

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**Evaluación del efecto protector *in vitro* de la proteína PE\_PGRS33 de  
*Mycobacterium tuberculosis***



Presenta

**David Ortega Tirado**

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2016

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



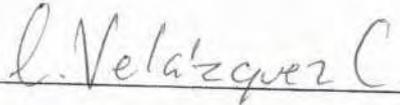
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **David Ortega Tirado**, 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



Dra. Olivia Valenzuela Antelo  
Vocal



Dra. Adriana Sumoza Toledo  
Suplente

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de Investigación en Productos Naturales y de Inmunología-Biología Celular del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora, bajo la dirección de la Dra. Adriana Garibay Escobar con financiamiento del CONACYT (proyecto No. 83224).

## **AGRADECIMIENTOS**

Muchas personas contribuyeron para hacer posible este logro y a ellos agradezco:

En primer lugar agradezco a mi familia; a mis padres Ana y David y a mis hermanos Saúl y Daisy, por siempre brindarme su apoyo y amor de manera incondicional sin el cual este logro no hubiera sido posible. En especial a mi amada sobrina Dailen, por ser mi alegría diaria e inspirarme a querer ser mejor.

A mi directora, la Dra. Adriana Garibay por nunca perder la fe en mí a pesar de todos los obstáculos que se presentaron durante el trayecto y siempre darme palabras de apoyo y aliento.

Al Dr. Carlos Velázquez, por todos sus consejos y aportaciones a este trabajo y por enseñarme que siempre puedes hacerlo mejor.

A Paola Gastélum, quien fue parte importante para cumplir este logro al ser una gran mentora, pues siempre estuvo ahí brindándome sus consejos y ayuda incondicional.

A mis compañeros del CABB, por todas las risas y gratos momentos que pasé en su compañía.

A mis amigos Jorge Iván, Francisco, Carolina y Carlos por estar conmigo en los malos y buenos momentos y con quienes he logrado cultivar una amistad verdadera.

A la maestra Martha Judith, por su ayuda y asistencia en el uso del citómetro de flujo.

De manera especial a Brenda y Elia, maravillosos seres humanos con los que tuve la gracia de coincidir y quienes hoy forman parte importante de mi vida.

A la maestra Lucila, por siempre estar al pendiente, por brindarme ánimos y sonrisas para seguir adelante y quien se ha ganado mi más sincero cariño.

Agradezco al Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica (CABB) por abrirme las puertas de su grupo de trabajo y permitirme desarrollarme y crecer de manera profesional.

A la Dra. Clara Espitia de la UNAM, por haber proporcionado la proteína PE\_PGRS33 para realizar la presente investigación.

David Ortega

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	viii
<b>OBJETIVOS</b>	X
Objetivo General	X
Objetivos Particulares	X
<b>RESUMEN</b>	Xi
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	4
Generalidades de la Tuberculosis	4
Respuesta Inmune en Tuberculosis	6
Inmunidad Innata	7
Inmunidad Adaptativa	8
Macrófagos y su Papel en la Inmunidad Contra <i>M. tuberculosis</i>	12
Fenotipos Funcionales de Macrófagos	13
Respuesta Inmune Contra <i>M. tuberculosis</i>	14
Proteína PE_PGRS33 de <i>M. tuberculosis</i>	16
Principios Inmunológicos Aplicados al Diseño de Nuevas Vacunas	21

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	26
Cultivo y Mantenimiento de Líneas Celulares	26
Generación y Caracterización de Factores de Activación en un Sistema de Procesamiento y Presentación de PE_PGRS33 <i>in vitro</i>	26
Evaluación de la Expresión de MHC-II (I-A <sup>k</sup> ) en Células RAW 264.7 Estimuladas con los Factores de Activación del Sistema de Procesamiento y Presentación de PE_PGRS33	27
Generación de Especies Reactivas de Oxígeno en Células RAW 264.7 Estimuladas con los Factores de Activación del Sistema de Procesamiento y Presentación de PE_PGRS33	28
Cuantificación de la Secreción de IL-12 y TNF- $\alpha$ por Células RAW 264.7 Estimuladas con los Factores de Activación del Sistema de Procesamiento y Presentación de PE_PGRS33	29
<b>RESULTADOS</b>	30
Generación y Caracterización de Factores de Activación Inducidos por la Proteína PE_PGRS33 en un Sistema de Procesamiento y Presentación de antígeno <i>in vitro</i>	30
Evaluación de la Activación de Células RAW 264.7 Mediante la Detección de Citocinas	37
Inducción de la Expresión de MHC-II (I-A <sup>k</sup> ) en Células RAW 264.7	40
Inducción de Estallido Respiratorio en Células RAW 264.7	43

<b>DISCUSIÓN</b>	45
<b>CONCLUSIONES</b>	53
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	54
<b>ANEXOS</b>	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Infección, curso de la enfermedad y mecanismos inmunes activados en tuberculosis	5
2. Respuesta inmune celular contra <i>M. tuberculosis</i>	9
3. Secuencia de aminoácidos de la proteína PE_PGRS33	18
4. Características y funciones de la proteína PE_PGRS33 de <i>M. tuberculosis</i>	19
5. Esquema general de los eventos desarrollado después de la inmunización inducida por vacunas	22
6. Evaluación de la secreción de IL-2 del hibridoma 3C2.D6 por citometría de flujo	31
7. Activación antígeno-específica del hibridoma 3C2.D6 específico contra la proteína PE_PGRS33	33
8. Activación de hibridoma 3C2.D6 específico contra la proteína PE_PGRS33	34
9. Análisis de la secreción de citocinas por el hibridoma 3C2.D6	36
10. Secreción de citocinas por macrófagos RAW 264.7 estimulados con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE_PGRS33	38

11. Secreción de TNF- $\alpha$ e IL-12 por macrófagos RAW 264.7 estimulados con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE_PGRS33	39
12. Expresión de MHC-II (I-A <sup>k</sup> ) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE_PGRS33	41
13. Intensidad media de fluorescencia (I-A <sup>k</sup> ) asociada a la expresión de MHC-II en células RAW 264.7 estimuladas con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE_PGRS33	42
14. Inducción de estallido respiratorio en células RAW 264.7 estimuladas con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE_PGRS33	44
15. Modelo del mecanismo de secreción de citocinas en células RAW 264.7 estimuladas por factores inducidos por PE_PGRS33	48
16. Vía alterna de producción de IL-10 en células RAW 264.7 estimuladas con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE_PGRS33	49
17. Modelo de inhibición en la expresión de MHC-II (I-A <sup>k</sup> ) en células RAW 264.7	51
18. Proceso de inducción de estallido respiratorio	52

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar el efecto protector *in vitro* de la proteína PE\_PGRS33.

