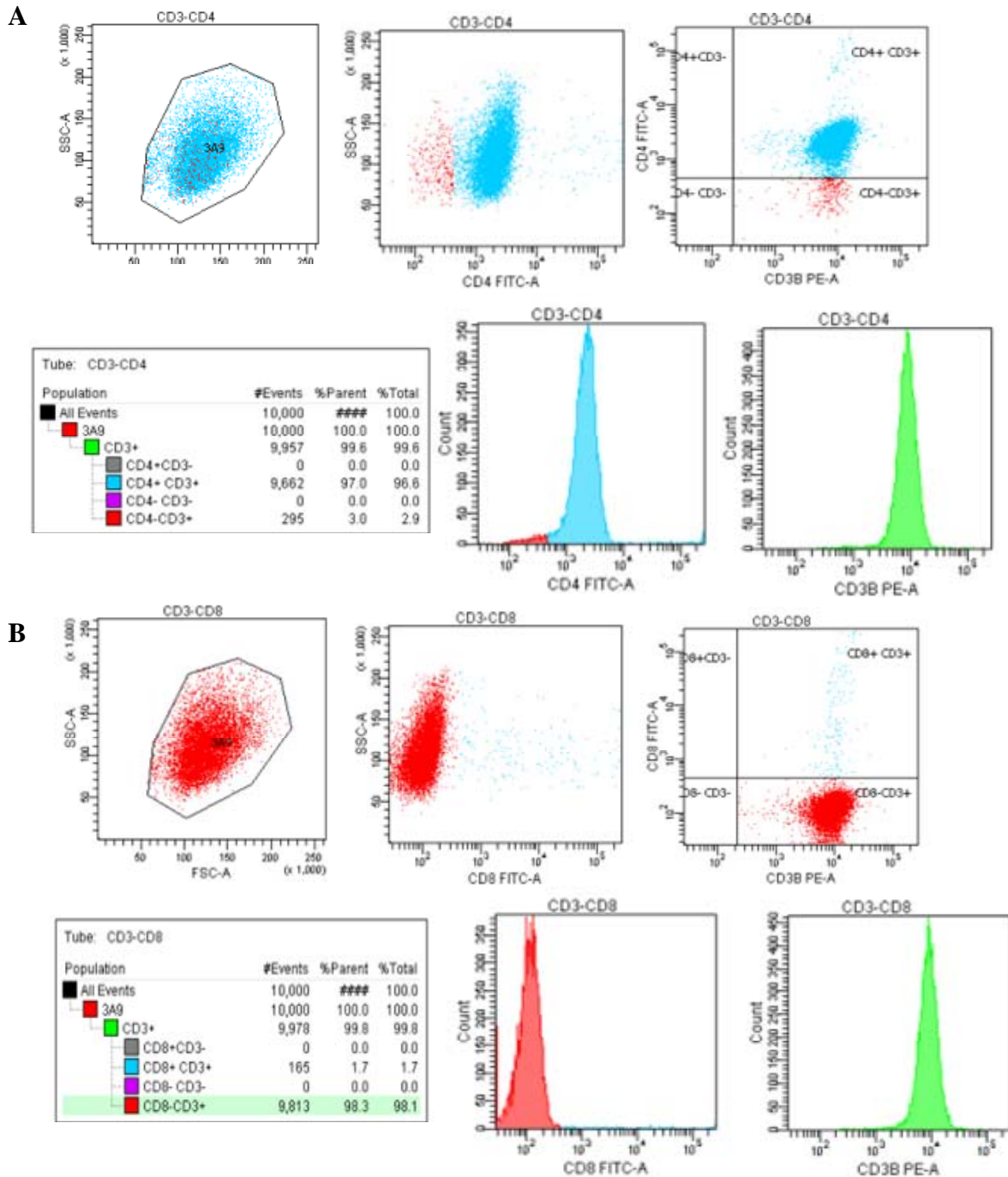


Figura 8. Fenotipo del hibridoma 3A9 específico para la lisozima de huevo de gallina (HEL). El fenotipo del hibridoma fue $CD3^+CD4^+CD8^-$ y se utilizaron para la tinción los anticuerpos fluoromarcados anti-CD3-Biotina, STV-PE, anti-CD4-FITC y anti-CD8-FITC. **A.** Análisis de la expresión de los marcadores celulares CD3 y CD4 en el hibridoma 3A9. **B.** Análisis de la expresión de los marcadores celulares CD3 y CD8 en el hibridoma 3A9.

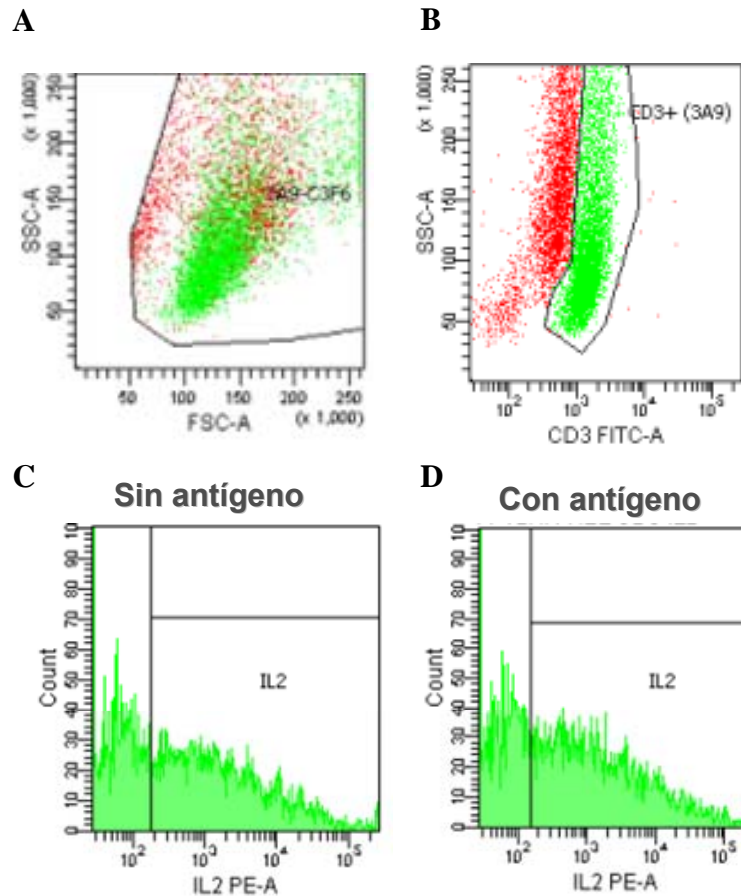


Figura 9. Gráficas de puntos de la expresión de IL-2 en los ensayos de presentación con el hibridoma 3A9. **A.** Gráfica de puntos de tamaño y complejidad celular de las 2 poblaciones celulares. **B.** Gráfica de puntos que muestra la expresión de la molécula CD3, para distinguir la población del hibridoma 3A9 ($CD3^+$). **C.** Histograma que muestra la expresión IL-2 en el hibridoma proveniente de ensayos de activación en ausencia del antígeno. **D.** Histograma que muestra la expresión IL-2 en el hibridoma proveniente de ensayos de activación en presencia del antígeno.

El porcentaje de hibridomas CD3⁺IL-2⁺ que no fueron estimulados por el antígeno resultó en un 43.6% (\pm 3.5%), en comparación con el 48.6% (\pm 3.8%) de los hibridomas que si fueron estimulados con el antígeno (tabla IV).

La Molécula CD69 Como Marcador de Activación de los Hibridomas es Detectable a Partir de las 4 Horas de Cultivo

Con el objetivo de estimar el tiempo de expresión de la molécula de superficie CD69, como marcador temprano de activación, se realizó una cinética de ensayos de presentación de antígeno con el hibridoma 3A9, desde las 2 hasta las 16 horas.

Posterior al ensayo de activación, las células se marcaron con una mezcla de anticuerpos fluoromarcados, anti-CD4-FITC y anti-CD69-PE, para su análisis por citometría de flujo. Las células que resultaron CD4⁺, se seleccionaron como la población de hibridomas y se evaluó la expresión del marcador CD69. En la figura 10 se muestran los resultados del análisis de las gráficas de puntos e histogramas de las poblaciones CD4⁺CD69⁺ de los ensayos de activación en ausencia y presencia del antígeno. En el inciso A y B se observan los datos de la adquisición de células del ensayo de 8 horas de presentación, sin y con antígeno respectivamente. El basal de células CD4⁺CD69⁺ de los ensayos de presentación sin antígeno fue del 11.1% y después de 8 horas de estímulo con el antígeno HEL, fue del 20.4%. En el inciso C se observa la gráfica del porcentaje de hibridomas CD69⁺ a diferentes tiempos de activación.

Tabla IV. Porcentaje de células que expresan IL-2 por citometría de flujo.

A

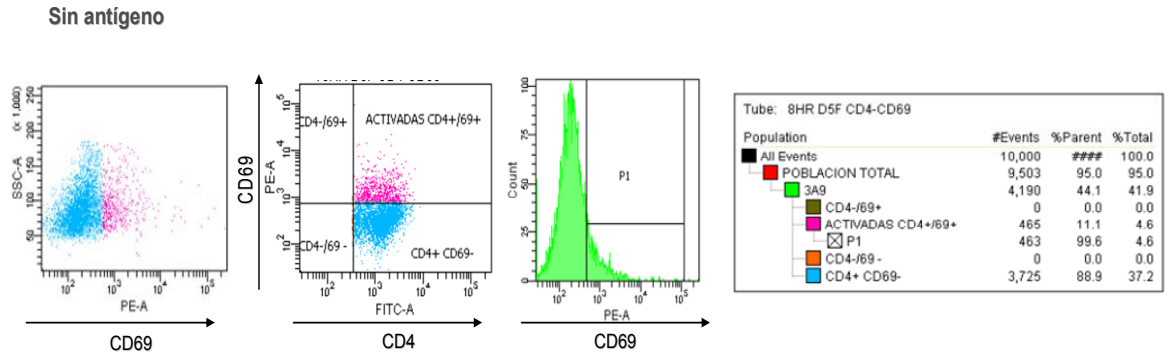
Población	No. eventos	% Subpoblación (Parent)	% Total
(Sin antígeno)			
3A9-C3F6	10,000	100.0	100.0
└─┬─> CD3 ⁺ (3A9)	5,962	59.6	59.6
└─┬─> IL-2 ⁺	2833	47.5	28.3
(Con antígeno)			
3A9-C3F6	10,000	100.0	100.0
└─┬─> CD3 ⁺ (3A9)	6,282	63.0	62.8
└─┬─> IL-2 ⁺	3,312	52.7	33.1

B

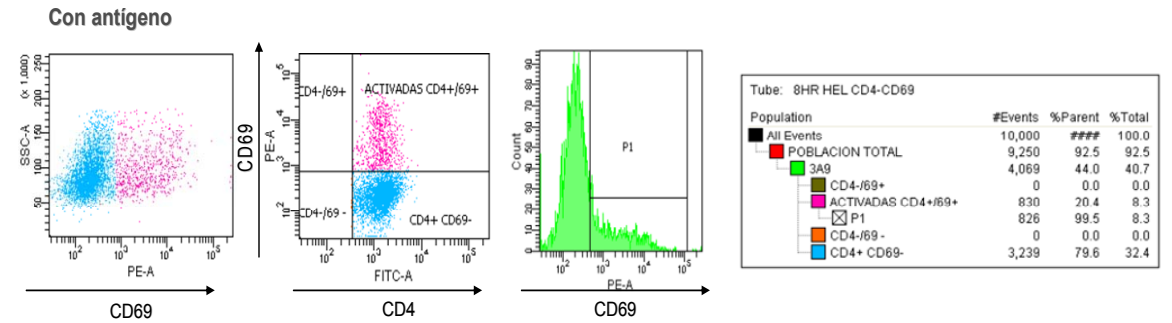
	Sin antígeno		Con antígeno	
	% Células	DS	% Células	DS
CD3⁺ IL2⁺	43.6 (40.5-47.5)	3.5	48.6 (45-52.7)	3.8

Se adquirieron 10 000 eventos para cada condición, y los datos fueron analizados con el software FACSDiva. El porcentaje de células CD3⁺ que representa al hibridoma 3A9 fue de aproximadamente el 60% (59.6% células sin estímulo o antígeno y 63% células con estímulo). **A.** Porcentaje de células CD3⁺IL-2⁺. **B.** Resumen de la expresión de IL-2 de los hibridomas con y sin antígeno en los ensayos de presentación. DS. Desviación estándar.

A



B



C

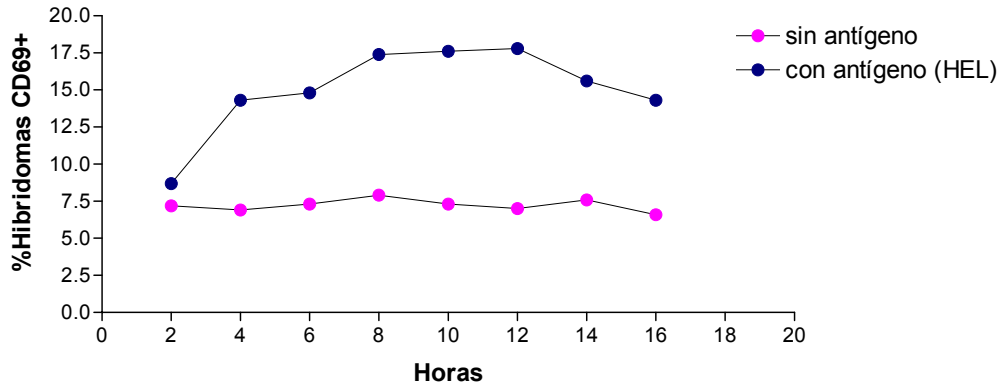


Figura 10. Cinética de expresión del marcador de activación CD69. **A.** Análisis del porcentaje de hibridomas CD3⁺CD4⁺ que expresan el marcador CD69, de los ensayos de activación en ausencia de antígeno (basal) **B.** Análisis del porcentaje de hibridomas CD3⁺CD4⁺ que expresan el marcador CD69, de los ensayos de activación en presencia de antígeno. **C.** Cinética de expresión de CD69 de los hibridomas activados y no activados, de ensayos de presentación de antígeno entre 2 y 16 horas.

El Hibridoma 3A9 Estimulado con HEL Expresa la Molécula CD62L y no CD25

Con la finalidad de estimar el tiempo de expresión de las moléculas de superficie CD25 y CD62L, como marcadores de activación celular, se realizó una cinética de ensayos de presentación de antígeno con el hibridoma 3A9, desde las 2 hasta las 16 horas para la evaluación de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25). Para la evaluación de la molécula de adhesión celular o selectina L (CD62L), se realizó una cinética a las 12, 14 y 16 horas de presentación de antígeno.

Posterior al ensayo de activación, las células se marcaron con una mezcla de anticuerpos fluoromarcados, anti-CD4-FITC y anti-CD25-PE y anti-CD4-FITC y anti-CD62L-PE para su análisis por citometría de flujo. Las células que resultaron CD4⁺, en ambas cinéticas, se seleccionaron como la población de hibridomas y se evaluó la expresión del marcador CD25 y D62L respectivamente (figura 11A y 12A).

En la figura 11 se muestran los resultados del análisis de las gráficas de puntos e histogramas de las poblaciones CD4⁺CD25⁺ de los ensayos de activación en ausencia y presencia del antígeno. En el inciso B y C se observan los datos de la adquisición de células del ensayo de 16 horas de presentación, sin y con antígeno respectivamente. El basal de células CD4⁺CD25⁺ de los ensayos de presentación sin antígeno fue del 4.0 % y después de 16 horas de estímulo con el antígeno HEL, fue del 5.3 %. En el inciso D se observa la gráfica del porcentaje de hibridomas CD25⁺ a diferentes tiempos de activación.