### Objetivos Particulares

- Generar y caracterizar factores de activación inducidos por la proteína PE\_PGRS33 en un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*.
- Caracterizar el perfil de citocinas secretadas por macrófagos RAW 264.7 estimulados con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33, mediante un ensayo de ELISA y un análisis múltiple de citocinas por citometría de flujo.
- Evaluar el estallido respiratorio en macrófagos RAW 264.7 estimulados con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33, a través de la reducción de nitro azul de tetrazolio.
- Analizar la función efectora de macrófagos RAW 264.7 estimulados con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33, mediante la detección de la expresión de MHC-II (IA<sup>k</sup>) por citometría de flujo.

## RESUMEN

En la actualidad, un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), debido entre otras causas, a la falta de una medida profiláctica eficiente. En consecuencia, la tuberculosis (TB) continúa siendo un problema de salud pública. La BCG (Bacillus Calmette-Guerin) es la única vacuna autorizada contra la TB, pero posee la desventaja de sólo brindar protección en la infancia mientras que en la adultez su espectro de protección es muy variable (0 a 80%). Debido a esto surge la necesidad de desarrollar una vacuna que sea más eficaz en controlar la TB. Para esto, es necesario identificar antígenos de *M. tuberculosis* capaces de generar una respuesta inmune protectora contra la infección. En este sentido, la proteína PE\_PGRS33 de *M. tuberculosis* ha demostrado tener propiedades inflamatorias y la capacidad de generar respuestas tanto de tipo celular como humoral. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto protector de la proteína PE\_PGRS33 de *M. tuberculosis* mediante la caracterización de factores de activación generados a través de un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro* (hibridoma 3C2.D6) y la subsecuente evaluación de sus actividades biológicas sobre macrófagos RAW 264.7 en base a la expresión de MHC-II (IA<sup>k</sup>), producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y citocinas. Los resultados mostraron que el hibridoma 3C2.D6 secretó TNF- $\alpha$  en respuesta al estímulo de PE\_PGRS33. Por su parte, los macrófagos RAW 264.7 estimulados con el sobrenadante del hibridoma 3C2.D6, secretaron TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10, IL-6 y GM-CSF. Sin embargo, no se detectó un aumento en la expresión de MHC-II (IA<sup>k</sup>) ni síntesis de especies de ERO.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una infección bacteriana causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), afecta aproximadamente entre 8-10 millones de individuos y causa 2 millones de muertes anualmente (Raja, 2004; Chacon-Salinas y col., 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* por lo que la TB continúa siendo un problema de salud pública. Sólo en el 2014, se reportó una incidencia de 9.6 millones de nuevos casos y 1.5 millones de muertes a nivel mundial a causa de esta enfermedad (OMS, 2015). Además, la TB está catalogada como la segunda causa de muerte debido a una enfermedad transmisible (Lemmer y col., 2015).

Los factores que contribuyen al problema global de la TB son varios, entre ellos, podemos citar la aparición de cepas multidrogorresistentes, la asociación de casos de VIH/TB y la falta de una medida profiláctica eficiente para controlar la enfermedad; siendo esta última una de las causas de mayor influencia (García y col., 2009).

La BCG es actualmente la única vacuna autorizada contra la TB. Dicha vacuna ha probado su eficacia cuando se aplica durante la infancia, pues en esta etapa logra combatir la TB meníngea y evitar la propagación de la enfermedad. Sin embargo, en la etapa adulta, la BCG no es capaz de brindar una protección efectiva ni evitar la transmisión de la enfermedad. Su espectro de protección durante esta etapa varía de 0 a 80% según la región geográfica (Principi y col., 2015). Debido a esto, es necesario el desarrollo de una vacuna más eficaz para controlar la enfermedad.

Actualmente existen múltiples estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas, desde aquellas desarrolladas a partir de versiones atenuadas del

microorganismo, las basadas en ADN o a las creadas a base de subunidades proteicas derivadas del patógeno. Esta última estrategia ha sido aplicada en el campo de la TB, por lo cual se encuentran en desarrollo investigaciones dedicadas a buscar epítopes inmunodominantes de antígenos de *M. tuberculosis* que despierten una respuesta inmune y confieran protección ante la enfermedad; siendo de vital importancia estudiar, primeramente, la respuesta inmune (RI) que estos antígenos puedan despertar en el hospedero centrándose en aquellos que desencadenen una RI de tipo celular o mediada por células T, considerada como una respuesta protectora (Cooper, 2009).

Lo anterior ha tenido grandes avances desde que se logró secuenciar el genoma de *M. tuberculosis*, el cual alrededor del 5% codifica para la familia de proteínas PE\_PGRS (Cole y col., 1998). Esta familia consta de 65 miembros y se caracterizan por poseer un dominio PE de 110 aminoácidos en el extremo N-terminal altamente conservado entre todos los miembros de la familia; y un dominio PGRS muy polimórfico en el extremo C-terminal caracterizado por presentar repeticiones de los aminoácidos glicina-alanina (Cadieux y col., 2011). La proteína PE\_PGRS33 es hasta el momento el más estudiado de todos.

La proteína PE\_PGRS33 es codificada por el gen Rv1818c y está constituida por 499 aminoácidos. Está conformada por un dominio PE en su extremo N-terminal y un dominio PGRS polimórfico en el extremo C-terminal (Vallecillo y col., 2009). Esta proteína se caracteriza por expresarse solamente en la superficie de cepas patógenas de *M. tuberculosis*.

Estudios en el modelo murino han revelado que su dominio PE es responsable de desencadenar una respuesta de tipo celular mientras que el dominio PGRS una de tipo humoral. Se sabe que es capaz de provocar la secreción de TNF- $\alpha$  al interactuar con el receptor de tipo Toll 2 (Basu y col., 2007). Además, promueve la sobrevivencia de *M. tuberculosis* dentro del

granuloma y altera el perfil de citocinas de las células del hospedero (Gastélum-Aviña y col., 2015).

Por lo anterior, la proteína PE\_PGRS33 podría ser una buena candidata para la búsqueda de nuevos epítopes inmunodominantes que puedan ser utilizados para el desarrollo de una nueva vacuna contra la TB. Para ello es necesario evaluar antes la RI provocada por esta proteína. Es por esto que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la RI y efecto protector de la proteína PE\_PGRS33.