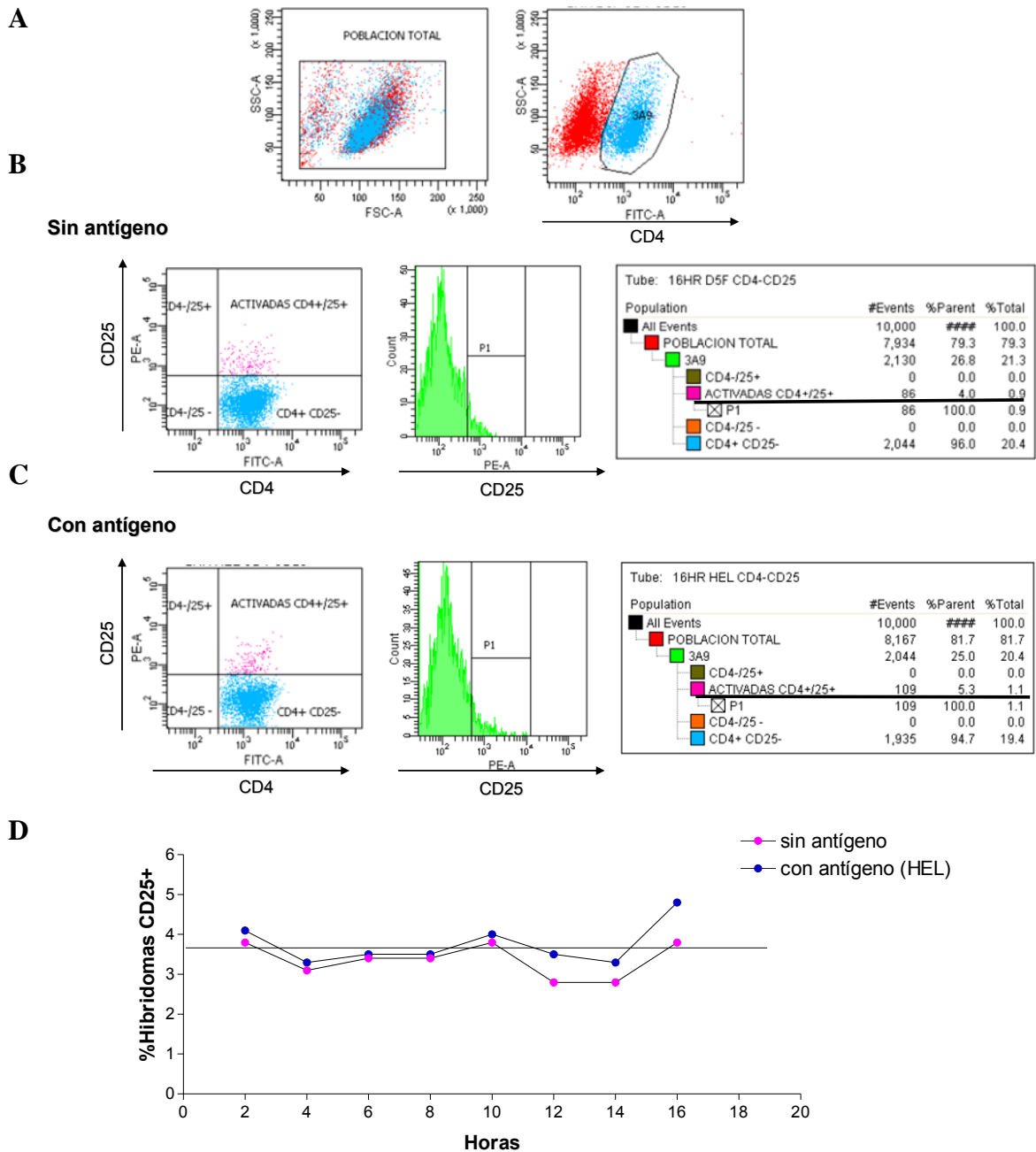


Figura 11. Cinética de expresión del marcador de activación CD25. **A.** Gráfica de puntos de la expresión del marcador CD4. **B.** Análisis del porcentaje de hibridomas CD4⁺ que expresan el marcador CD25, de los ensayos de activación en ausencia de antígeno (basal) **C.** Análisis del porcentaje de hibridomas CD4⁺ que expresan el marcador CD25, de los ensayos de activación en presencia de antígeno. **D.** Cinética de expresión de CD25 de los hibridomas activados y no activados, de ensayos de presentación de antígeno entre 2 y 16 horas.

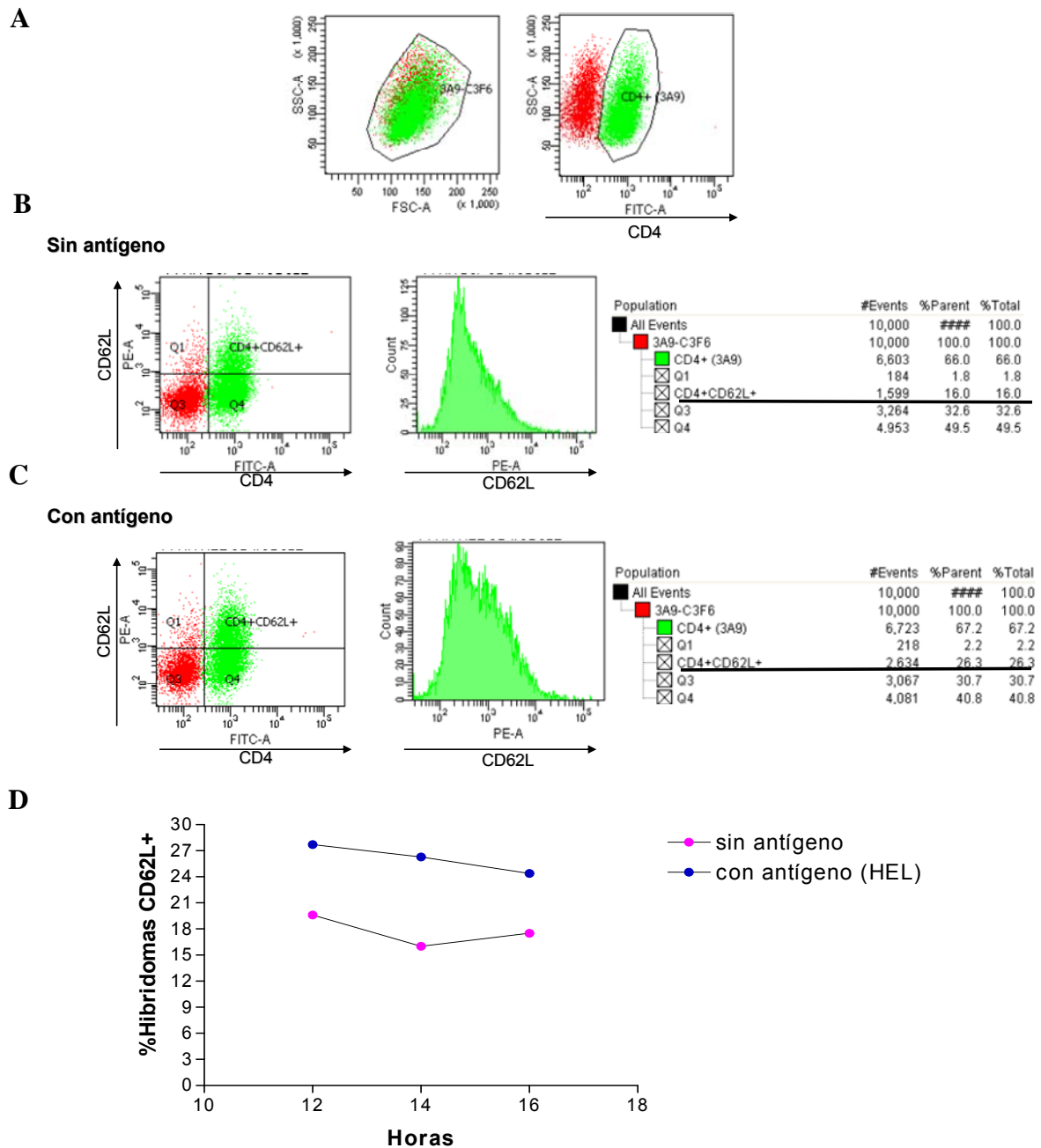


Figura 12. Cinética de expresión del marcador de activación CD62L. **A.** Gráfica de puntos de la expresión del marcador CD4. **B.** Análisis del porcentaje de hibridomas CD4⁺ que expresan el marcador CD62L, de los ensayos de activación en ausencia de antígeno (basal) **C.** Análisis del porcentaje de hibridomas CD4⁺ que expresan el marcador CD62L, de los ensayos de activación en presencia de antígeno. **D.** Cinética de expresión de CD62L de los hibridomas activados y no activados, de ensayos de presentación de antígeno entre 12 y 16 horas.

De manera similar, en la figura 12 se muestran los resultados del análisis de las gráficas de puntos e histogramas de las poblaciones CD4⁺CD62L⁺ de los ensayos de activación en ausencia y presencia del antígeno y la gráfica del porcentaje de hibridomas CD62L⁺ a diferentes tiempos de activación. El basal de células CD4⁺CD62L⁺ de los ensayos de presentación sin antígeno fue del 16.0 % y después de 14 horas de estímulo con el antígeno HEL, fue del 26.3 %.

El Hibridoma 3A9 no Tiene la Capacidad de Expresar IFN-γ

Con el objetivo de conocer si el hibridoma 3A9 tiene la capacidad de sintetizar IFN-γ, se evaluó la expresión de esta molécula intracelularmente, en ensayos de presentación de antígeno a las 12, 14 y 16 horas. Cuatro horas antes de terminar el tiempo de los ensayos, se adicionó brefeldina para evitar que la citocina se secretara al medio.

Como se describe en la sección de materiales y métodos, posterior al ensayo de activación, las células que resultaron CD4⁺, se seleccionaron como la población de hibridomas y se evaluó la expresión del IFN-γ. En la figura 13 se muestran los resultados del análisis de las gráficas de puntos e histogramas de las poblaciones CD4⁺ IFN-γ⁺. El resultado fue que el hibridoma 3A9 no tiene la capacidad de expresar esta molécula, ya que no se detectó fluorescencia en el canal 2, correspondiente al anticuerpo fluoromarcado anti- IFN-γ-PE.

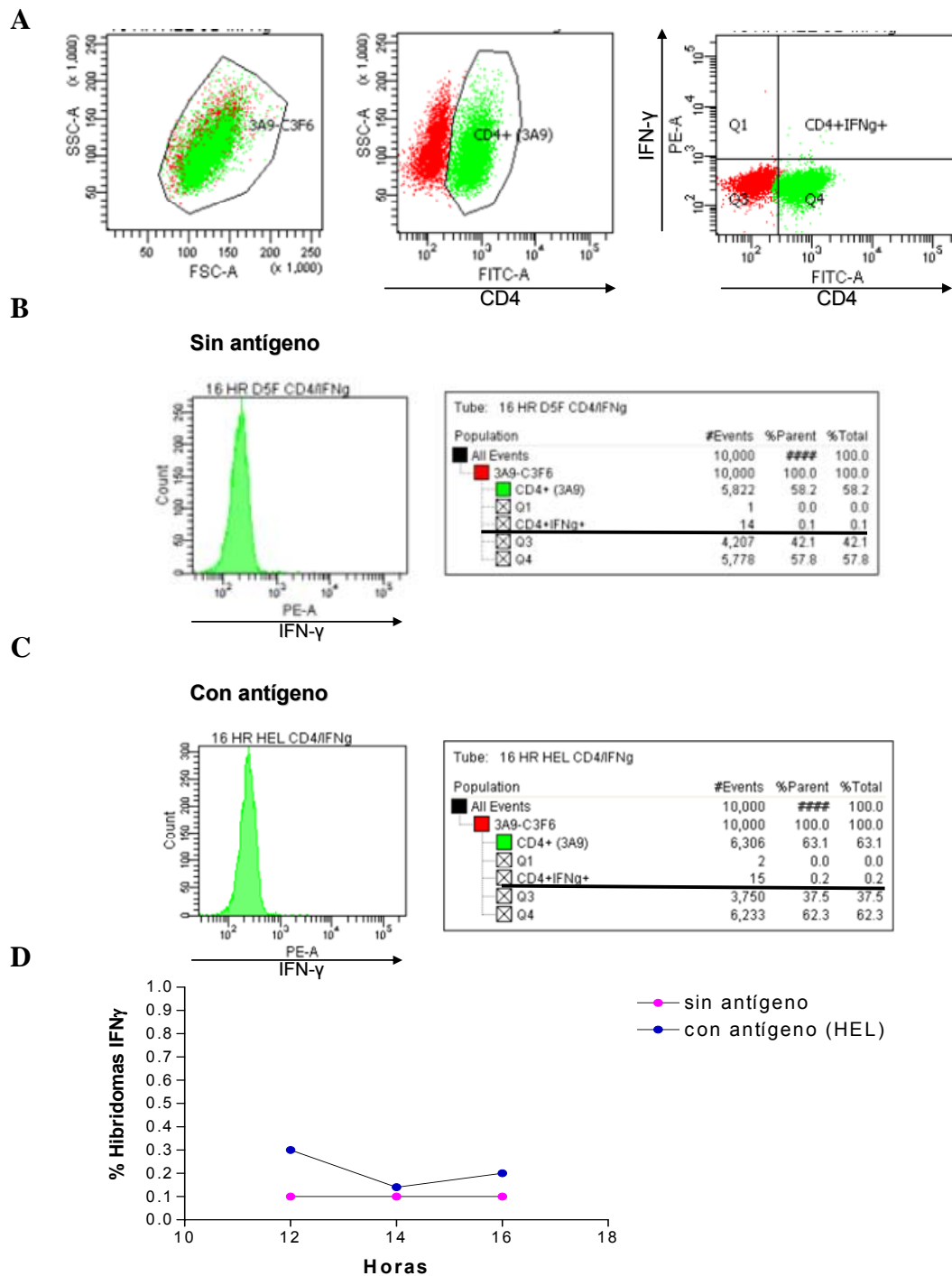


Figura 13. Cinética de expresión del IFN- γ . **A.** Gráfica de puntos de la expresión del marcador CD4 y de la población CD4⁺ IFN- γ ⁺. **B.** Análisis del porcentaje de hibridomas CD4⁺ que expresan el IFN- γ , de los ensayos de activación en ausencia de antígeno (basal) **C.** Análisis del porcentaje de hibridomas CD4⁺ que expresan el IFN- γ , de los ensayos de activación en presencia de antígeno. **D.** Cinética de expresión del IFN- γ de los hibridomas activados y no activados, de ensayos de presentación de antígeno entre 12 y 16 horas.

**Los Hibridomas de Células T Específicos Contra la Proteína
PE_PGRS33 no Expresan IL-2, ni CD25 Detectable por
Citometría de Flujo, Pero sí CD69**

Después de caracterizar al hibridoma 3A9 y evaluar la expresión de diferentes moléculas involucradas en los mecanismos de presentación de antígeno y activación celular; se realizaron los mismos ensayos para evaluar la activación de los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*.

Se realizaron ensayos de presentación de antígeno por 16 horas de incubación, utilizando 0.5 μ M de la proteína PE_PGRS33. Cuatro horas antes de terminar el tiempo del ensayo, se adicionó brefeldina para retener la IL-2 sintetizada.

En la figura 14 se observa la expresión de las moléculas de superficie IA^k- β , CD3- ϵ y TCR- β de la célula presentadora de antígeno y el hibridoma 2F9.E7. Los resultados de la expresión de las moléculas IL-2, CD25 y CD69 del hibridoma 2F9.E7, de los ensayos de presentación sin proteína y con 0.5 μ M de la proteína PE_PGRS33, se muestran en la figura 15. Al comparar la expresión de las 3 moléculas en ambos ensayos, no se encontró un cambio evidente en la expresión de IL-2 y CD25, después de la estimulación con la proteína (inciso A y B). En cambio, al comparar la expresión del marcador temprano de activación CD69, si se encontró una diferencia después del estímulo con la proteína; es decir, el hibridoma después del reconocimiento de la proteína, aumentó la expresión de dicho marcador; suponiendo con ello que el hibridoma si fue activado, a pesar de que no se encontrara la misma diferencia en la expresión de IL-2 y CD25 (figura 15 C).

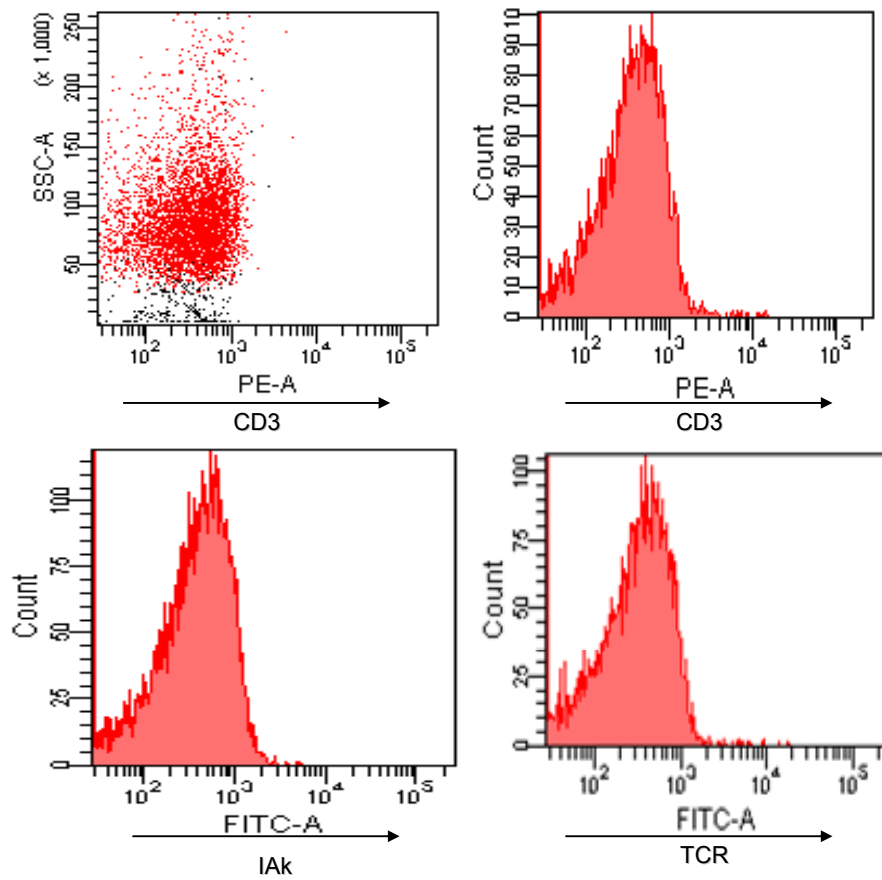


Figura 14. Expresión de las moléculas de superficie IA^k-β, CD3-ε y TCR-β de la célula presentadora de antígeno y el hibridoma 2F9.E7. Se muestran los histogramas de fluorescencia de la expresión de las moléculas involucradas en la presentación de antígeno, IA^k, CD3 y TCR.

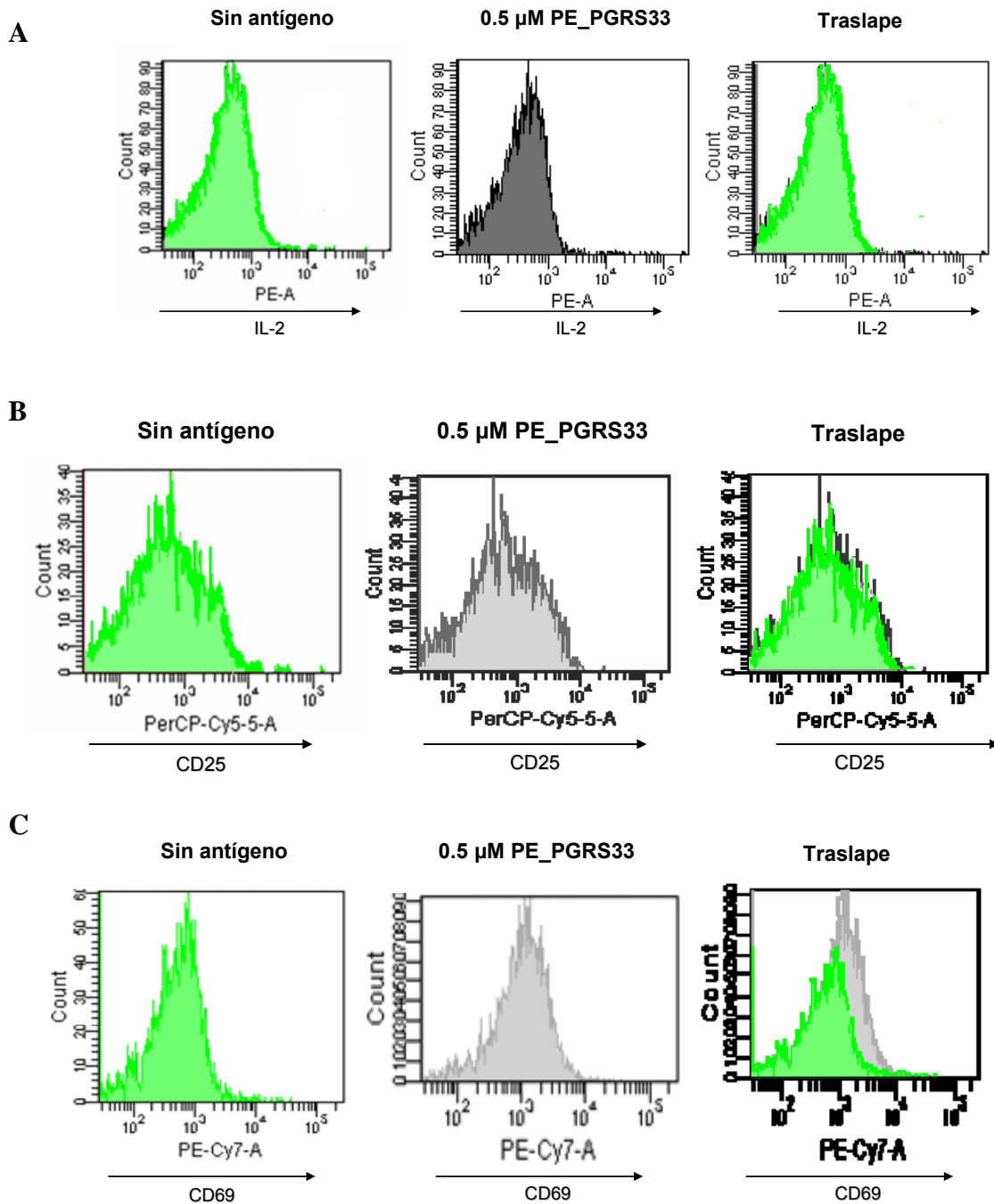


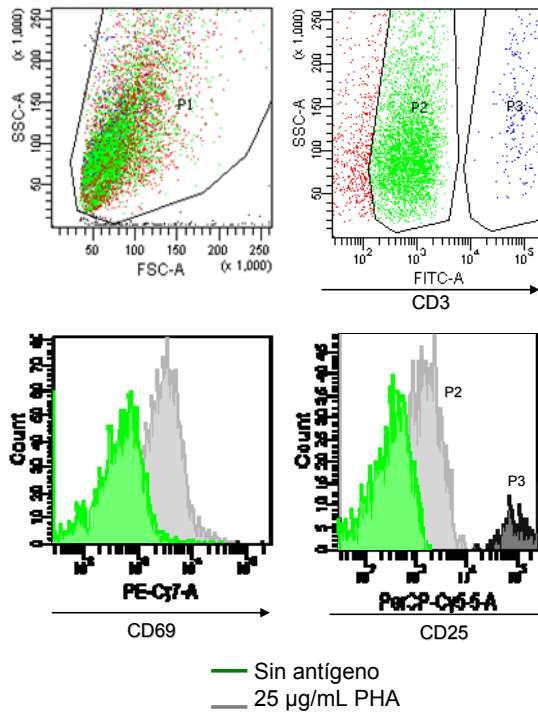
Figura 15. Expresión de las moléculas IL-2, CD25 y CD69 del hibridoma 2F9.E7. **A.** Comparación de la expresión de IL-2 del hibridoma 2F9.E7, después de la estimulación con 0.5 μ M de la proteína PE_PGRS33. **B.** Comparación de la expresión de CD25. **C.** Comparación de la expresión de CD69.

Para poder interpretar los resultados anteriores, y analizar el por qué el hibridoma no mostró un cambio en la expresión de IL-2, ni de la cadena α de su receptor (CD25), después del ensayo de presentación con la proteína PE_PGRS33; se repitió el experimento, pero ahora los hibridomas se activaron de manera independiente de antígeno, utilizando fitohemaglutinina a una concentración final de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como mitógeno.

En la figura 16A se muestran las gráficas de puntos e histogramas del análisis de la expresión de las moléculas CD3, CD69 y CD25 del hibridoma activado. Se observa que la expresión de CD3 en las células no fue uniforme, encontrándose 2 tipos de poblaciones (P2 y P3); al seleccionarlas y evaluar la expresión de CD69 y CD25 se encontró lo siguiente: 1) Aumentó la expresión de CD69 de la población CD3⁺ (P2 y P3), después del estímulo con la PHA y no hubo diferencia en esta expresión entre la población P2 y P3. 2) Aumentó la expresión de CD25 de la población CD3⁺ (P2 y P3) después del estímulo con la PHA; siendo la expresión de la población P3, de mayor intensidad que la población P2.

Por otro lado, al evaluar la expresión de la IL-2 por el hibridoma activado con PHA, tampoco se encontró un cambio entre las células antes y después del estímulo, aunque la expresión de las otras moléculas sí indicaba activación. Este resultado fue similar al encontrado en los ensayos de presentación del hibridoma 2F9.E7 con la proteína PE_PGRS33, así como los demás hibridomas de células T específicos contra la proteína (figura 16 B).

A



B

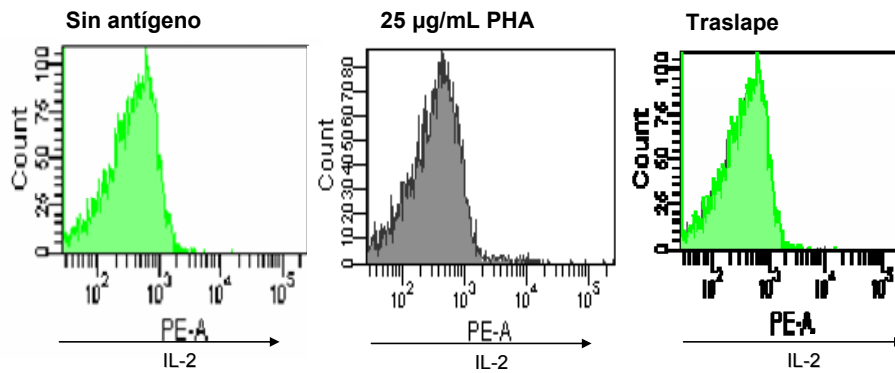


Figura 16. Expresión de las moléculas CD3, CD69, CD25 e IL-2 del hibridoma 2F9.E7 activado con PHA. **A.** Comparación de la expresión de CD3, CD69 y CD25 del hibridoma 2F9.E7, después de la estimulación con 25 µg/mL de PHA. **B.** Comparación de la expresión de IL-2.

Ensayo de Activación de Células Mononucleares de Bazo de Ratón

Con el objetivo de evaluar el sistema de activación de los hibridomas y explicar el por qué de los resultados negativos en la expresión de IL-2 intracelular por citometría de flujo; siendo que en los mismos ensayos la citocina si se produce y favorece la proliferación de las CTLL-2; se realizó un experimento con células mononucleares de bazo de ratones de la cepa C3H/HeJ. Los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33 fueron generados a partir de células mononucleares de la misma cepa de ratón. Primero se obtuvo el extracto de las células de bazo y para obtener las células mononucleares, se realizó la lisis de los eritrocitos con una solución al 0.15M de NH_4Cl y las células se filtraron y separaron por un gradiente de densidad usando Ficoll-Hypaque. Posteriormente las células mononucleares obtenidas se dividieron en dos grupos para poder evaluar la IL-2 de manera intracelular y extracelular (Anexo 5).

Para la evaluación de la IL-2 extracelular, las células mononucleares fueron estimuladas con PHA a una concentración final de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 20 horas. Posterior a ello, se recuperó el sobrenadante para ser evaluado por ELISA y por proliferación de células CTLL-2. Por otro lado, para evaluar la IL-2 intracelular, las células fueron estimuladas con PHA de igual manera que el grupo 1, pero a las 16 horas se les adicionó brefeldina a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para retener la citocina sintetizada. Después de las 20 horas de activación, se separó el sobrenadante y las células fueron permeabilizadas y marcadas para su análisis con las siguientes mezclas de anticuerpos fluoromarcados: 1) anti-CD3FITC y anti-IL-2-PE; 2) anti-CD3-FITC y anti-CD69-PE; 3) anti-CD3-Biotina-STV-PE y anti-CD4-FITC (figura 17). Para los 2 tipos de ensayos (con y sin brefeldina), se utilizó como control negativo de activación, células sin estímulo, es decir sin PHA.

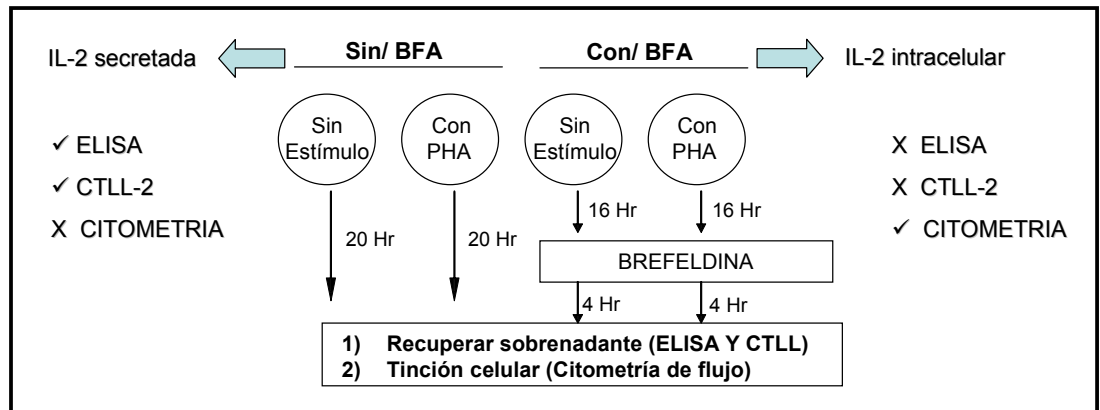


Figura 17. Esquema del ensayo de activación de las células mononucleares de bazo de ratón de la cepa C3H/HeJ. Se realizó un ensayo de activación con PHA de las células mononucleares de bazo, para comparar la expresión de IL-2 intracelular y extracelular por las técnicas de citometría de flujo, ELISA y proliferación de células dependientes de IL-2 (CTLL-2). (PHA, fitohemaglutinina a una concentración final de 25µg/mL; BFA, brefeldina a una concentración final de 10 µg/mL).

Inmunofenotipificación de Células Mononucleares de Bazo

Se realizó una inmunofenotipificación de las células mononucleares de bazo para conocer el porcentaje de células CD3⁺CD4⁺. Se evaluó la expresión de los marcadores de linaje de los linfocitos, utilizando los anticuerpos fluoromarcados anti-CD3-Biotina, STV-PE y anti-CD4-FITC.

En la figura 18A se observan las gráficas de puntos que muestran el porcentaje de células sin estímulo, que expresan CD3 y/o CD4. Se encontró que el 31% de la población celular corresponde al fenotipo CD3⁺ (marcador de linfocitos) y de éstos, el 63.7% fue CD4⁺ (figura 18B).

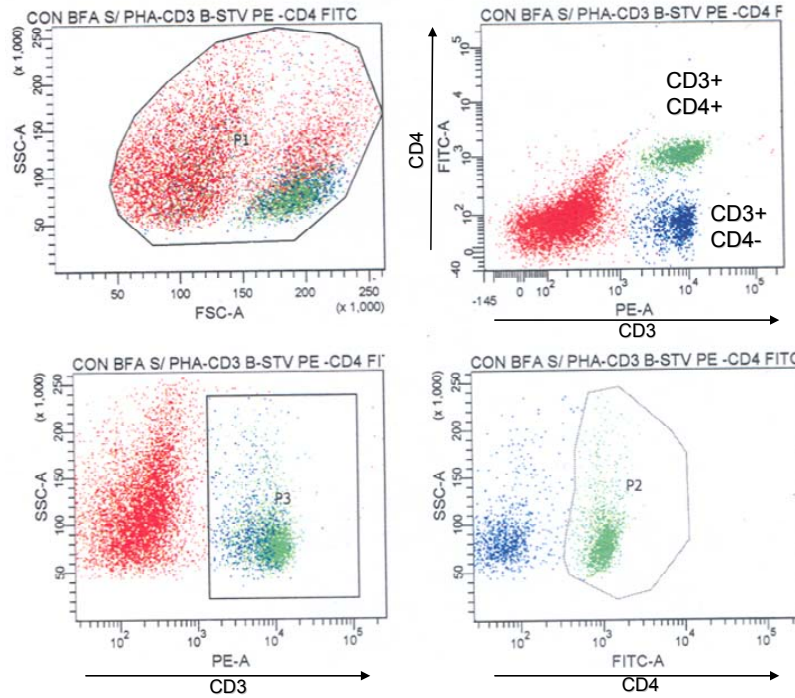
Las Células Mononucleares de Bazo de Ratón Estimuladas con PHA no Expresan IL-2 Detectable por Citometría de Flujo, Pero si CD69

Se analizó la expresión de IL-2 por citometría de flujo, de las células mononucleares de bazo que fueron estimuladas con PHA a una concentración final de 25 µg/mL, por 20 horas.

Se compararon 3 grupos de células: 1) células estimuladas con PHA, pero sin brefeldina; 2) células no estimuladas, con brefeldina y 3) células estimuladas con PHA, con brefeldina (figura 19).

Nuevamente, la expresión de IL-2 por las células estimuladas con PHA, no fue tan diferente a la expresión mostrada por las células sin estímulo. Sin embargo, al evaluar el análisis de la expresión de CD69, si se observó un cambio evidente entre las células con y sin PHA; lo que hace suponer que la activación si se dió a pesar de no detectar la IL-2 intracelular (figura 20).

A



B

Población	No. eventos	% Subpoblación	
		(Parent)	Total
PBMC Bazo	10,000	100.0	100.0
├── CD3 ⁺	3100	31.0	31.0
├── CD4 ⁺	1970	63.7	19.7
└── CD4 ⁻	1130	36.3	11.3
└── CD3 ⁻	6900	69.0	69.0

Figura 18. Inmunofenotipificación de las células mononucleares de bazo de ratón C3H/HeJ. Se utilizaron para la tinción los anticuerpos fluoromarcados anti-mouse-CD3-Biotina, STV-PE y anti-mouse-CD4-FITC. El porcentaje de células CD3⁺ fue del 31%, de las cuales, el 63.7% fue positivo para CD4. **A.** Gráfica de puntos para la expresión de los marcadores celulares CD3 y CD4 de las células mononucleares de bazo. **B.** Análisis de la expresión de los marcadores celulares CD3 y CD4.