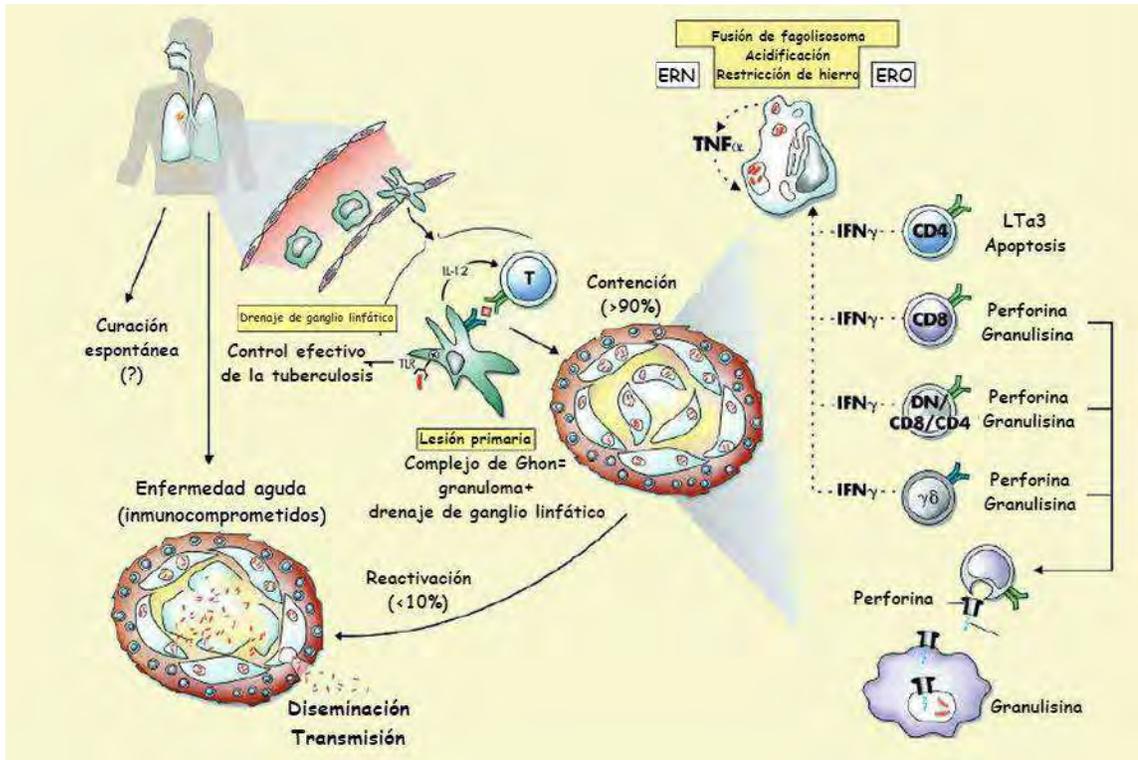
## ANTECEDENTES

### Generalidades de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa provocada en humanos principalmente por *M. tuberculosis*. La TB se contagia de manera fácil y rápida cuando una persona infectada, al toser o hablar, expelle gotas en forma de aerosol que contienen la micobacteria, las cuales son inhaladas por individuos sanos; siendo el pulmón el sitio primario de infección (García y col., 2009).

Los individuos infectados por *M. tuberculosis* pueden cursar por tres estadios de la enfermedad (figura 1). El primero consiste en la eliminación espontánea de la infección por mecanismos de la inmunidad innata aún no descritos. El segundo es aquel donde el individuo desarrolla la forma activa de la enfermedad, esto ocurre en personas inmunocomprometidas o inmunosuprimidas. Y en el tercero, el cual se presenta en más del 90% de los casos, los sujetos infectados logran contener la infección a través de la formación del granuloma, una estructura organizada de células inmunes por la aparición de un estímulo persistente en el organismo. Es en este estadio donde el paciente ha entrado en un estado de latencia (Kauffman, 2004).

Uno de los requerimientos para que se establezca la infección por *M. tuberculosis* es que las partículas inhaladas, las cuales contienen micobacteria, atraviesen las defensas del tracto respiratorio superior y se depositen en el pulmón. La infección inicia en el alveolo pulmonar donde eventualmente los macrófagos residentes comenzarán a fagocitar a la micobacteria (Bhatia, 2010).



**Figura 1.** Infección, curso de la enfermedad y mecanismos inmunes activados en tuberculosis. IFN, interferón; IL, interleucina; LT, linfoxina; TNF, factor de necrosis tumoral; TLR, receptor tipo toll; ERN/ERO, especies reactivas de nitrógeno/oxígeno (Kauffman, 2004).

En pacientes no inmunocompetentes o cuando la carga bacteriana es muy alta y/o el microorganismo posee alta virulencia, los macrófagos son incapaces de destruir al bacilo creando así un nicho donde seguirá multiplicándose hasta provocar la muerte del macrófago (Georgiev, 2009).

Posteriormente, células T y B activadas migrarán al sitio de infección y rodearán a los fagocitos infectados culminando con la formación de un granuloma para evitar la expansión de la infección. No obstante, *M. tuberculosis* puede diseminarse hacia otros tejidos u órganos del cuerpo vía hematológica o directamente hacia un órgano adyacente y provocar tuberculosis extrapulmonar en sus distintas variantes. Dentro de estas, las más comunes son la tuberculosis miliar, genitourinaria y la meningitis tuberculosa (Zierhut, 2016).

El escenario definitivo a presentarse cuando un individuo se infecta con *M. tuberculosis*, es definido por el equilibrio alcanzado entre los mecanismos inmunológicos del hospedero y los factores de virulencia del patógeno.

### **Respuesta Inmune en Tuberculosis**

El curso de la infección por *M. tuberculosis* depende de las interacciones entre los factores de virulencia del bacilo y los componentes inmunes del hospedero. Dichas interacciones determinarán los mecanismos de la inmunidad innata que serán activados y que a su vez influirán en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa.

Con la ayuda de modelos experimentales se ha demostrado que la respuesta temprana del hospedero hacia la infección es caracterizada por la afluencia de células fagocíticas, principalmente de macrófagos alveolares residentes y neutrófilos. Una vez establecida la infección en el parénquima pulmonar, el bacilo es fagocitado por macrófagos alveolares, neutrófilos y células dendríticas.

## **Inmunidad Innata**

La primera línea de defensa contra el bacilo tuberculoso la constituye la inmunidad innata, haciendo uso de diversos factores que juegan un papel a favor o en contra del hospedero. Por ejemplo, las metaloproteinasas (MPP) que contribuyen a la destrucción y patología del tejido pulmonar, tal como MMP-1 y 9 que aumentan su expresión durante la TB y son un mal pronóstico de la enfermedad al aumentar el daño en el parénquima pulmonar. Esto ha sido corroborado en modelos murinos (Elkington y col., 2011).

Otro componente importante del sistema inmune innato, y del cual su papel en la TB no es muy discutido, son las vitaminas. Desde tiempo atrás, se conoce que la vitamina D juega un papel importante en la inmunidad hacia *M. tuberculosis*, tal como lo revelaron los ensayos clínicos donde esta prohormona mostró moderada eficacia contra la infección al añadirse al tratamiento antituberculoso estándar (Nursyam y col., 2006). Además, la deficiencia de vitamina D es asociada con el riesgo de padecer la enfermedad activa (Martineau y col., 2011). Además, esta molécula influye en el desarrollo de una respuesta tipo Th1, esencial para controlar la TB.

Para que la infección por *M. tuberculosis* se establezca, es necesario que el bacilo sea reconocido por las células del sistema inmune innato. Tal cometido se logra a través de distintos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) tales como los receptores de manosa, receptores scavenger, receptores de lectinas tipo C y los receptores de tipo Toll (TLR) (Kleinnijenhuis y col., 2011). Estudios en humanos han demostrado que la presencia de mutaciones en genes que codifican para PRRs y en distintas moléculas asociadas a sus vías de señalización se relaciona con una susceptibilidad a padecer la enfermedad. Por ejemplo, ratones deficientes de MyD88 son más susceptibles a la infección por *M. tuberculosis*, debido a una

disminución en los niveles de IL-12 y TNF- $\alpha$  secretados por macrófagos y células dendríticas infectadas (Scanga y col., 2004).

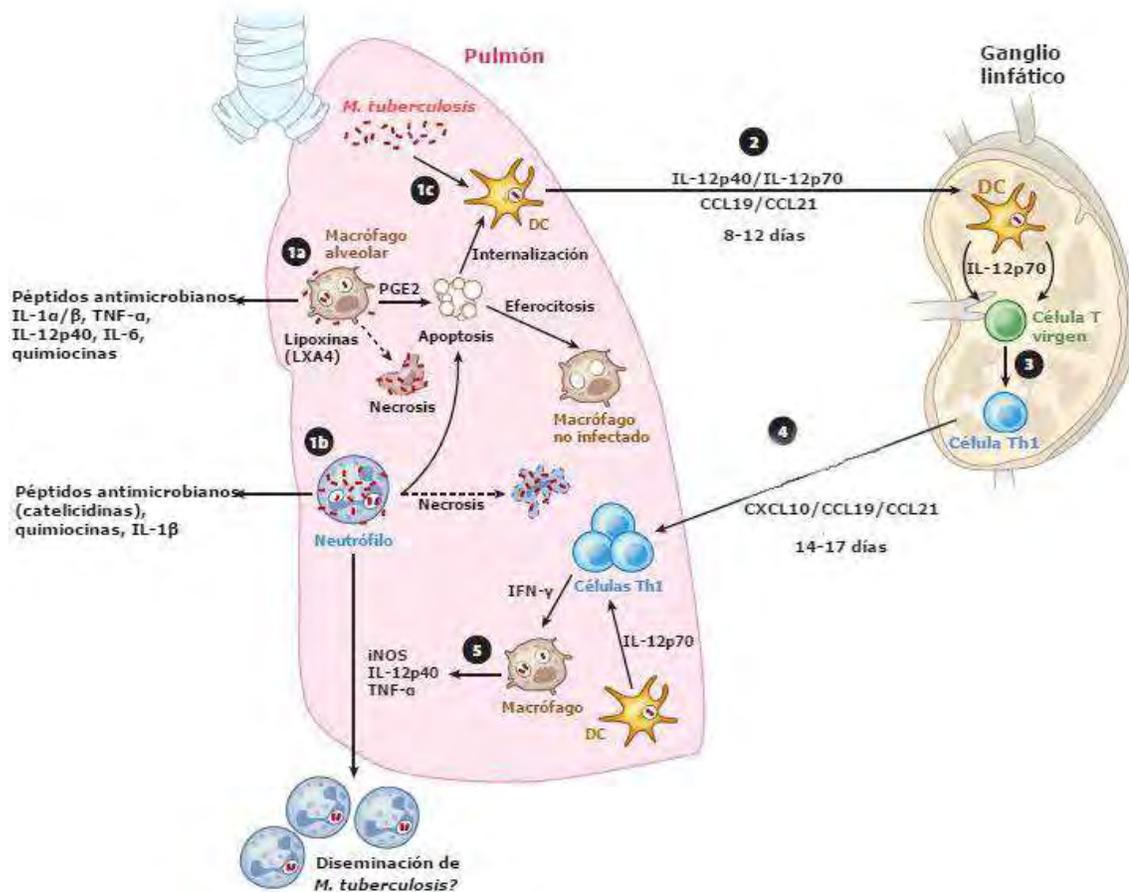
Los TLRs que han sido descritos que participan en el reconocimiento de la micobacteria por parte del hospedero son TLR2, TLR4 y TLR9. A través de estas moléculas, la micobacteria envía señales para modular la respuesta inmune a su favor, afectando la eficiencia de la respuesta inmune innata, provocando daños patológicos en el pulmón y alterando el perfil de citocinas presente en el sitio de la infección. Este efecto se encuentra ligado al TLR que sea activado; es decir, según sea el receptor pueden presentarse diferencias en el perfil de citocinas secretados por las células de la inmunidad innata (O'Garra y col., 2013).

Los componentes que conforman la inmunidad innata contra *M. tuberculosis* son muchos y la interacción entre ellos y la micobacteria influyen en el tipo y en el desarrollo de la subsecuente respuesta inmune adaptativa contra el bacilo de la TB.

### **Inmunidad Adaptativa**

La mayoría de los patógenos han logrado evolucionar para evadir las defensas de la inmunidad innata, en tal caso, el sistema inmune desencadena los mecanismos efectores de la inmunidad adaptativa a cargo de las células T y B.

Años de investigación han formado las bases del conocimiento sobre las cuales se apoya la indiscutible participación de la inmunidad mediada por células T para el control de la infección por *M. tuberculosis* (figura 2).



**Figura 2.** Respuesta inmune celular contra *M. tuberculosis*. En un comienzo, macrófagos alveolares residentes (1a), neutrófilos (1b) y células dendríticas (DCs) de pulmón (1c) son infectados, provocando la secreción y producción de péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas. El balance de mediadores lipídicos, como prostaglandina E2 o lipoxina A4, dentro del macrófago infectado determina la inducción de apoptosis o necrosis. Células apoptóticas infectadas son ingeridas por DCs de pulmón o eferocitadas por macrófagos no infectados (1c). DCs infectadas migran al ganglio linfático local de pulmón alrededor de 8-12 días post infección para inducir la diferenciación de células T vírgenes hacia un fenotipo Th1. Células Th1 protectoras migran de regreso al pulmón y producen IFN- $\gamma$ , desencadenando la activación de los macrófagos, producción de citocinas y factores microbicidas incluyendo iNOS (O'Garra y col., 2013).