**Las Células Mononucleares de Bazo de Ratón Estimuladas con PHA
Producen IL-2 Detectable mediante ELISA Indirecto y por la
Proliferación de Células CTLL-2**

Para evaluar la producción de IL-2 por ELISA indirecto, se analizaron los sobrenadantes obtenidos de los ensayos de activación de las células mononucleares de bazo, con PHA y se compararon las células con y sin brefeldina.

Se utilizó como anticuerpo de captura, el anticuerpo de rata anti-IL-2 de ratón a una concentración de 20 µg/mL; como segundo anticuerpo se utilizó un anti-IL-2 de ratón biotinilado y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano; y se utilizó una solución cromógeno-sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-6,3-dietilbenstiazolinsulfónico) y peróxido de hidrógeno (anexo 6).

Se evaluaron los sobrenadantes de los ensayos de activación y se midió la densidad óptica de cada uno de ellos, a una longitud de onda de 415 nm en un lector de microplacas, y los resultados se compararon con una curva estándar de IL-2 de 80 U/mL, (figura 21).

A las 20 horas de activación con la PHA, la concentración de IL-2 varió entre las células que se incubaron con y sin brefeldina como era lo esperado; ya que en el análisis de ELISA se evalúa la citocina secretada al medio de cultivo y la brefeldina retiene su secreción. La concentración de IL-2 en las células que fueron estimuladas e incubadas en presencia de brefeldina, fue de 8.5 U/mL, en comparación con los 11.92 U/mL en ausencia de brefeldina. Se encontró el mismo patrón a las 20, 16 y 12 horas de estímulo con PHA (figura 21C).

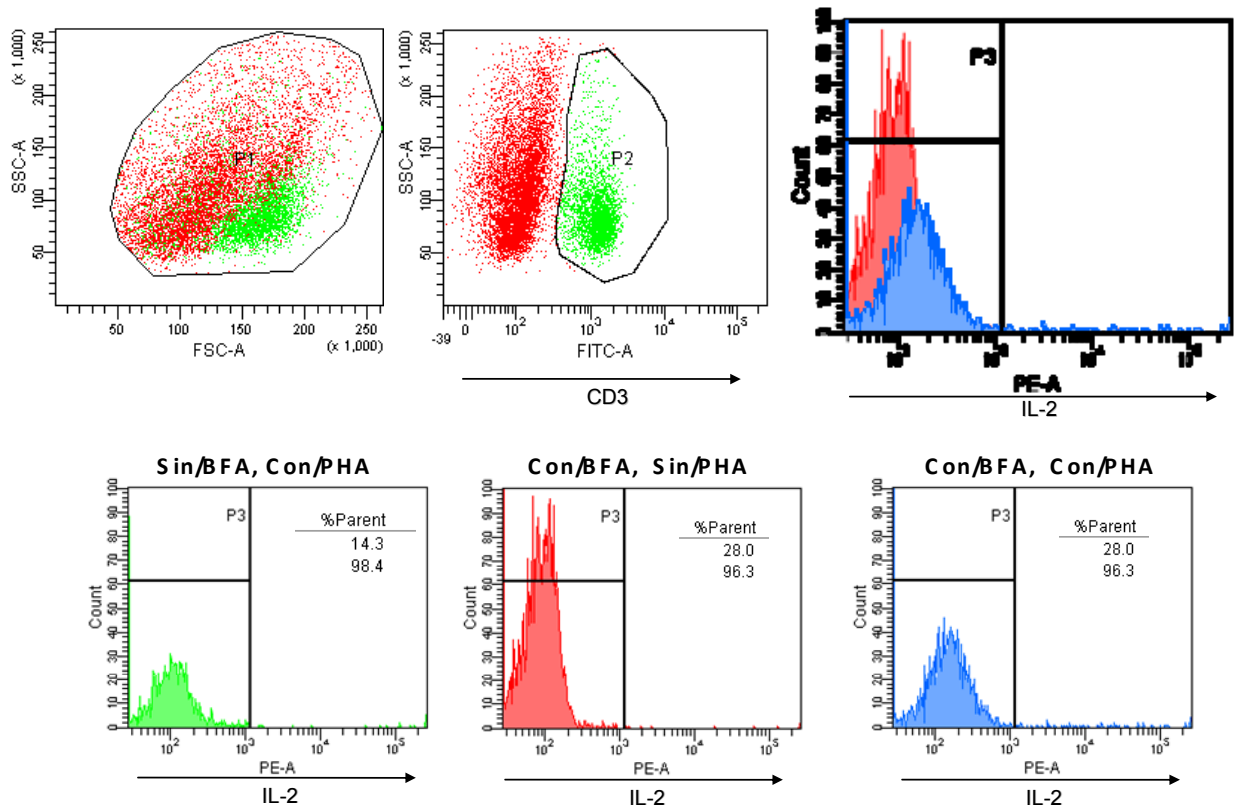


Figura 19. Análisis de la expresión de IL-2 por las células mononucleares de bazo. Se compararon 3 grupos de células: 1) células estimuladas con PHA, pero sin brefeldina; 2) células no estimuladas, con brefeldina y; 3) células estimuladas con PHA, con brefeldina

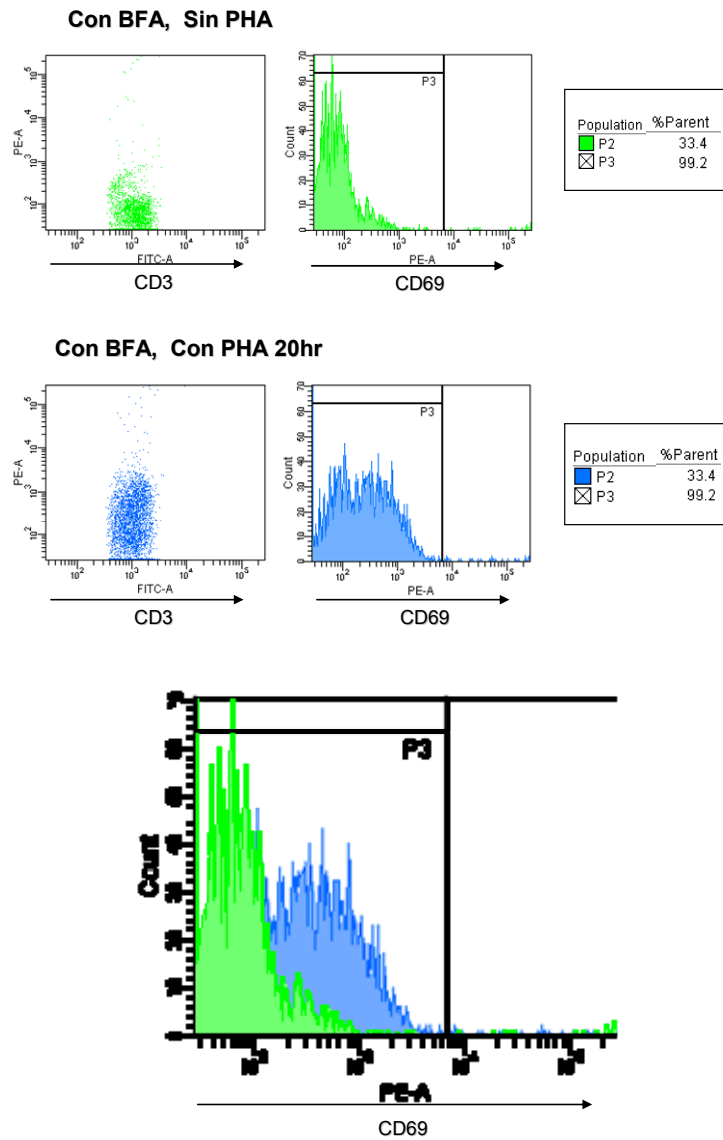


Figura 20. Análisis de la expresión de CD69 por las células mononucleares de bazo. Se compararon 2 grupos de células: 1) células no estimuladas, con brefeldina y; 2) células estimuladas con PHA, con brefeldina

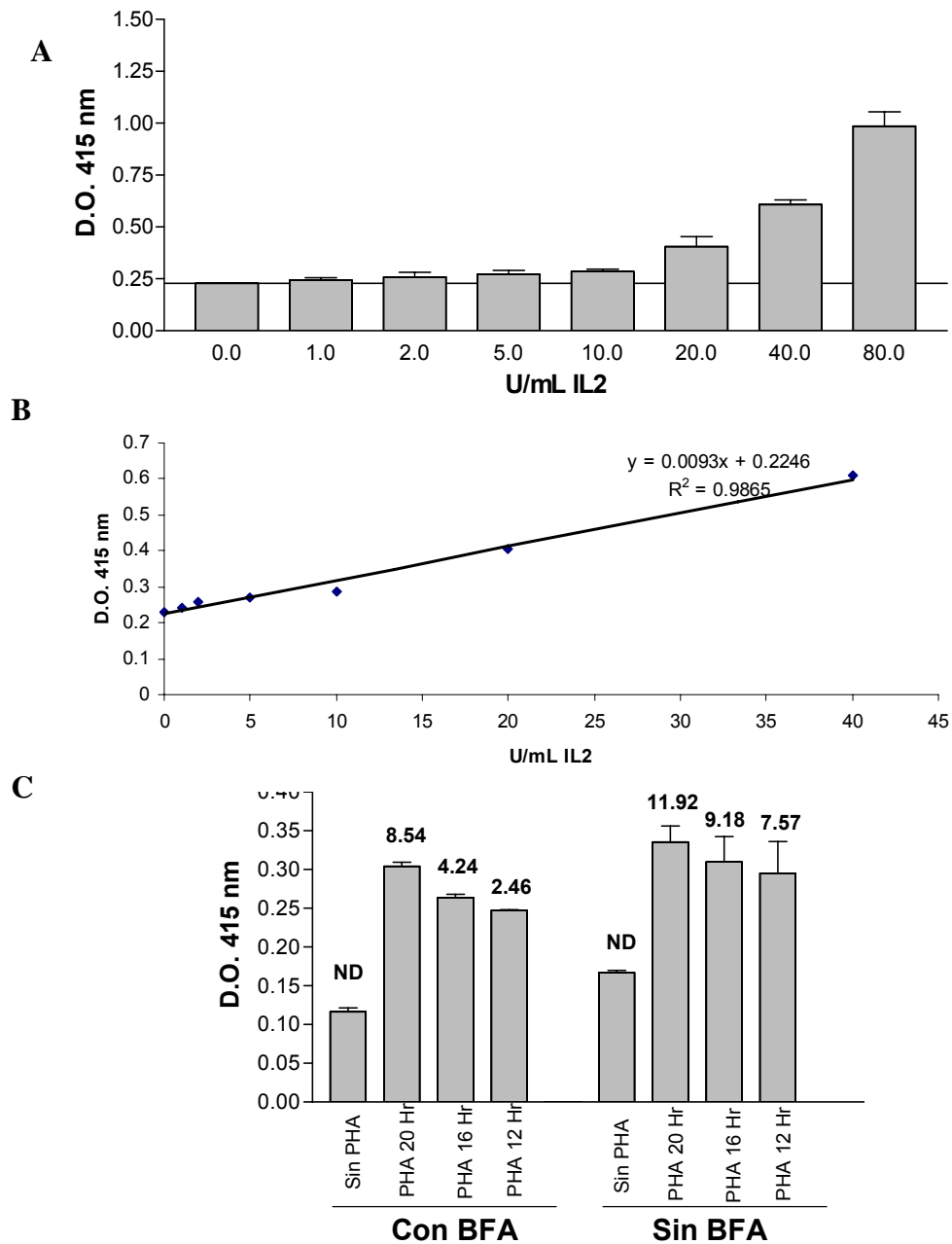


Figura 21. Evaluación de la producción de IL-2 por ELISA indirecto. Se analizaron los sobrenadantes obtenidos de los ensayos de activación de las células mononucleares de bazo con PHA, con y sin brefeldina. **A.** Curva estándar de la concentración en U/mL de IL-2. **B.** Curva estándar de la concentración en U/mL de IL-2, donde se muestra la ecuación y el valor de R^2 del análisis de tendencia. **C.** Gráfica de barras donde se muestra la densidad óptica y la concentración estimada de IL-2 en U/mL, de los sobrenadantes de los ensayos de activación. ND, No Determinado.

Los mismos sobrenadantes de los ensayos de activación con PHA, incubados con y sin brefeldina que fueron evaluados por ELISA indirecto, se incubaron con células dependientes de IL-2 para su crecimiento (CTLL-2). De la misma manera que en el análisis de ELISA, la proliferación de las células por la IL-2 de los sobrenadantes de los ensayos sin brefeldina, fue ligeramente mayor, que los provenientes de ensayos con brefeldina; sin embargo fue mínima la diferencia (figura 22).

Predicción de Péptidos de Unión a Moléculas de MHC Clase II de la Proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*

Para determinar cuáles son los aminoácidos que presentan una mayor afinidad al surco de unión del MHC II (haplotipo I-A^k de ratón), se sometió la secuencia de aminoácidos de la proteína PE_PGRS33, a 2 bases de datos: SYFPEITHI y un algoritmo predictor, generado por el grupo de investigación del Dr. Emil R. Unanue (Departamento de Patología e Inmunología, Universidad de Washington, Estados Unidos).

Estas bases de datos evalúan cada aminoácido del péptido predicho y lo califican considerando cuáles son los aminoácidos que tienen mayor afinidad al surco de unión del MHC y cuáles son los que rodean al surco.

Los ligandos predichos para las moléculas de MHC clase II por SYFPEITHI, tienen una longitud de 15 aminoácidos, donde los 3 aminoácidos amino terminal y los 3 carboxilo terminal, representan los residuos que flanquean el surco y los 9 aminoácidos centrales representan el nonúmero de unión al surco del MHC. Por lo tanto el aminoácido del P1 aparece en la posición 4 del péptido predicho.

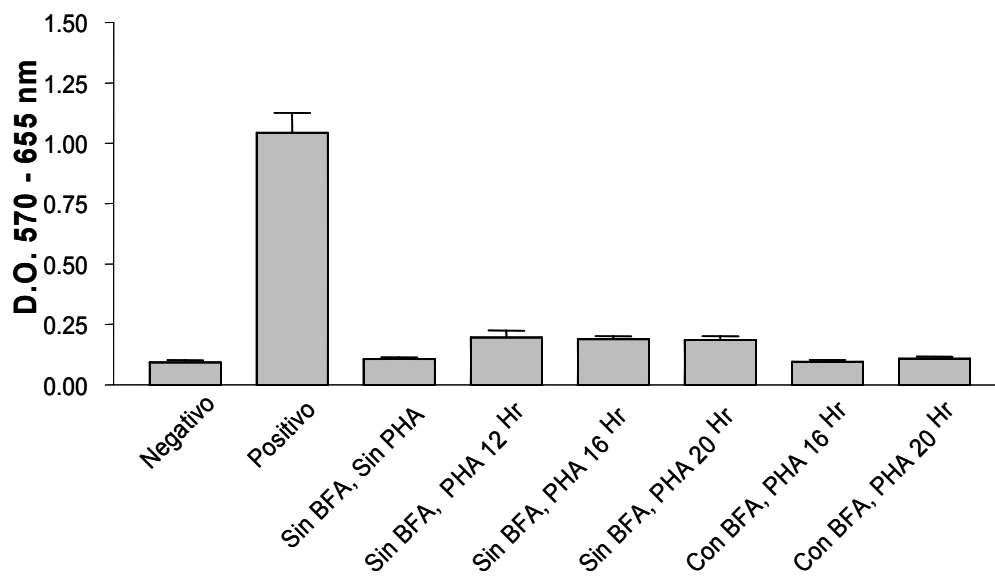


Figura 22. Evaluación de la activación de las células mononucleares de bazo del ratón en presencia y ausencia de BFA por la proliferación de las CTLL-2. En el gráfico se compara la proliferación de células CTLL-2 con los sobrenadantes de los ensayos de las células mononucleares estimuladas o no con PHA, con y sin brefeldina.

En la base de datos del grupo del Dr. Unanue, los péptidos predichos tienen una longitud de 9 aminoácidos, es decir, sólo se muestran los aminoácidos que se unen a los “pocket” del surco de unión del MHC II.

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína PE_PGRS33 de 498 aminoácidos de longitud y los ligandos de la proteína PE_PGRS33 a las moléculas de MHC clase II de ratón (IA^k), más probables con la base de datos SYFPEITHI y del grupo del Dr. Unanue (Tabla V, VI y VII).

Algunos de los ligandos predichos por ambas bases de datos para la proteína PE_PGRS33 son los péptidos: 103-111 (DVINAPALA), 438-446 (DGGAGGNGT), 134-142 (DGGILIGNG), 435-443 (DGGDGGAGG), 240-248 (DAGDGGAGG), 348-356 (DGGAGGAGG) y 243-251 (DGGAGGDGG). De éstos, los péptidos 103-111 y 134-142 presentan una mayor afinidad al surco de unión del MHC II (I-A^k).

La relevancia de estos 2 péptidos (DVINAPALA y DGGILIGNG), es que se encuentran dentro del dominio PE de la proteína, que corresponde a la secuencia de 140 aminoácidos del extremo amino terminal y que se ha visto, que está relacionado con la inducción de una respuesta inmune celular efectiva en el ratón (Cole y col., 1998; Delogu y Brennan, 2001).

Tabla V. Secuencia de aminoácidos de la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* .

10	20	30	40	50	60
MSFVVTIPEA	LAAVATDLA	IGSTIGTANA	AAAVPTTTVL	AAADEVSA	MAALFSGHAQ
70	80	90	100	110	120
AYQALSAQA	LFHEQFVRA	TAGAGSYAAA	EAASAAPLEG	VLDVINAPAL	ALLGRPLIGN
130	140	150	160	170	180
GANGAPGTGA	NGGDGGILIG	NGGAGGSGAA	GMPGGNGGAA	GLFGNGGAGG	AGGNVASGTA
190	200	210	220	230	240
GFGGAGGAGG	LLYGAGGAGG	AGGRAGGGVG	GIGGAGGAGG	NGLLFGAGG	AGGVGGLAAD
250	260	270	280	290	300
AGDGGAGGDG	GLFFGVGGAG	GAGGTGTNVT	GGAGGAGGNG	GLLFGAGGVG	GVGGDGVAFI
310	320	330	340	350	360
GTAPGGPGGA	GGAGGLFGVG	GAGGAGGIGL	VGNGGAGGSG	GSALLWGDGG	AGGAGGVGST
370	380	390	400	410	420
TGGAGGAGGN	AGLLVGAGGA	GGAGALGGGA	TGVGGAGGNG	GTAGLLFGAG	GAGGFVFGGA
430	440	450	460	470	480
GGAGGLGGKA	GLIGDGGDGG	AGNGTGAKG	GDGGAGGGA	LVGNGGNGGN	AGSGTPNGSA
490					
GTGGAGGLLG	KNGMNLPL				

La proteína PE_PGRS33 está codificada por el gen Rv1818c de *M. tuberculosis*, y está constituida por 498 aminoácidos con un 41% de glicina y 20% de alanina. En el esquema superior, se observa la posición de cada uno de los aminoácidos (a la izquierda, el residuo amino-terminal y a la derecha, el residuo carboxilo-terminal) (Cole y col., 1998).

Tabla VI. Predicción de los ligandos de unión de la proteína PE_PGRS33 a las moléculas de MHC clase II de ratón (IA^k) generados por la base de datos SYFPEITHI.

Posición	P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9									score						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		0	1	2	3	4	5
100	G	V	L	D	V	I	N	A	P	A	L	A	L	L	G	24
1	M	S	F	V	V	T	I	P	E	A	L	A	A	V	A	22
42	A	A	A	D	E	V	S	A	A	M	A	A	L	F	S	18
131	N	G	G	D	G	G	I	L	I	G	N	G	G	A	G	18
246	A	G	G	D	G	G	L	F	F	G	V	G	G	A	G	18
292	V	G	G	D	G	V	A	F	L	G	T	A	P	G	G	18
8	P	E	A	L	A	A	V	A	T	D	L	A	G	I	G	16
12	A	A	V	A	T	D	L	A	G	I	G	S	T	I	G	16
19	A	G	I	G	S	T	I	G	T	A	N	A	A	A	A	16
38	T	V	L	A	A	A	A	D	E	V	S	A	A	M	A	16
55	F	S	G	H	A	Q	A	Y	Q	A	L	S	A	Q	A	16
83	G	A	G	S	Y	A	A	A	E	A	A	S	A	A	P	16
111	A	L	L	G	R	P	L	I	G	N	G	A	N	G	A	16
138	L	I	G	N	G	G	A	G	S	S	G	A	A	G	M	16
228	A	G	G	A	G	G	V	G	G	L	A	A	D	A	G	16
262	A	G	G	T	G	T	N	V	T	G	G	A	G	G	A	16
461	L	V	G	N	G	G	N	G	G	N	A	G	S	G	T	16
464	N	G	G	N	G	G	N	A	G	S	S	G	T	P	N	16
474	G	T	P	N	G	S	A	G	T	G	G	A	G	G	L	16
59	A	Q	A	Y	Q	A	L	S	A	Q	A	A	L	F	H	14
71	L	F	H	E	Q	F	V	R	A	L	T	A	G	A	G	14
96	A	P	L	E	G	V	L	D	V	I	N	A	P	A	L	14
98	L	E	G	V	L	D	V	I	N	A	P	A	L	A	L	14
114	G	R	P	L	I	G	N	G	A	N	G	A	P	G	T	14
117	L	I	G	N	G	A	N	G	A	P	G	T	G	A	N	14
133	G	D	G	G	I	L	I	G	N	G	G	A	G	G	S	14
169	G	G	A	G	G	N	V	A	S	G	T	A	G	F	G	14
218	A	G	G	N	G	G	L	L	F	G	A	G	G	A	G	14
237	L	A	A	D	A	G	D	G	G	A	G	G	D	G	G	14
240	D	A	G	D	G	G	A	G	G	D	G	G	L	F	F	14
265	T	G	T	N	V	T	G	G	A	G	G	A	G	G	N	14
276	A	G	G	N	G	G	L	L	F	G	A	G	G	V	G	14
325	A	G	G	I	G	L	V	G	N	G	G	A	G	G	S	14
345	L	W	G	D	G	G	A	G	G	A	G	G	V	G	S	14
367	A	G	G	N	A	G	L	L	V	G	A	G	G	A	G	14
369	G	N	A	G	L	L	V	G	A	G	G	A	G	G	A	14
432	L	I	G	D	G	G	D	G	G	A	G	G	N	G	T	14
435	D	G	G	D	G	G	A	G	G	N	G	T	G	A	K	14

Tabla VII. Predicción de los ligandos de unión de la proteína PE_PGRS33 a las moléculas de MHC clase II de ratón (IA^k) generados por la base de datos del Dr.

Unanue

Posición	P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9	store
	1 2 3 4 5 6 7 8 9	
103-111	D V I N A P A L A	2.017
438-446	D G G A G G N G T	1.787
134-142	D G G I L I G N G	1.783
435-443	D G G D G G A G G	1.770
240-248	D A G D G G A G G	1.770
348-356	D G G A G G A G G	1.405
45-53	D E V S A A M A A	1.310
4-12	V V T I P E A L A	1.292
86-94	S Y A A A E A A S	1.278
295-303	D G V A F L G T A	1.113
464-472	N G G N G G N A G	1.057
117-125	L I G N G A N G A	1.051
243-251	D G G A G G D G G	1.006
452-460	D G G A G G G A I	0.915
461-469	L V G N G G N G G	0.728
36-44	T T T V L A A A A	0.647
58-66	H A Q A Y Q A L S	0.620
74-82	E Q F V R A L T A	0.617
23-31	S T I G T A N A A	0.612
128-136	T G A N G G D G G	0.427
55-63	F S G H A Q A Y Q	0.404
330-338	L V G N G G A G G	0.374
162-170	L F G N G G A G G	0.374
138-146	L I G N G G A G G	0.374
87-95	Y A A A E A A S A	0.321
48-56	S A A M A A L F S	0.321
474-482	G T P N G S A G T	0.311
339-347	S G G S A L L W G	0.304

**Predicción de Péptidos Generados por la Digestión Enzimática
con Tripsina de la Proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*,
Mediante el Algoritmo PEPTIDE CUTTER**

Existen algoritmos que permiten hacer estimaciones sobre los posibles sitios de corte de una proteína, por enzimas proteolíticas; esta información está disponible en programas y base de datos como el PEPTIDE CUTTER (<http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter>), el cual predice los sitios potenciales de corte de una proteína escindidos por diferentes proteasas, dada una secuencia de aminoácidos.

Una de las enzimas mayormente utilizadas para la digestión de proteínas es la tripsina, debido a que se conoce cuáles son los aminoácidos que son reconocidos y escindidos por ésta. La tripsina hidroliza los péptidos unidos en el lado carboxilo terminal de los residuos de lisina y arginina.

Se sometió la secuencia de la proteína PE_PGRS33 al programa PEPTIDE CUTTER, y se obtuvieron 5 péptidos hipotéticos generados por la digestión con la enzima tripsina, los cuales presentan el sitio de corte en los aminoácidos de la posición 78, 204, 429, 449, 491 (tabla VIII).

Al comparar los péptidos predichos por el programa PEPTIDE CUTTER, con la predicción de los ligandos de la proteína PE_PGRS33 a las moléculas de IA^k, por las bases de datos SYFPEITHI y del grupo del Dr. Unanue; se puede concluir que es factible obtener dichos ligandos, con la digestión enzimática con tripsina de la proteína PE_PGRS33. Ya que esta enzima no corta el motivo de unión al MHC de estos péptidos (figura 23).

Tabla VIII. Predicción de péptidos generados por la digestión enzimática de la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*, mediante el algoritmo PEPTIDE CUTTER.

Posición del sitio de corte	Probabilidad del corte	Secuencia de aminoácidos	Longitud del péptido (aa)	Masa Relativa (Da)
78	100%	MSFVVTIPEALAAVATDLAIGSTIGTANAAAAPTTLVAAADEV SAAMAALFSGHAQAYQALSAQAALFHEQFVR	78	7690.725
115	74.6%	ALTAGAGSYAAAEEAASAPLEGVLDVINAPALALLGR	37	3436.910
204	100%	PLINGANGAPGTGANGGDGGILINGGAGGSGAAGMPGGNGG AAGLFGNGGAGGAGGNVAGTAGFGGAGGAGLLYGAGGAGG AGGR	89	7010.436
429	100%	AGGGVGGIGGAGGAGGNGLLFGAGGAGGVGGLAADAGDGGGA GGDGGGLFFGVGGAGGAGGTGNTVTGGAGGAGGNGLLFGAGG VGGVGGDGVAFLTAPGGPGGAGGAGLFGVGGAGGAGGIGL VGNGGAGGSGSALLWGDGGAGGAGGVGSTTGGAGGAGGNA GLLVGAGGAGGAGALGGGATGVGGAGGNGGTAGLLFGAGGAG GFGFGGAGGAGGLGGK	225	17125.26
449	100%	AGLIGDGGDGGAGGNGTGAK	20	1601.650
491	92.7%	GGDGGAGGGAILVNGGNGGNAGSGTPNGSAGTGGAGLLGK	42	3296.431
498	Fin de la secuencia	NGMNGLP	7	701.795

De color se observan los ligandos de unión a las moléculas de MHC II predichas por las bases de datos del Dr. Unanue y SYFPEITHI.

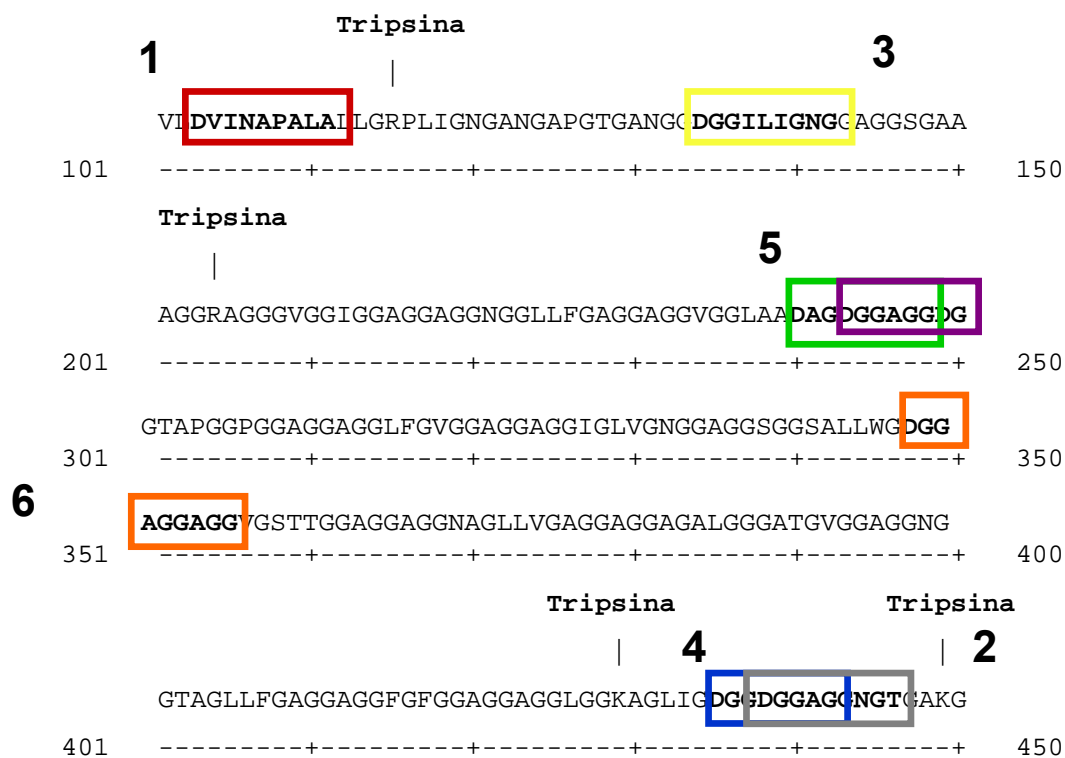


Figura 23. Sitios de corte de la enzima tripsina en la secuencia de aminoácidos de la proteína PE_PGRS33 generados por el programa PEPTIDE CUTTER. En el esquema se observan los ligandos de la proteína a las moléculas de IA^k predichos por las bases de datos SYFPEITHI y del grupo del Dr. Unanue. Se observa también que la enzima no corta el motivo de unión al MHC II de estos péptidos.

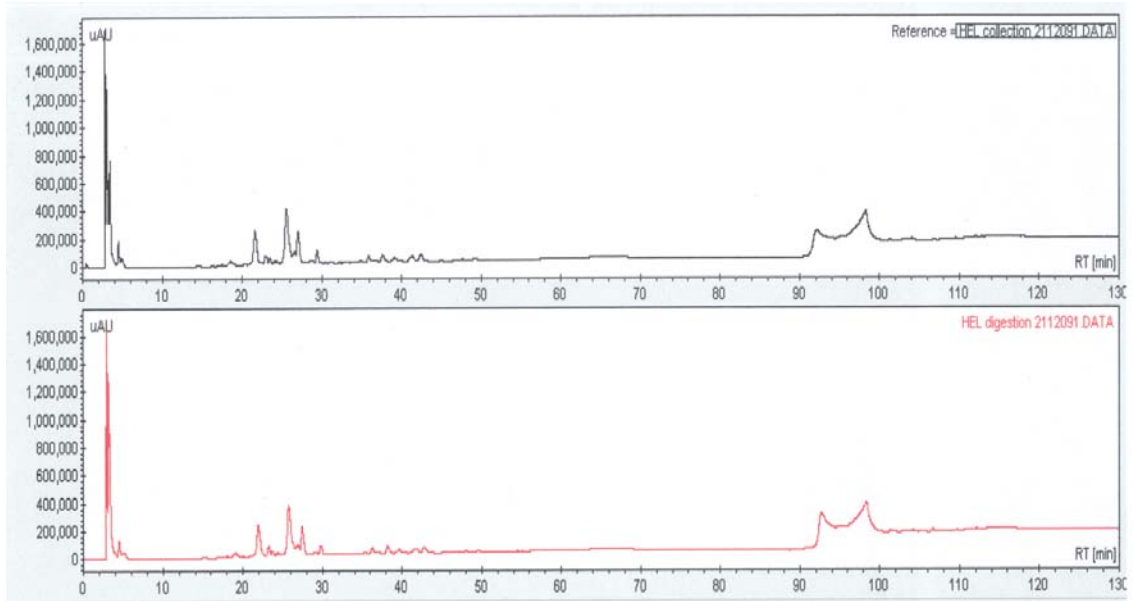
Purificación e Identificación de los Epítopes de la Lisozima HEL que Inducen la Activación del Hibridoma 3A9

Para llevar a cabo la digestión enzimática con tripsina de la proteína PE_PGRS33, purificar los péptidos resultantes por HPLC en fase reversa y comparar éstos con los péptidos predichos por el programa PEPTIDE CUTTER; fué necesario estandarizar las condiciones para realizar la digestión enzimática en solución y para ello, se utilizó nuevamente la lisozima de huevo de gallina (HEL) para dicho objetivo.

Primero, se llevó a cabo la desnaturalización y reducción de la lisozima y posteriormente la digestión con tripsina; cuya relación molar de la enzima con respecto a la proteína a digerir fue de 1:50. Finalmente, los productos de la digestión se obtuvieron al precipitar los péptidos con una solución de ATF al 1%. Los péptidos obtenidos de la digestión de la lisozima, se separaron por HPLC en fase reversa y se colectaron 130 fracciones de 1 mL/min (figura 24A). El resultado de la estandarización de las condiciones óptimas para las corridas cromatográficas (gradiente de los solventes), se muestran en la tabla II.