La inmunidad protectora y el control del crecimiento de *M. tuberculosis* recaen sobre las células T CD4<sup>+</sup>, tal como lo muestran estudios en ratones deficientes en estas células (o deficientes en MHC-II) que sucumben a la infección; y las observaciones en pacientes HIV+ incapaces de controlar el crecimiento de la micobacteria. Por otro lado, el papel de las células T CD8<sup>+</sup> en el control de la infección por la micobacteria está dado por la secreción de IFN- $\gamma$ , potenciando la actividad bactericida de los macrófagos, y por la secreción de componentes que directamente destruyen a la bacteria. No obstante, aún en presencia de células T CD8<sup>+</sup>, la RI no es capaz de suplir la ausencia de las células T CD4<sup>+</sup> en lo respectivo al control de la infección (O'Garra y col., 2013). Un factor esencial que influye en la contención y delimitación de la expansión de *M. tuberculosis* es el tipo de respuesta efectora de células T generada durante la infección. Durante el proceso de diferenciación dirigida por antígeno, una célula T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> puede adquirir la capacidad de secretar de manera simultánea dos o más citocinas. En el caso de la inmunidad contra TB, se espera que estas células T polifuncionales tengan un potencial efector mayor, un prototipo ideal sería una de tipo trifuncional capaz de secretar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, describiendo a una célula con capacidad efectora y proliferativa (Seder y col., 2008).

La presencia de estas poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> multifuncionales ha sido evaluada en la TB, encontrando una mayor frecuencia de células mono- o bifuncionales secretoras de TNF- $\alpha$  o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  durante la enfermedad activa. En contraste, individuos con infección latente exhiben mayor presencia de células trifuncionales T CD4<sup>+</sup> (IL-2<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) (Jeong y col., 2014).

La función concreta de estas células polifuncionales en la respuesta inmune hacia *M. tuberculosis* aún necesita ser estudiada a profundidad; sin embargo, hasta el momento se conoce que en el caso de aquellas células trifuncionales la secreción de citocinas ocurre de manera secuencial, precediendo la secreción de TNF- $\alpha$  a la de IFN- $\gamma$  e IL-2 (Han y col., 2012).

Una vez que las células T CD4<sup>+</sup> han sido activadas por los antígenos micobacterianos migran al sitio de infección en el pulmón. No obstante, este hecho no es garantía del establecimiento de una respuesta inmune efectiva, puesto que en el pulmón los linfocitos T son expuestos a una serie de condiciones adversas que pueden afectar su capacidad funcional. Por ejemplo, es conocido que el óxido nítrico producido en el área de lesión micobacteriana es perjudicial para la supervivencia y función de las células T en el pulmón (Robinson y col., 2015). Por otro lado, con el uso de modelos murinos se ha descrito la existencia de ciertos fenotipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> capaces de resistir el efecto tóxico del óxido nítrico de forma más exitosa que otros. Claro ejemplo son las sub-poblaciones de células T CD4<sup>+</sup>, T-bet<sup>+</sup>/CD69<sup>+++</sup> y CD4<sup>+</sup>, T-bet<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, donde la primera ha demostrado una mayor supervivencia asociada con su capacidad de sintetizar y responder con mayor eficiencia a IL-2 (Pearl y col., 2012). La función de las células T efectoras que llegan al sitio de infección en el pulmón también puede verse comprometida por el microambiente de citocinas anti-inflamatorias, principalmente IL-10 y TGF- $\beta$ , creado por los macrófagos residentes a causa de la inmunomodulación directa de *M. tuberculosis*.

Otro factor que influye en la respuesta inmune en TB es el retraso en la activación de las células T vírgenes durante la infección. Este retraso es causado por varios factores, por una parte, está la inhibición de la apoptosis de los macrófagos y neutrófilos inducida por la micobacteria lo que a su vez influye en la capacidad de procesar y presentar antígeno de las células dendríticas; aunado a esto, se encuentra la presencia de células T reguladoras CD4+

Foxp3+ (O'Garra y col., 2013). Además, investigaciones han revelado que *M. tuberculosis* influye en la capacidad de presentar antígeno de las células dendríticas a través de ciertos mecanismos, primero, retardando su migración del pulmón hacia los ganglios linfáticos, con lo cual la disponibilidad de antígeno en dicho sitio anatómico se vuelve tardía, y disminuyendo la expresión de MHC-II en la superficie de las células dendríticas, haciendo ineficiente la presentación de antígenos a las células T (Jasenosky y col., 2015).

Si bien las células T CD4<sup>+</sup> son fundamentales en la inmunidad contra *M. tuberculosis*, otras poblaciones celulares también juegan un papel importante en la respuesta inmune contra la infección, entre estas se encuentran las células T CD8<sup>+</sup> restringidas al MHC-I. Cuando las células T CD8<sup>+</sup> son activadas por antígenos micobacterianos secretan IFN- $\gamma$ , aunque en menor proporción que las CD4<sup>+</sup>, y expresan granzimas, Fas-L, granzimas y perforina que los capacita para destruir a los macrófagos infectados (Canaday y col., 2001). En ciertos estudios, basados en el uso del modelo murino, se ha vislumbrado un papel para las células T CD8<sup>+</sup> en el control de la infección mediante la inhibición de la síntesis de  $\beta_2$ -microglobulina o el bloqueo de la acción de las CD8<sup>+</sup> usando de anticuerpos. Por otra parte, los linfocitos NK, pese a que tradicionalmente son clasificadas como células del sistema inmune innato, también participan en el control de la infección, de acuerdo a estudios en infantes vacunados con BCG donde se evaluó la secreción de moléculas líticas (perforinas y granzimas) en células CD56<sup>+</sup> (Abebe, 2012).

### **Macrófagos y su Papel en la Inmunidad Contra *M. tuberculosis***

Los macrófagos son un componente esencial de la inmunidad innata y participan en el proceso de inflamación y defensa del hospedero (Sica y col., 2012). Se desarrollan en la médula ósea a partir de precursores de granulocitos/monocitos.

Estas células precursoras también pueden dar origen a neutrófilos, células dendríticas, células de Langerhans y osteoclastos, dependiendo de la estimulación con distintos factores de crecimiento. El desarrollo de este precursor hacia monocitos ocurre por la estimulación con el factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF), el factor estimulante de colonia granulocito-macrófago (GM-CSF) e IL-13. Los monocitos abandonan la médula ósea, entran a la circulación sanguínea y, después de aproximadamente 1 día migran a los tejidos donde se diferencian a macrófagos (Brown, 2007). Los macrófagos residentes se encuentran presentes en los órganos de manera constitutiva y presentan diferencias fenotípicas y morfológicas según sea el órgano (hígado, bazo, intestino, pulmón y cerebro). En su superficie, así como en compartimientos vacuolares y citosólicos, expresan un conjunto de receptores opsónicos y no opsónicos. Además, secretan un amplio espectro de moléculas como enzimas proteolíticas, quimiocinas, citocinas anti-inflamatorias (IL-10 y TGF- $\beta$ ) y pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ). También poseen la facultad de producir metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno (Gordon y col., 2010).

### **Fenotipos Funcionales de Macrófagos**

De manera general, es aceptado que los macrófagos representan un conjunto de distintos fenotipos funcionales en lugar de subpoblaciones definidas y estables. Inclusive distintos estudios afirman que los macrófagos pueden reprogramarse y cambiar de un fenotipo funcional a otro en respuesta a los estímulos de su microambiente, recalcando la alta plasticidad y capacidad de adaptación de estas células (Mosser y col., 2008). Una forma clásica de clasificación basada en su fenotipo funcional, nos lleva a hablar de macrófagos con actividad inflamatoria y aquellos con un perfil anti-inflamatorio (Stout y col., 2004).