Los péptidos de la lisozima purificados por HPLC, fueron evaluados en ensayos de presentación con el hibridoma 3A9 y el sobrenadante se utilizó para los bioensayos con las células CTLL. Se encontró que las fracciones recolectadas a los 35, 36, 37 y 38 minutos indujeron la activación del hibridoma 3A9 en los ensayos de presentación de antígeno (figura 24B).

A



B



Figura 24. Evaluación de las fracciones recuperadas de la digestión enzimática de HEL por la proliferación de células CTLL-2. **A.** Fracciones obtenidas por HPLC, de los productos de la digestión de HEL, se colectaron 130 fracciones de 1 mL/min. **B.** Ensayo de proliferación de células CTLL-2 con las fracciones obtenidas por HPLC.

En la figura 25 se muestra la corrida electroforética (SDS-PAGE) de los controles de la digestión con tripsina de HEL teñido con nitrato plata (anexo 7). Se evaluaron los productos de la digestión precipitados con ATF, así como el sobrenadante; de igual manera se evaluaron ambos, en el control negativo del proceso de digestión (mezcla de reacción: urea, DTT, iodoacetamida y tripsina, pero sin proteína). Sólo se observa una banda correspondiente a los 20 kDa, en el carril correspondiente al sobrenadante de la digestión (control positivo), la cual se puede deber a la presencia de lisozima que no fue digerida.

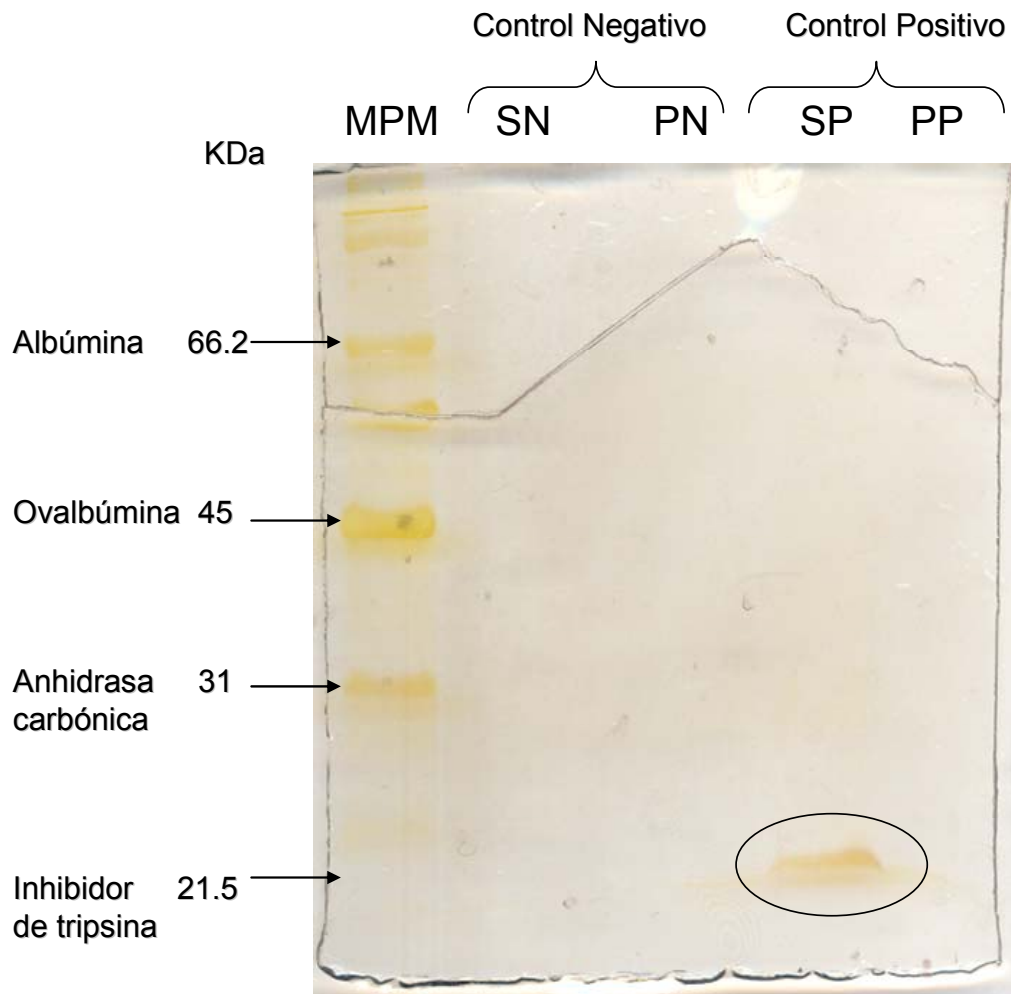


Figura 25. Electroforesis de los controles de la digestión enzimática en solución de la lisozima HEL. En el esquema se muestra el gel de la corrida electroforética (SDS-PAGE) de los controles de la digestión con tripsina de HEL teñido con nitrato plata. Como control negativo del proceso de digestión se utilizó la mezcla de reacción (urea, DTT, iodoacetamida y tripsina) en las mismas condiciones de la digestión, pero sin proteína. En el carril SP se puede observar una banda alrededor de los 20 kDa, la cual se puede deber a la presencia de lisozima que no fue digerida (MPM, marcador de peso molecular; SN, sobrenadante del control negativo; PN, precipitado del control negativo, SP, sobrenadante del control positivo; PN, precipitado del control positivo).

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo la caracterización parcial de la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* en un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*; utilizando los hibridomas de células T específicos contra la proteína y evaluando su activación, por la capacidad de síntesis de citocinas, como IL-2. Para tal evaluación se utilizaron varias metodologías como citometría de flujo, proliferación de células dependientes de IL-2 para su crecimiento (CTLL-2) y ELISA indirecto.

Los hibridomas específicos contra la proteína PE_PGRS33 de fenotipo CD3⁺CD4⁺CD8⁺ que se utilizaron en este estudio, fueron generados en un estudio previo (Gastélum-Aviña, 2008), con el fin de poder identificar los epítopes o determinantes antigénicos de la proteína, responsables de la inducción de la respuesta inmune celular contra esta proteína (figura 4).

La selección de los hibridomas específicos contra la proteína se hizo mediante bioensayos de proliferación con las células CTLL-2; sin embargo, aunque esta línea celular es utilizada frecuentemente para medir la activación celular de manera indirecta, el cultivo continuo de ésta, provoca pérdida de la sensibilidad y confiabilidad de la misma (Khatri y col., 2007; Weston y col., 1998). Debido a esto, la idea planteada al inicio del trabajo, era poder caracterizar inmunológicamente a la proteína, evaluando la activación de los hibridomas por otras metodologías igual de sensibles e incluso hacer una detección más temprana de IL-2, como lo es la citometría de flujo.

Con esta finalidad, se utilizó el sistema de activación con el hibridoma 3A9 específico para la lisozima HEL y como se observa en las figuras 5 y 6, el tiempo estimado para la medición de IL-2 intracelular, fue antes de las 16 horas

de estímulo en los ensayos de presentación; porque a mayor tiempo la IL-2 ya se secreta y se puede detectar por la proliferación de células CTLL-2. Se encontró que un 40.8% de la población de hibridomas de células T ($CD3^+$) expresó la cadena β del TCR y el 64.6% de la población $CD3^-$ o M12.A^k C3.F6 expresó la cadena β de la molécula IA^k. Además la diferencia en la expresión de IL-2 por los hibridomas antes y después del estímulo con su antígeno, no fue muy marcada [43.6% (\pm 3.5%), en comparación con el 48.6% (\pm 3.8%)]; por lo que hace suponer que el ensayo de presentación no se da en las mejores condiciones. Sin embargo, al evaluar otros marcadores de activación, como la molécula CD69, si se observa un cambio entre las células en ausencia (11.1%) y presencia del antígeno (20.4%), indicando que el hibridoma si se activó (tabla III, IV, y figura 10).

Al evaluar, bajo las mismas condiciones de activación y tinción del hibridoma 3A9, los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33, e incluso activados de manera independiente de antígeno (mediada por la activación con PHA) se encontraron prácticamente los mismos resultados: la diferencia en la expresión de IL-2, CD25, TCR- $\alpha\beta$ entre los hibridomas estimulados o no durante el ensayo de presentación, no fue tan evidente como para ser utilizados como medida de activación celular (en este estudio); aunque la expresión de CD69 indicó lo contrario (figura 15 y 16).

Para poder explicar los resultados de la baja expresión de IL-2 obtenidos por citometría de flujo y que por el contrario, al evaluar la citocina extracelularmente en ensayo con las células CTLL-2, éstas proliferan y la diferencia en el análisis de los hibridomas estimulados y no estimulados con la proteína si es muy evidente; se realizó un ensayo de linfoproliferación de células mononucleares de bazo de la misma cepa de ratón (C3H/HeJ), que se

utilizó para la generación de los hibridomas específicos contra la proteína PE_PGRS33.

En este ensayo se evaluó y se comparó tanto la IL-2 intracelular (citometría de flujo), como la IL-2 extracelular (ELISA y proliferación de células CTLL-2); para lo cual, fue necesario adicionar o no BFA a los ensayos de activación de las células con PHA, respectivamente. Sin embargo, los resultados analizados por citometría de flujo coincidieron con los obtenidos con el hibridoma 3A9 y los hibridomas específicos para PE_PGRS33.

En el análisis de la IL-2 extracelular por ELISA y proliferación de CTLL-2, si se apreció la diferencia entre los ensayos con y sin brefeldina; siendo ligeramente mayor la concentración de IL-2 (ELISA) y la proliferación de las células CTLL-2 de los ensayos sin brefeldina, como era lo esperado (figura 20, 21C y 22).

Sin embargo, algo que respalda la diferencia en los resultados obtenidos por citometría de flujo y la proliferación de células CTLL-2, es que en esta última, la proliferación se debe a la acumulación de IL-2 en el sobrenadante durante las 16 horas del ensayo de presentación. En cambio, para poder evaluar la citocina intracelularmente es necesario adicionar en los ensayos, sustancias como la BFA que retengan la citocina en el aparato de Golgi. El problema es que la BFA se adiciona 4 horas antes de terminar el ensayo de presentación y lo más probable es que a ese tiempo (12 horas) ya se haya secretado IL-2, y por eso la detección de su expresión (entre las 12 y 16 horas del ensayo) resulta baja por citometría de flujo. Lo ideal sería retener la citocina desde antes, pero eso implicaría utilizar la brefeldina por más de 4 horas y eso resulta citotóxico.

Por lo tanto, podemos concluir que la medición de IL-2 por citometría, fué menos eficiente o sensible que la obtenida por la proliferación de células CTLL-2, bajo las condiciones evaluadas en este estudio; sin embargo, ya que la medición intracelular depende de muchos factores, en estudios posteriores se podrán mejorar.

Otro aspecto importante que se consideró en este trabajo, fue la relevancia que tiene la caracterización de la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*, ya que juega un papel sumamente importante en la patogénesis y en la relación hospedero-parásito (Chaitra, 2005; Chaitra, 2007). Para poder identificar los epítopes inmunodominantes de la proteína PE_PGRS33 con capacidad de ser unidos a la molécula IA^k y ser reconocidos por el TCR del hibridoma de célula T; se sometió la secuencia de la proteína PE_PGRS33 a dos bases de datos que predicen los ligandos de unión de mayor afinidad al surco de unión a las moléculas de MHC clase II de ratón (haplotipo IA^k).

Además, la secuencia de aminoácidos también fue sometida al programa PEPTIDE CUTTER para predecir los péptidos que se generan por la digestión con la enzima tripsina. Al comparar ambas predicciones, se encontró que es factible obtener dichos ligandos con la digestión enzimática con tripsina de la proteína PE_PGRS33. Ya que esta enzima no corta el motivo de unión al MHC de estos péptidos (figura 23, Tabla VI, VII y VIII).

En base a las anteriores predicciones, se mandaron sintetizar a la compañía United Peptide Corporation (Rockville, MD 20852, EU), 3 de los péptidos de mayor afinidad a las moléculas de MHC II predichos por las bases de datos del Dr. Unanue y SYFPEITHI. Los 3 péptidos sintetizados son: Péptido 99-115 (EGVLDVINAPALALLGR), Péptido 130-146 (ANGGDGGILIGNGGAGG) y Péptido 431-450 (GLIGDGGDGGAGGNGTGAKG) (anexo 8). Por lo tanto,

será necesario confirmar experimentalmente que dichas predicciones acerca de estos péptidos son correctas y que éstos son los responsables de la activación de los hibridomas de células T específicos para la proteína PE_PGRS33.

Por otra parte, en este estudio se establecieron las condiciones óptimas para la digestión enzimática en solución con tripsina, así como para la purificación y obtención de los productos de la digestión por HPLC en fase reversa, utilizando nuevamente el hibridoma 3A9. Los péptidos de HEL purificados por HPLC, fueron evaluados en ensayos de presentación y el sobrenadante se utilizó para los bioensayos con las células CTLL-2; encontrándose 4 fracciones que indujeron la activación del hibridoma 3A9 en los ensayos de presentación de antígeno (figura 24B).

Actualmente los esfuerzos para desarrollar técnicas de inmunoprolifaxis y/o vacunas se centran en la identificación de epítopes de células T de antígenos de *M. tuberculosis* (Issar, 2003). De ahí la necesidad de continuar con la identificación y caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos inmunodominantes, como la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*.

Por lo tanto, en la siguiente etapa del proyecto, se continuará con la caracterización inmunológica y bioquímica de la proteína PE_PGRS33; ya que se procederá a realizar la digestión enzimática de la proteína y la purificación de los péptidos resultantes por HPLC. De esta manera, se podrán identificar los péptidos contenidos en las fracciones responsables de la activación de los hibridomas de células T y por técnicas como espectrometría de masas, y así poder conocer la secuencia de aminoácidos de dichos péptidos.

CONCLUSIONES

- El fenotipo de los hibridomas de células T (3C2.D4, 3C2.F5, 3C2.E7, 2F9.B7 y 2F9.E7) específicos contra la proteína PE_PGRS33 fue CD3+CD4+CD8-.
- Se estableció un método para evaluar la activación de los hibridomas de células T, por citometría de flujo, mediante la síntesis de IL-2 y la expresión de marcadores de activación.
- Se realizó una predicción de los posibles epítopes de la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* que interactúan con las moléculas de MHC II (IAk), mediante el uso de algoritmos; encontrándose que el epítipo más inmunodominante predicho (₁₀₃DVINAPALA₁₁₁) se localiza en el dominio PE, sitio altamente conservado entre los miembros de la familia de proteínas PE_PGRS.
- Se realizó una predicción de los posibles péptidos que se obtienen de la digestión enzimática con tripsina de la proteína PE_PGRS33 mediante el uso de algoritmos; obteniéndose 7 sitios de corte con una alta probabilidad de corte (74.6% – 100%).
- Se comparó la predicción de los epítopes de la proteína y la predicción de la digestión enzimática de la proteína y es factible conservar los sitios de unión al MHC II con la tripsina, de 7 de los principales epítopes predichos por las 2 bases de datos utilizadas; como el péptido de 37 aminoácidos (3436.9 Da) que se obtiene con los cortes en el aminoácido 78 y 115, que preserva el epítipo principal (₁₀₃DVINAPALA₁₁₁).

- Se establecieron las condiciones óptimas para realizar la digestión enzimática con tripsina de la proteína PE_PGRS33 y la purificación de los péptidos generados por HPLC en fase reversa.

REFERENCIAS

- Aaron L, Saadoun D, Calatroni I, Launay O, Memain N, Vincent V, Marchal G, Dupont B, Bouchaud O, Vleyre D, Lortholary O. 2004. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. *Clin Microbiol Infect.* 10 (5): 388-98.
- Balaji KN, Goyal G, Narayana Y, Srinivas M, Chaturvedi R, Mohammad S. 2007. Apoptosis triggered by Rv1818c, a PE family gene from *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by mitochondrial intermediates in T cells. *Microbes Infect.* 9 (3): 271-81.
- Banu S, Cole ST, Honore N, Philpott D, Prevost MC, Saint-Joanis B. 2002. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens?. *Mol Microbiol.* 44 (1):9-19.
- Baran J, Kowalczyk D, Ożóg M, Zembala M. 2001. Three-Color Flow Cytometry Detection of Intracellular Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Comparative Analysis of Phorbol Myristate Acetate-Ionomycin and Phytohemagglutinin Stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(2): 303-313.
- Basu S, Pathak SK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Yang Z, Talarico S, Kundu M, Basu J. 2007. Execution of Macrophage Apoptosis by PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* Is Mediated by Toll-like Receptor 2-dependent Release of Tumor Necrosis Factor. *J Biol Chem.* 282(2):1039-50.

- Boyer M, Novak Z, Fotedar A, Singh B. 1988. Contribution of Antigen Processing to the Recognition of a Synthetic Peptide Antigen by Specific T Cell Hybridomas. *J Mol Recognit.* 1(2):99-106.
- Brennan MJ, Alavi M, Bardarov S, Chen Y, Delogu G, Jacobs WR Jr, Kriakov J. 2001. Evidence that Mycobacterial PE_PGRS Proteins Are Cell Surface Constituents That Influence Interactions with Other Cells. *Infect Immun.* 69 (12):7326-33.
- Brennan PJ, Nikaido H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 64:29-63.
- Campuzano J, Aguilar D, Arriaga K, León JC, Salas-Rangel LP, González-y-Merchand J, Hernández-Pando R, Espitia C. 2007. The PGRS domain of *Mycobacterium tuberculosis* PE PGRS Rv1759c antigen is an efficient subunit vaccine to prevent reactivation in a murine model of chronic tuberculosis. *Vaccine.* 25 (18): 3722-9.
- Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology.* 148 (10):2967-73.
- Canaday DH, Boom WH, Eilertson B, Gehring A, Harding CV, Leonard EG, Schreiber JR. 2003. T-cell hybridomas from HLA-transgenic mice as tools for analysis of human antigen processing. *J Immunol Methods.* 281(1):129-42.

- Chaitra MG, Chandra NR, Hariharaputran S, Nayak R, Shaila MS. 2005. Defining putative T cell epitopes from PE and PPE families of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* with vaccine potential. *Vaccine*. 23:1265-72.
- Cimino M, Alamo L, Salazar L. 2006. Permeabilization of the mycobacterial envelope for protein cytolocalization studies by immunofluorescence microscopy. *BMC Microbiol*. 6:35.
- Cochran JR, Cameron TO, Stern LJ. 2000. The Relationship of MHC-Peptide Binding and T Cell Activation Probed Using Chemically Defined MHC Class II Oligomers. *Immunity*. 12 (3): 241–50.
- Cole ST, Badcock K, Barrell BG, Barry CE, Basham D, Brosch R, Brown D, Chillingworth T, Churcher C, Connor R, Davies R, Devlin K, Eiglmeier K, Feltwell T, Garnier T, Gas S, Gentles S, Gordon SV, Hamlin N, Harris D, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Parkhill J, Tekaia F. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393:537-44.
- Collins DP. 2000. Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems. *J Immunol Methods*. 243 (1):125-45.
- Crowther JR. 2001. The ELISA Guidebook. *Methods Mol. Biol*. 149:1-421.

- Dawn N, Flynn JL. 2004. Interleukin-12 Therapy Reduces the Number of Immune Cells and Pathology in Lungs of Mice Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 72 (5):2976-88.
- Delogu G, Brennan MJ. 2001. Comparative Immune Response to PE and PE_PGRS Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 69 (9): 5606-11.
- Delogu G, Brennan MJ, Bua A, Fadda G, Pusceddu C, Zanetti S. 2004. Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Mol Microbiol.* 52 (3):725-33.
- Delogu G, Sanguinetti M, Pusceddu C, Bua A, Brennan MJ, Zanetti S, Fadda G. 2006. PE_PGRS proteins are differentially expressed by *Mycobacterium tuberculosis* in host tissues. *Microbes Infect.* 8(8):2061-7.
- Dheenadhayalan V, Brennan MJ, Delogu G. 2006. Expression of the PE_PGRS 33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microbes Infect.* 8 (1):262-72.
- Doherty TM, Andersen P. 2005. Vaccines for Tuberculosis: Novel Concepts and Recent Progress. *Clin Microbiol Rev.* 18 (4):687-702.
- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. 1999. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA.* 282 (7): 677-86.

- Dzhambazov B, Teneva I, Koleva L, Asparuhova D, Popov N. 2003. Morphological, genetic and functional variability of a T-cell hybridoma line. *Folia Biol (Praha)*. 49(2):87-94.
- Espitia C, Amador A, Campuzano J, Cicero R, Laclette JP, Martens A, Mondragon PM, Moreno C, Singh M, Zhang Y. 1999. The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins?. *Microbiology*. 145 (12):3487-95.
- Evavold BD, Sloan-Lancaster J, Allen PM. 1994. Antagonism of superantigen-stimulated helper T-cell clones and hybridomas by altered peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91 (6): 2300-4.
- Flores J, Espitia C. 2003. Differential expression of PE and PE_PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Gene*. 318:75-81.
- Flynn JL, Chan J, 2001. Tuberculosis: Latency and Reactivation . *Infect Immun*. 69 (7):4195-4201.
- Fremont DH, Monnaie D, Nelson CA, Hendrickson WA, Unanue ER. 1998. Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope of lysozyme. *Immunity*. 8 (3):305-317.
- Garibay EA, Estrada GI, Estrada PS, Santos AL. 2003. Integrated measurements by flow cytometry of the cytokines IL-2, IFN-g, IL-12, TNF- α and functional evaluation of their receptors in human blood. *J Immunol Methods*. 280: 73-88.

- Gastélum-Aviña PC. 2008. Generación de hibridomas de células T específicos contra la proteína PE_PGRS33 de *M. tuberculosis*. Tesis del Programa de Especialización en Inmunohematología Diagnóstica.
- Germain RN, Margulies DH. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11:403-450.
- Germain RN. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 76(2):287-99.
- Gey van Pittius NC, Lee H, Kim Y, Sampson SL, Van Helden PD, Warren RM. 2006. Evolution and expansion of the Mycobacterium tuberculosis PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. *BMC Evol Biol.* 6:95.
- Gomes MS, Paul S, Moreira AL, Appelberg R, Rabinovith M, Kaplan G. 1999. Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in Acidified Vacuoles of Murine Macrophages. *Infect Immun.* 67 (7) 3199-206.
- Gugasyan R, Vidavsky I, Nelson CA, Gross ML, Unanue MR. 1998. Isolation and Quantitation of a Minor Determinant of Hen Egg White Lysozyme Bound to I-Ak by Using Peptide-Specific Immunoaffinity. *J Immunol.* 161:6074-6083.
- Haile M, Kallenius G. 2005. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Curr Opin Infect Dis.* 18 (3):211–5.

- Harding CV. 2007. Antigen processing and presentation. *Current Protocols in Immunology* . 16.0.1-16.0.3.
- Hernández PR, Orozco EH, Aguilar LD, López CF, Rook G. 2004. Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. Mensaje Bioquímico. Vol XXVIII. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF.
- Issar S. 2003. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 16 (3):463-96.
- Jouanguy E, Lamha-Cherrady S, Lammas D, Dorman SE, Fondaneche MC, Dupuis S, Döffinger R, Altare F, Emile JF, Girdelstone J, Ducoulombier H, Edgar D, Clarke J, Oxelius VA, Brai M, Novelli V, Heyne K, Fischer A, Holland SM, Kumararatne DS, Schreiber RD, Casanova JL. 1999. A Human IFNGR1 Small Deletion Hotspot Associated with Dominant Susceptibility to Mycobacterial Infection. *Nat Genet.* 21:370-78.
- Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. 1993. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immuno Methods.* 159(1-2):197-207.
- Kalergis AM, Boucheron N, Doucey MA, Palmieri E, Goyarts EC, Vegh Z, Luescher IF, Nathenson SG. 2001. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat Immunol.* 2(3):229-34.
- Karboul A, Cataldi A, Fabre M, Gey van Pittius NC, Gutierrez MC, Ho JL, Huard RC, Kreiswirth B, Kurepina N, Mardassi H, Namouchi A, Rastogi

N, Sola C, Suffys P, Vincent V. 2006. Insights into the evolutionary history of tubercle bacilli as disclosed by genetic rearrangements within a PE_PGRS duplicated gene pair. *BMC Evol Biol.* 6:107-111.

- Kaufmann SH. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. *Nat Rev Immunol.* 1 (1): 20-30.
- Khatri A, Husaini Y, Russell PJ. 2007. Murine CTLL-2 cells respond to mIL12: Prospects for developing an alternative bioassay for measurement of murine cytokines IL12 and IL18 . *J Immunol Methods* 326(1-2):41-53.
- Larsen SL, Pederson LO, Buus S, Stryhn A. 1996. T Cell Responses Affected by Aminopeptidase N (CD13)-mediated Trimming of Major Histocompatibility Complex Class II-bound Peptides. *J Exp Med.* 184 (1): 183-89.
- Mardiney M 3rd, Brown MR, Fleisher TA. 1996. Measurement of T-cell CD69 Expression: A Rapid and Efficient Means to Assess Mitogen- or Antigen-Induced Proliferative Capacity in Normals. *Cytometry* 26(4):305-10.
- Nelson CA, Roof RW, Mccourt DW, Unanue ER. 1992. Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(16): 7380-83.
- Newport M. 2003. The genetics of nontuberculous mycobacterial infection. *Exp Rev Mol Med.* 5:1-13.

- Pedroza-González A, García-Romo G, Aguilar-León D, Calderón-Amador J, Hurtado-Ortiz R, Orozco-Estevez H, Lambrecht BN, Estrada-García I, Hernández-Pando R, Flores-Romo L. 2004. In situ analysis of lung antigen-presenting cells during murine pulmonary infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Exp Pathol*. 85(3):135-45.
- Petersson K, Forsberg G, Walse B. 2004. Interplay between superantigens and immunoreceptors. *Scand J Immunol*. 59(4):345-55.
- Ramakrishnan L, Falkow S, Federspiel NA. 2000. Granuloma-Specific Expression of *Mycobacterium* Virulence Proteins from the Glycine-Rich PE-PGRS Family. *Science*. 288 (5470):1436-39.
- Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. 2004. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods*. 293(1-2):127-42.
- Riley LW. 2006. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J Clin Invest*. 116 (6): 1475-8.
- Rook GA, Hernández-Pando R. 1996. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol*. 50:259-84.
- Rook GA, Lowrie DB, Hernández-Pando R. 2007. Immunotherapeutics for Tuberculosis in Experimental Animals: Is There a Common Pathway Activated by Effective Protocols? *J Infect Dis*. 196(2):191-98.

- Rose B, Gillespie A, Wunderlich D, Kelley K, Dzuiba J, Shedd D, Cahill K, Zerler B. 1992. Differential effects of a murine and chimeric mouse/human anti-interleukin-2 receptor antibody on human T-cell proliferation. *Immunology*. 76(3):452-59.
- Sharon N, Lis H. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science*. 246 (4927):227-234.
- Singh KK, Zhang X, Patibandla AS, Chien P Jr, Laal S. 2001. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* Expressed during Preclinical Tuberculosis: Serological Immunodominance of Proteins with Repetitive Amino Acid Sequences. *Infect Immun*. 69(6):4185-91.
- Stone JD, Cochran JR, Stern LJ. 2001. T-Cell Activation by Soluble MHC Oligomers Can Be Described by a Two-Parameter Binding Model. *Biophys J*. 81(5): 2547-57.
- Suri A, Lovitch SB, Unanue ER. 2006. The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. *Curr Opin Immunol*. 18 (1):70-77.
- Talarico S, Cave MD, Foxman B, Marrs CF, Yang Z, Zhang L. 2005. Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGERS33 Gene among Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 43 (10):4954-60.
- Talarico S, Cave MD, Foxman B, Marrs CF, Zhang L, Bates JH, Yang Z. 2007. Association of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGERS33

polymorphism with clinical and epidemiological characteristics. *Tuberculosis*. 87(4): 338-46.

- Testi R, Phillips JH, Lanier LL. 1989. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol*. 143(4):1123-8.
- Tuberculosis 2007. Primera edición. Palomino JC, Cardoso LS, Ritacco V. Brasil. (www.TuberculosisTextbook.com).
- Turner MJ, Abdul-Alim S, Willis RA, Fisher TL, Lord EM, Frelinger JG. 2001. T-cell antigen discovery T-CAD/assay: a novel technique for identifying T cell epitopes. *J Immunol Methods*. 256(1-2): 107-19.
- Van Crevel R, Meer J, Ottenhoff T. 2002. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Micro Rev*. 15 (2):294-309.
- Weston L, Geczy A, Farrel C. 1998. A convenient and reliable IL-2 bioassay using frozen CTLL-2 to improve the detection of helper T lymphocyte precursors. *Immunol Cell Biol*. 76(2): 190-92.
- Zúñiga RJA, Pérez LE, Quiroz V, Vargas GA, García A, Olvera R, Navarro C, Camarena A, Granados J, Selman LM. 2000. Aspectos inmunogenéticos de la tuberculosis pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 13(4): 240-47.

ANEXO I

Inmunofenotipificación Celular por Citometría de Flujo

Reactivos

Anticuerpos monoclonales fluoromarcados (BD Bioscience Pharmingen)

Medio DMEM con 0.02% de azida de sodio

Paraformaldehído (PFA) al 2%

Material

Tubos para citometría

Micropipeta de 100-1000 μ L

Micropipeta de 2-20 μ L

Puntas para micropipetas de 100-1000 μ L

Puntas para micropipetas y de 2-20 μ L

Tela de organza

Equipo

Centrífuga (Thermolec, modelo Marathon 3000R, Fisher Scientific).

Citómetro de flujo (BD FACSCanto II)

Procedimiento

1. Realizar una dilución 1:100 de los anticuerpos monoclonales fluoromarcados en medio DMEM con 0.02% de azida de sodio.
2. Contabilizar las células a fenotipificar y ajustar la concentración celular a 2.5 millones de células por mL y posteriormente distribuir 200 μ L (500,000 células) a cada tubo de tinción.

3. Centrifugar las células a 900 x g durante 7 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante y a cada uno de los botones celulares agregar la dilución correspondiente de los anticuerpos.
4. Incubar 30 minutos a 4°C y en oscuridad.
5. Posterior a la incubación, realizar dos lavados con 400 µL de medio DMEM con 0.02% de azida de sodio, centrifugando a 900 x g por 7 minutos a 4°C.

En el caso de la tinción indirecta de los anticuerpos acoplados a biotina, después de los dos lavados adicionar la dilución de la STV-PerCP, incubar por 30 minutos bajo las condiciones anteriores y posteriormente realizar los dos lavados con DMEM-azida.

6. Con la finalidad de parar el metabolismo celular, después de los lavados resuspender las células en 200 µL de DMEM-azida y 200 µL de paraformaldehído al 2%.
7. Adquirir la tinción en un citómetro de flujo (BD FACSCanto II) y analizar los datos con el software BD FACSDiva.

ANEXO 2

Ensayo de Activación de Híbridomas de Células T

Reactivos

Proteína PE_PGRS33

Medio DMEM con 5% SFB

Material

Micropipeta de 10-100 μ L

Micropipeta de 100-1000 μ L

Micropipeta de 2-20 μ L

Puntas para micropipetas de 10-100 μ L

Puntas para micropipetas de 100-1000 μ L

Puntas para micropipetas y de 2-20 μ L

Placas de 96 pozos

Pipetas pasteur

Tubos cónicos de 15 y 50 mL

Equipo

Centrífuga (Thermolec, modelo Marathon 3000R, Fisher Scientific).

Procedimiento

1. Contar las líneas celulares a trabajar, CPA y los híbridomas de células T. El conteo celular se realiza en la cámara de Neubauer en los cuadros de blancos.

2. Ajustar la concentración a 1×10^6 células/mL. Calcular el número total de células M12A^k.C3F6 necesarias para llevar a cabo el ensayo (según el número de pozos), tomando en cuenta que se requieren 5×10^4 células C₃F₆ por pozo en un volumen de 50 μ L de medio D5F y 100 μ L de los hibridomas de células T (1×10^5 células por pozo).
3. Realizar la cuenta celular en una cámara de Neubauer, en los cuatro cuadrantes para contar glóbulos blancos y utilizar el colorante azul de tripano a una dilución 1:2.
4. Tomar el volumen de cultivo celular necesario y centrifugar a 1500 rpm, a 4°C por 7 minutos. Decantar el sobrenadante y resuspender en medio D5F (volumen suficiente según los cálculos realizados para el número de pozos a probar).
5. Preparar una solución 4X, es decir 0.4 μ M (16.28 μ g/mL) de la proteína PE_PGSR33 en medio D5F, de manera que en el ensayo, haya una concentración de la proteína de 0.1 μ M, (50 μ L de la solución 4X, para un volumen final de 200 μ L).
6. Colocar por pozo: 100 μ L de los hibridomas de células T a probar, en una placa de cultivo de 96 pozos, 50 μ L de células M12A^k.C3F6 y 50 μ L de la solución 4X de la proteína PE_PGSR33. Se debe incluir un control negativo, que contenga 50 μ L de las CPA, 100 μ L de los hibridomas y 50 μ L de medio D5F; es decir en ausencia de la proteína.
7. Incubar la placa de cultivo con las células a 37° C y en atmósfera de CO₂ durante 20 horas.