Durante la invasión por patógenos, presencia de daño en el tejido o exposición a irritantes, estos fagocitos adoptan un fenotipo inflamatorio (Murray y col., 2011). Estas células son comúnmente llamadas macrófagos M1, o clásicamente activadas, porque fue la primera población de estas células en ser formalmente definida y por originarse durante la respuesta inmune mediada por células (Th1). Su activación es inducida por IFN- $\gamma$  o por unión de ligandos a los TLRs, activando las vías de señalización del NF- $\kappa$ B y STAT1. Esto trae como consecuencia un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , lo que en conjunto se traduce en una mayor actividad antimicrobiana y antitumoral (Hanakawa, 2016).

Como previamente se mencionó, los macrófagos poseen una alta plasticidad y dan origen a distintos fenotipos funcionales según sea el estímulo con el que interaccionen. En el caso de macrófagos que son estimulados por IL-4, dan origen a los macrófagos M2 vía STAT6, también conocidos como macrófagos reparadores de tejidos o alternativamente activados. Estas células participan en la reparación y remodelación de tejido, si bien su participación en la inmunidad anti-bacteriana es controversial, se ha visto que juegan un papel importante en la inmunidad contra helmintos (Mosser y col., 2008).

### **Respuesta Inmune Contra *M. tuberculosis***

*M. tuberculosis* constituye un patógeno altamente inflamatorio, el cual propicia el reclutamiento de monocitos inflamatorios al espacio alveolar. Este reclutamiento de monocitos y su posterior diferenciación a macrófagos efectores representa un elemento clave en la protección contra patógenos intracelulares (Serbina y col., 2012).

Los macrófagos son fagocitos profesionales que expresan una serie de receptores fagocíticos, entre los que destacan los TLRs y los receptores de

manosa, los cuales son empleados por el macrófago para endocitar a *M. tuberculosis*. Una vez ocurrido esto, la micobacteria es secuestrada en un compartimiento formado por una membrana de lípidos llamado fagosoma. Eventualmente, el fagosoma se fusiona con los lisosomas para formar el fagolisosoma. En este compartimiento, se crean las condiciones necesarias para promover la destrucción de los patógenos, entre estas se encuentra la acidificación del fagolisosoma que favorece la acción de enzimas líticas, además de inhibir la proliferación bacteriana; también el ensamble del complejo NADPH oxidasa, con lo que se generan especies reactivas de oxígeno capaces de provocar daño oxidativo en los lípidos que forman la pared celular bacteriana (Brown, 2007); a este mecanismo se encuentra asociada la expresión de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) encargada de la síntesis de óxido nítrico en el espacio citosólico el cual, al difundir hacia el interior del fagolisosoma, reacciona con los radicales libres de oxígeno para formar especies reactivas derivadas del nitrógeno. El macrófago sintetiza enzimas que privan al patógeno de elementos necesarios para su crecimiento, tal como la lactoferrina que disminuye los niveles de hierro privando así a la bacteria de un co-factor esencial para la síntesis de material genético (Pavón, 2016).

Otro mecanismo de defensa de los macrófagos contra *M. tuberculosis* es la activación de la apoptosis o muerte celular programada. Al morir por apoptosis, el macrófago evita la diseminación de la micobacteria al atraparla dentro de cuerpos apoptóticos; lo que a su vez promueve una mejor presentación de antígenos micobacterianos a las células T por parte de las células dendríticas y el macrófago mismo. Con la presentación de antígeno se promueve la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de células T, citocina considerada fundamental en el control de la infección por *M. tuberculosis* al ser la encargada de desencadenar y potenciar los mecanismos bactericidas del macrófago (O'Garra y col., 2013).

Pese a las vastas estrategias con las que cuenta el macrófago para destruir a la micobacteria, *M. tuberculosis* tiene la facultad de evadirlas. Por ejemplo, es capaz de bloquear la formación del fagolisosoma al evitar la disminución del nivel de pH, secreta superóxido dismutasas que neutralizan las especies reactivas de oxígeno y expresa genes como SecA2 involucrados en la inducción de muerte del macrófago por necrosis y no por apoptosis. Estas y otras estrategias de evasión promueven que el sistema inmune no sea capaz de eliminar por completo la infección con lo que *M. tuberculosis* se convierte en un estímulo persistente, promoviendo la generación de un granuloma y la inducción de un estado de latencia en el hospedero.

### **Proteína PE\_PGRS33 de *M. tuberculosis***

En el largo proceso que conlleva el desarrollo de una vacuna en contra de un agente patógeno, uno de los primeros requisitos consiste en identificar las proteínas inmunogénicas del microorganismo. En el caso particular de *M. tuberculosis*, esta tarea se ha vuelto más asequible gracias a la secuenciación completa de su genoma.

Una vez secuenciado el genoma de *M. tuberculosis* se identificó que alrededor de 100 genes codifican para una familia de proteínas denominada PE (Dheenadhayalan y col., 2006). En general, todos los miembros de esta familia caracterizados por poseer un extremo N-terminal altamente conservado entre ellos. Dentro de la familia PE, a su vez se encuentra la subfamilia PE\_PGRS cuyos miembros se distinguen por poseer un extremo N-terminal altamente conservado de alrededor 110 aminoácidos, así como un dominio PGRS sumamente polimórfico que contiene en su estructura múltiples repeticiones de los aminoácidos glicina y alanina (Cascioferro y col., 2007; Meena, 2015). Esta familia consta de 63 miembros, entre los cuales algunos han sido estudiados en

busca de sus propiedades inmunogénicas. En este contexto, la proteína PE\_PGRS33 es hasta el momento uno de los más estudiados.

La proteína PE\_PGRS33 (figura 3) es codificada por el gen Rv1818c y consta de 499 aminoácidos; está compuesta de un 41% de glicina y 20% de alanina (Vallecillo y Espitia, 2009). Su dominio PE se encuentra anclado a la pared celular micobacteriana y el dominio PGRS se ubica en el medio extracelular (Zumbo y col., 2013).