8. Después del tiempo de incubación, transferir 100 μ L del sobrenadante (IL-2) de cada pozo a otra placa de 96 pozos.
9. Congelar ambas placas a -30° C por 3-4 horas, o a 0° C por 20-24 horas.
10. Contar las células CTLL-2, y lavar 4 veces con 15 mL de DMEM, centrifugando a 1500 rpm por 7 a 4^o C. Realizar un último lavado con medio D5F, y resuspender el botón celular en 15 mL de D5F.
Nota: Contar nuevamente las células para saber el porcentaje de células que se perdió en los lavados. Además es importante que las placas congeladas (con el sobrenadante), se coloquen en la incubadora a 37° C para su posterior uso.
11. Ajustar la concentración de las células CTLL-2 a 8×10^5 células/mL.
12. Colocar 50 μ L por pozo de células CTLL-2, a la placa que contiene el sobrenadante. **Nota:** en este punto deben incluirse los siguientes controles:
Control positivo:
50 μ L de CTLL + 100 μ L de IL-2 diluída 1 :150 en medio D5F.
Control negativo:
50 μ L de CTLL + 100 μ L de medio D5F.
Control de medio:
150 μ L de medio D5F.
13. Incubar por 24 horas a 37° C y 5% de CO_2 y monitorear el control negativo hasta que casi no se observe ninguna célula viable.
14. Descongelar el MTT (sal de tetrazolium) y pasar lo necesario a una placa estéril. **Nota:** se requieren 15 μ L de MTT por pozo.

15. Colocar 15 μL de MTT en los pozos e incubar 4 horas a 37° C y 5% de CO_2 .
16. Posterior al tiempo de incubación, agregar 150 μL de isopropanol ácido a cada pozo, y disolver los cristales formados.
17. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
18. Leer la placa en un lector de microplacas de ELISA, con los filtros de 570 y 655 nm.

ANEXO 3

Evaluación de la Proliferación Celular por el Método Colorimétrico de la Sal de Tetrazolio (MTT)

La sal de tetrazolio (MTT) se utiliza para evaluar la proliferación y viabilidad de un cultivo celular. Éste es un ensayo colorimétrico en el cual interviene la reducción de la sal de tetrazolio a cristales de formazan, esto únicamente ocurre en células metabólicamente activas. A mayor proliferación celular mayor formación de los cristales y mayor será la señal generada. Los resultados se obtienen a través de un lector de microplacas.

Preparación de una solución de MTT de 5 mg/mL

Reactivos

MTT (SIGMA: M2128)

PBS 1X estéril.

Equipo

Campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, delta series, LABCONCO).

Báscula digital.

Espátula.

Jeringa.

Filtros de .22 um (Millipore GSWP02500)

Vortex.

Procedimiento

1. Pesar una cantidad pequeña de MTT en un tubo falcon de 50 mL.
2. Con ayuda de una pipeta estéril, disolver el MTT con la cantidad necesaria de PBS estéril para ajustar a una concentración de 5 mg/mL. Agitar en vortex.
3. Esterilizar la solución por filtración con ayuda de una jeringa estéril y un filtro Millipore de 0.22 μm . Recuperar la solución filtrada a un tubo falcon estéril de 15 mL.
4. La solución se debe de mantener protegida de la luz y a -30 C hasta su uso.

Evaluación de la proliferación celular por el método de MTT

1. Añadir MTT (10 μL por cada 100 μL de medio) a cada pozo de la placa que contiene las células a cuantificar.
2. Incubar la placa durante 4 horas a 37 °C.
3. Después de este tiempo; añadir isopropanol ácido (100 μL 0.04 N a cada pozo). Mezclar hasta disolver los cristales color púrpura oscuro formados.
4. Incubar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente para asegurar la disolución total de los cristales.
5. Leer la placa en un lector de ELISA con filtros de 570 nm y 655 nm.
6. Graficar las absorbancias.

ANEXO 4

Digestión Enzimática en Solución con Tripsina

Reactivos

HEL

Tris-HCl 100 mM

Tris-HCl 100 mM. Urea 6M

Tripsina (PM = 23800 g)

DTT 200 mM

Iodoacetamida 200 mM

TFA 1%

Material

Micropipeta de 10-100 μ L

Micropipeta de 100-1000 μ L

Micropipeta de 2-20 μ L

Puntas para micropipetas de 10-100 μ L

Puntas para micropipetas de 100-1000 μ L

Puntas para micropipetas y de 2-20 μ L

Tubos cónicos de 15 y 50 mL

Equipo

Centrífuga (Thermolec, modelo Marathon 3000R, Fisher Scientific).

Procedimiento

1. Disolver 1 mg de HEL en 100 μ L de solución reguladora Tris-HCl 100 mM. Urea 6 M.
2. Adicionar 5 μ L de DTT 200 mM, e incubar una hora a temperatura ambiente. Agitar.
3. Adicionar 20 μ L de iodoacetamida 200 mM (agitar). Incubar una hora a temperatura ambiente en oscuridad.
4. Adicionar 775 μ L de agua ultra pura para reducir la concentración de urea 6M a 0.6M (a esta concentración de urea, la tripsina retiene la actividad). Agitar.
5. Adicionar 100 μ L de tripsina. Agitar e incubar a 37°C toda la noche. La relación molar de tripsina con respecto a la proteína es 1:50.
6. Al día siguiente adicionar 100 μ L de TFA al 1% en agua ultrapura, para que la concentración final de la TFA sea del 0.1%.
7. Centrifugar a 900 g por 25 minutos para precipitar los péptidos.
8. Descartar el sobrenadante por aspiración y el botón de péptidos disolverlo en 200 μ L de agua ultrapura.
9. Almacenar a -20°C.

ANEXO 5

Ensayo de Linfoproliferación de Células de Bazo de Ratón

Reactivos

DMEM

DMEM suplementado al 5 y 10% con SFB

NH₄Cl al 0.15M

Ficoll-Hypaque

Material

Micropipeta de 10-100 µL

Micropipeta de 100-1000 µL

Micropipeta de 2-20 µL

Puntas para micropipetas de 10-100 µL

Puntas para micropipetas de 100-1000 µL

Puntas para micropipetas y de 2-20 µL

Tubos cónicos de 15 y 50 mL

Tela de organiza

Jeringa estéril

Placa de petri

Pipeta pasteur de vidrio

Equipo

Centrífuga (Thermolec, modelo □aratón 3000R, Fisher Scientific).

Procedimiento

1. Sacrificar y extraer el bazo de un ratón
2. Homogenizar el bazo en una placa de petri con 10 mL de medio DMEM suplementado al 10% con SFB, utilizando la parte posterior de una jeringa estéril.
3. Filtrar a través de la tela de organiza estéril, en un tubo cónico de 50 mL.
4. Centrifugar a 900 g por 5 minutos a temperatura ambiente y retirar el sobrenadante.
5. Resuspender el botón celular con 5 mL de NH_4Cl al 0.15 M por 5 minutos (Agitar a los 2 y 5 minutos).
6. Adicionar 5 mL de DMEM y centrifugar a 900 g por 5 minutos y retirar el sobrenadante por aspiración.
7. Resuspender el botón celular con 5 mL de DMEM y pasar a un tubo cónico de 50 mL con 2.5 mL de Ficoll-Hypaque.
8. Centrifugar a 900 g por 20 minutos a temperatura ambiente.
9. Separar la capa de células mononucleares con pipeta pasteur de vidrio y pasar a un tubo cónico.
10. Lavar con 5 mL de DMEM.
11. Resuspender el botón celular con 10 mL de D5F y contar.
12. Ajustar la concentración celular e incubar a 37°C, 5% de CO_2 en una caja de cultivo vertical.
13. Realizar ensayo de activación.

ANEXO 6

ELISA Indirecto para la Determinación de la Producción de IL-2

Reactivos

PBS-Tween-20 al 0.025%

Regulador de fosfatos

Estándar de IL-12

Anticuerpo de rata anti-IL2 de ratón

Solución reguladora de carbonatos pH 9.6.

Solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1%

Anticuerpo de rata anti-IL2 de ratón biotinilado

Conjugada con peroxidasa de rábano diluída 1:2000 con PBS-BSA al 1%

Solución cromógeno-sustrato (1 mL de ABTS más 1 μ L de H₂O₂ al 30%).

Material

Micropipeta de 10-100 μ L

Micropipeta de 100-1000 μ L

Micropipeta de 2-20 μ L

Puntas para micropipetas de 10-100 μ L

Puntas para micropipetas de 100-1000 μ L

Puntas para micropipetas y de 2-20 μ L

Microplaca de poliestireno de 96 pozos

Equipo

Lector de microplacas (Original Multiskan Ex, ThermoLab Systems)

Procedimiento

1. Realizar una curva de calibración del estándar de IL-12, mediante diluciones en serie con un regulador de fosfatos, en U/mL.
2. Colocar 1 µg de anticuerpo de rata anti-IL2 de ratón en cada uno de los pozos de una microplaca de poliestireno de 96 pozos, en un volumen de 50 µL de solución reguladora de carbonatos pH 9.6.
3. Incubar de 1.5 a 2 horas a 37°C o toda la noche a 4°C,
4. Lavar 5 veces la placa con PBS-Tween-20 al 0.025%
5. Bloquear los sitios libres del anticuerpo con 50 µL de solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS, por pozo.
6. Incubar por una hora a temperatura ambiente y lavar la placa 5 veces
7. Adicionar 50 µL del sobrenadante de cada hibridoma (recuperado del ensayo de presentación de antígeno) o 50 µL de cada una de las diluciones del estándar y se incubará por una hora a temperatura ambiente y en agitación suave.
8. Adicionar 1 µg de anticuerpo de rata anti-IL2 de ratón biotinilado en un volumen de 50 µL, con PBS-BSA al 1% e incubar la placa por una hora.
9. Lavar 5 veces
10. Adicionar 50 µL de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano diluída 1:2000 con PBS-BSA al 1% e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Adicionar 50 µL de la solución cromógeno-sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-6,3-dietilbenstiazolinsulfónico) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a cada pozo (1 mL de ABTS más 1 µL de H₂O₂ al 30%).
12. Incubar la placa por 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave.

13. Medir la densidad óptica de cada pozo a una longitud de onda de 415 nm en un lector de microplacas, en un margen no mayor de 30 minutos. La intensidad del color será dependiente de la cantidad de IL-2 presente en el sobrenadante.

ANEXO 7

ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA AL 12%

Reactivos

1. Acrilamida 30% / Bisacrilamida 0.8%

Acrilamida 30 g

N,N'-metilén-bis-acrilamida 0.8 g

Mezclar en un volumen final de 100 mL de agua deionizada, filtrar la solución a través de un filtro de 0.45 μm . Su almacenamiento debe ser un frasco ámbar a 4°C. Descartar el reactivo después de 30 días de su elaboración, esto para evitar la hidrólisis a ácido acrílico y amoníaco.

Nota: La acrilamida monomérica es neurotóxica, por lo que se debe portar mascarilla de seguridad y guantes durante su preparación.

2. Trizma-Base/SDS, pH 6.8 4X (Trizma-base 0.5 M con 0.4% de SDS)

Trizma Base 6.05 g

Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 0.4 g

Disolver la Trizma-base en 40 mL de agua deionizada y ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N y aforar a 100 mL con agua deionizada. Filtrar la solución con un filtro de 0.45 μm y posteriormente adicionar 0.4 g de SDS. Este reactivo se debe almacenar a 4°C.

3. Trizma-Base/SDS, pH 8.8 4X (Trizma-base 1.5 M con 0.4% de SDS)

Trizma-base 91 g

Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 0.4 g

Disolver los 91 g de Trizma base en 300 mL de agua deionizada y ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N; aforar a 500 mL con agua deionizada. Filtrar a través de un filtro de 0.45 μ m, posteriormente adicionar 2 g de SDS y almacenar en refrigeración.

4. Persulfato de Sodio (APS) al 10%

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 10 μ g

Disolver en 100 μ L de agua deionizada

5. N, N, N', N'-Tetrametilendiamina (TEMED)

Este reactivo se encuentra listo para usarse.

6. Solución reguladora de corrida 5X

Glicina 72 g

Trizma-base 15.1 g

SDS 5 g

Disolver en agua deionizada y aforar a 1 Lt.

Para la solución de trabajo (1X), realizar una dilución 1:5 de la solución reguladora de corrida 5X y ajustar el pH a 8.3. Almacenar a 4°C.

7. Solución reguladora de muestra (Buffer muestra) 2X.

Tris HCl 0.125 M,

SDS 4%,

glicerol 20%,

2-mercaptoetanol 10%.

Disolver 0.38 g de Trizma-base en agua deionizada y ajustar el pH a 6.8. Añadir los siguientes reactivos en campana ventilada:

SDS	1 g
Glicerol	5 mL
2-mercaptoetanol	2.5 mL
Azul de bromofenol	0.5 mg

Aforar a 25 mL con agua deionizada. Este reactivo debe almacenarse en congelación a -20°C.

Material

Micropipeta de 100-1000 µL

Micropipeta de 2-20 µL

Micropipeta de 20-200 µL

Puntas para micropipeta de 1000 µL

Puntas para micropipetas de 2-20 y 20-200 µL

Vasos de precipitados de 50 y 100 mL

Equipo

Cámara de electroforesis

Fuente de poder

Centrífuga

Procedimiento

1. Ensamblar en lo vidrios en el equipo formador de geles.
2. Revisar que no haya fuga de líquidos, utilizando para ello alcohol etílico al 70%.
3. Descartar el alcohol y retirar el remanente del mismo con ayuda de un papel filtro.

4. Preparar el gel separador (12%) de 0.75 mm de grosor.

Mezclar 2 mL de acrilamida/bisacrilamida 30%/0.8%, 1.25 mL de solución reguladora Tris 4X con SDS-page (pH 8.8), 1.75 mL de agua deionizada, 17 μ L de APS y 3.3 μ L de TEMED.

Mezclar muy bien e inmediatamente colocar el gel entre los vidrios para electroforesis, evitando la formación de burbujas.

5. Agregar en la superficie del gel una capa de alcohol etílico al 70%, teniendo cuidado de no inducir la formación de burbujas.
6. Dejar polimerizar el gel a temperatura ambiente.
7. Una vez polimerizado el gel, descartar el alcohol y retirar el remanente del mismo con ayuda de un papel filtro, sin tocar el gel.
8. Preparar el gel concentrador (12%) de 0.75 mm de grosor:

Mezclar 0.325 mL de acrilamida/bisacrilamida 30%/0.8%, 0.625 mL de solución reguladora Tris 4X con SDS-page (pH 6.8), 1.52 mL de agua deionizada, 12.5 μ L de APS y 2.5 μ L de TEMED.

Mezclar muy bien e inmediatamente colocar el gel entre los vidrios para electroforesis e insertar el peine separador que formará 10 pozos de 5 mm de ancho cada uno. Dejar polimerizar a temperatura ambiente.

9. Preparar las muestras a correr, haciendo una dilución de la proteína 1:2 con el buffer muestra 2X, o bien, 1:6 con el buffer muestra 6X, según sea el caso.

Para el marcador de peso molecular (MPM; BIO-RAD, Presicion Protein Standards. Unstained, Broad Range, cat. 0161-0362) realizar una dilución 1:20 con buffer muestra 2X.

10. Mezclar muy bien las soluciones preparadas en el paso anterior y hervirlas durante 3 minutos para desnaturalizar las proteínas.
11. Finalmente, cargar las muestras en los pozos respectivos, cargando 20 μ L de cada muestra y 3 μ L del MPM preparado anteriormente.

12. Aplicar voltaje constante de 80 V hasta que las muestras entren al gel separador, una vez que éstas han entrado al gel separador aumentar a 100 V constantes por aproximadamente 1 hora o hasta que el azul de bromofenol llegue al borde inferior de los vidrios.
13. Desmontar el gel y proceder a realizar la tinción de las proteínas con nitrato de plata.

ANEXO 8

Péptidos de la Proteína PE_PGRS33 Sintetizados por United Peptide Corporation.

* Péptido 99-115

Secuencia: EGVLDVINAPALALLGR

Peso Molecular (teórico): 1721.05

Pureza (HPLC): 96.78% (HPLC, 220 nm, Kromasil C18-5)

Composición:

Aminoácidos hidrofóbicos	64.71 %
Aminoácidos ácidos	11.76 %
Aminoácidos básicos	5.88 %
Aminoácidos neutros	17.65 %

* Péptido 130-146

Secuencia: ANGGDGGILIGNGGAGG

Peso Molecular (teórico): 1356.43

Pureza (HPLC): 95.39% (HPLC, 220 nm, Kromasil C18-5)

Composición:

Aminoácidos hidrofóbicos	29.41 %
Aminoácidos ácidos	5.88 %
Aminoácidos básicos	0.00 %
Aminoácidos neutros	64.71 %

*** Péptido 431-450**

Secuencia: GLIGDGGDGGAGGNGTGAKG

Peso Molecular (teórico): 1587.64

Pureza (HPLC): 95.26 % (HPLC, 220 nm, Kromasil C18-5)

Composición:

Aminoácidos hidrofóbicos	20.00 %
Aminoácidos ácidos	10.00 %
Aminoácidos básicos	5.00 %
Aminoácidos neutros	65.00 %