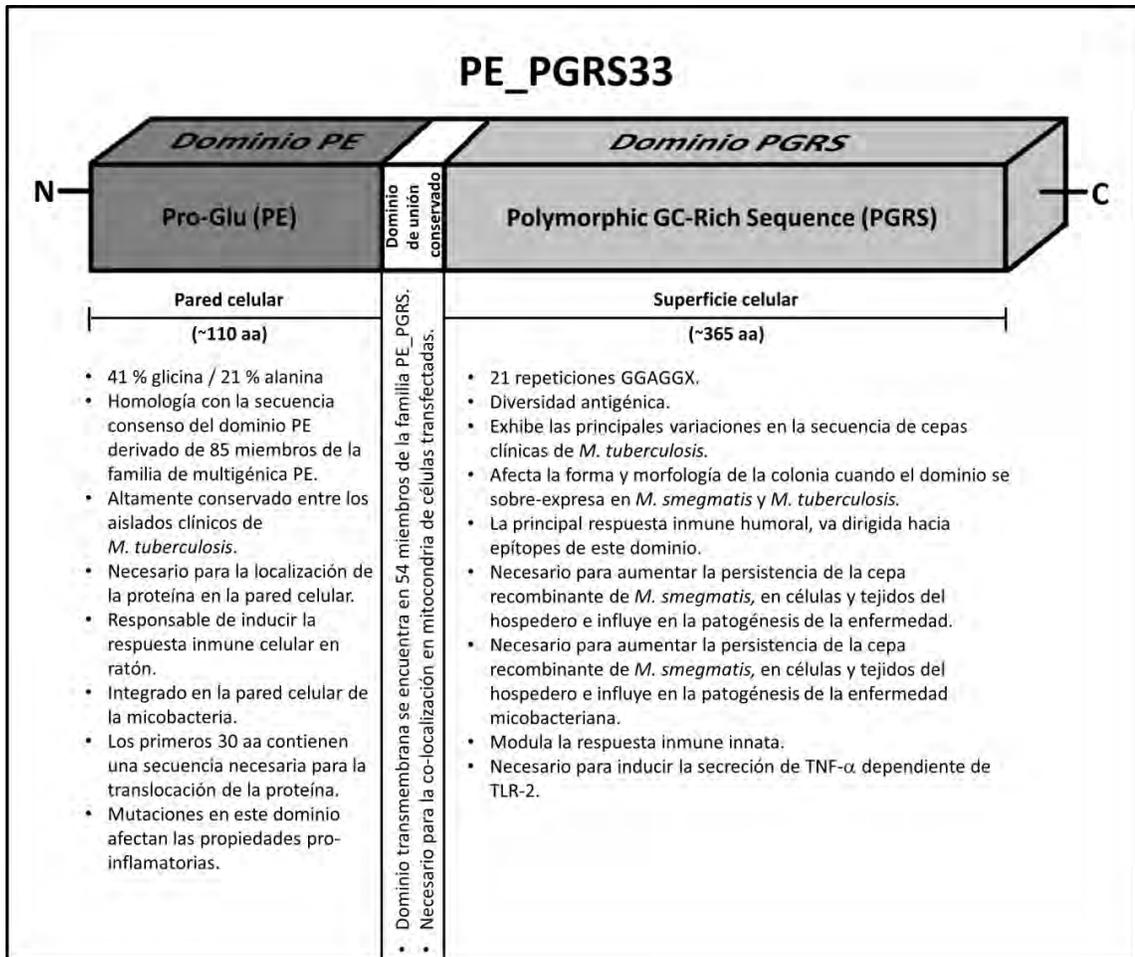
Con el esfuerzo de diversos estudios se han podido conocer algunas de las propiedades inmunogénicas de esta proteína (figura 4). Con el trabajo de Delogu y colaboradores en 2001, se obtuvieron las primeras evidencias de que la PE\_PGRS33 era capaz de despertar una respuesta inmune en un modelo murino. Además, se tiene conocimiento que tal respuesta inmune es de tipo celular para el dominio PE y de tipo humoral para el dominio PGRS (Espitia y col., 2014).



PE\_PGRS (*M. tuberculosis* Rv1818c)

MSFVVVTIPEALAAVATDLAIGIGSTIGTANAAAAPVPTTVLAAAADDEVSAAM  
 AALFSGHAQAYQALSAQAALFHEQFVRALTAGAGSYAAAAEAASAAPLEGVL  
 DVINAPALALLGRPLIGNGANGAPGTGANGGDGGILIGNGGAGGSGAAGMP  
 GGNGGAAGLFGNGGAGGAGGNVASGTAGFGGAGGAGGLLYGAGGAGGAGGR  
 AGGGVGGIGGAGGAGGNGGLLFGAGGAGGVGGLAADAGDGGAGGDGGLFFG  
 VGGAGGAGGTGTNVTGGAGGAGGNGGLLFGAGGVGGVGGDGVAFLGTAPGG  
 PGGAGGAGGLFGVGGAGGAGGIGLVGNGGAGGSGGSALLWGDGGAGGAGGV  
 GSTTGGAGGAGGNAGLLVGAGGAGGAGALGGGATGVGGAGGNGGTAGLLFG  
 AGGAGGFGFGGAGGAGGLGGKAGLIGDGGDGGAGGNGTGAKGGDGGAGGGA  
 ILVGNNGNNGNAGSGTPNGSAGTGGAGGQLLGKNGMNGLP

**Figura 3.** Secuencia de aminoácidos de la proteína PE\_PGRS33.  
 (Delogu y col., 2002).



**Figura 4.** Características y funciones de la proteína PE\_PGRS33 de *M. tuberculosis* (Gastélum y col., 2015).

Otras propiedades inmunogénicas asociadas a esta proteína son su capacidad de unirse al TLR-2 en macrófagos, trayendo como consecuencia la secreción de TNF $\alpha$  así como la muerte por apoptosis de estas células, muerte también inducida cuando la proteína interactúa con la mitocondria de células infectadas (Basu y col., 2007; Cadieux y col., 2011; Zumbo y col., 2013). Por otro lado, en un modelo *in vitro* de infección de macrófagos con cepas recombinantes de *M. smegmatis* en el que se comparó la respuesta inmune de tres miembros de la subfamilia PE\_PGRS, se demostró la capacidad inmunomoduladora de PE\_PGRS33, ya que al evaluar la secreción de citocinas de los macrófagos infectados con las distintas cepas recombinantes, se detectó un aumento en los niveles de IL-12 y especies reactivas del nitrógeno y una disminución en la secreción de IL-10 (Sigh y col., 2008).

Por su parte, en el 2007, Talarico y colaboradores analizaron la variabilidad en la secuencia de aminoácidos de la proteína PE\_PGRS33 en más de 600 aislados clínicos de *M. tuberculosis* y su influencia en la función de esta proteína. En su estudio encontraron que el tipo de mutación varió según la cepa clínica y en algunos casos en donde se presentaron ciertas deleciones en la secuencia de aminoácidos *M. tuberculosis* perdió su capacidad de persistir dentro del granuloma tuberculoso y no se presentó la formación de cavitaciones en el pulmón de los sujetos infectados.

Todo lo anterior nos sugiere algunas propiedades inmunogénicas de PE\_PGRS33 así como que puede ser un candidato para el desarrollo de una nueva vacuna en contra de la TB. Sin embargo, una vez detectadas las propiedades inmunógenas de un antígeno, se vuelve necesario identificar aquellos péptidos inmunodominantes que garanticen que el antígeno sea presentado al sistema inmune del individuo. En el caso de PE\_PGRS33, estos péptidos podrían derivarse de su dominio PE, ya que *M. tuberculosis* ha conservado epítopes que son reconocidos por las células T donde la mayoría

de ellos están confinados precisamente al dominio PE (Copin y col., 2014; Gastelum-Aviña y col., 2015).

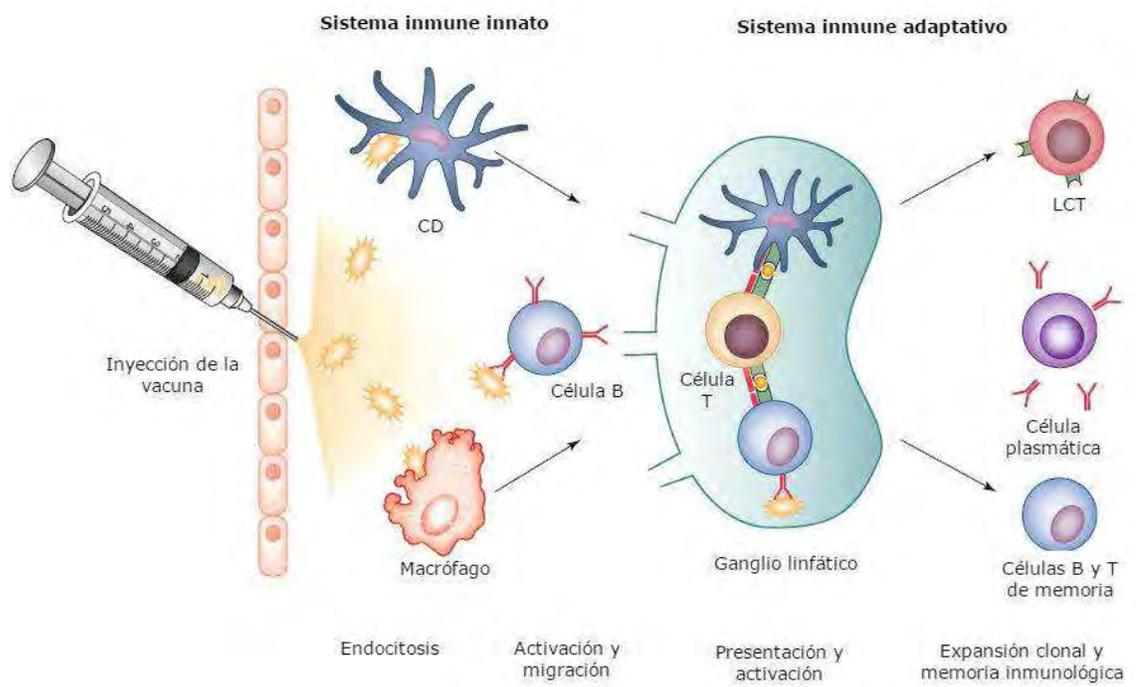
Finalmente, es necesario evaluar si los péptidos identificados como inmunodominantes tienen un efecto protector a través de distintas metodologías tanto *in vitro* como *in vivo*. Una vez realizado esto, se podría determinar si el antígeno puede servir como un posible candidato para el desarrollo de una nueva vacuna en contra de la tuberculosis.

### **Principios Inmunológicos Aplicados al Diseño de Nuevas Vacunas**

Desde su aparición, la vacunación ha sido una de las estrategias más eficaces para combatir enfermedades infecciosas salvando miles de vidas (Crommelin, 2013). Para su elaboración, se emplean distintas metodologías, desde las llamadas clásicas como la atenuación del microorganismo mediante cultivo en medios sintéticos o agentes químicos hasta las modernas, basadas en la tecnología del ADN recombinante.

Sin importar el enfoque metodológico empleado para crear una vacuna, su objetivo final es el de imitar la infección causada por un patógeno con el consecuente establecimiento de una respuesta inmune adaptativa y la generación de memoria inmunológica. Esto pasa sin que el hospedero desarrolle la enfermedad como sería al presentarse una infección natural.

La generación de una respuesta inmune hacia un patógeno inducida por vacunación abarca determinados pasos (figura 5).



**Figura 5.** Esquema general de los eventos desarrollados después de la inmunización inducida por vacunas (Crommelin, 2013).

Estos son la internalización de los antígenos de la vacuna por las células fagocíticas, la posterior activación y migración de células profesionales presentadoras de antígeno (CPAs) hacia los órganos linfoides secundarios para activar a las células T y B antígeno-específicas.

Cada vez que un microorganismo infecta a un individuo se activa el sistema inmune innato, ya que este constituye la primera línea de defensa del organismo. Lo mismo sucede tras la vacunación, en el caso de este proceso, PRRs juegan un papel fundamental en el balance Th1/Th2. Los PRRs reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), estructuras conservadas en los microorganismos que son reconocidas por el sistema inmune (Mahboud, 2013). Es así como los patógenos pueden modular el tipo de respuesta inmune adaptativa creada contra ellos, pues según los PRRs activados, es el tipo de citocinas secretadas por las células participantes de la inmunidad innata y las señales co-estimuladoras generadas por las CPAs. Este microambiente de citocinas ejerce influencia sobre el fenotipo efector al cual diferencian las células T vírgenes cuando las CPAs les presentan su antígeno específico.

Tomando en consideración lo anterior, se debe tener en cuenta la forma en que la vacuna es formulada. Por ejemplo, en vacunas que necesitan adyuvantes, estos deben de activar los PRRs necesarios para inducir el microambiente de citocinas adecuado, con el cual se genere una respuesta inmune adquirida capaz de combatir al patógeno eficazmente. En el caso de vacunas con contenido de lipoproteínas o peptidoglicanos, estas activarán a las células dendríticas (CDs) vía TLR2, propiciando el predominio de una respuesta Th2; en cambio, aquellas que contengan lípido A o sus derivados, activarán las CDs vía TLR4, promoviendo una respuesta Th1 (Pashine y col., 2005).

Otro aspecto a considerar para lograr el desarrollo de una vacuna efectiva, es la ruta de administración. La mayoría de las vacunas hoy en día son

aplicadas de manera intramuscular o subcutáneamente. No obstante, la ruta ideal de administración es aquella en la que el patógeno invade de manera natural al individuo.

Hasta ahora se ha hablado de la importancia de activar el sistema inmune innato a través de la vacunación y su influencia en la respuesta adaptativa resultante, así como de la selección de la ruta de administración más adecuada. Sin embargo, otro aspecto importante es el sistema de entrega de la vacuna. Para esto, se usará como ejemplo las vacunas a base de proteínas recombinantes (péptidos), siendo esta una de las tendencias más utilizadas en la actualidad.

Una vez identificados aquellos epítopes inmunodominantes con capacidad protectora, se procede a elegir el sistema de entrega para la vacuna. En las preparaciones a base de péptidos (pudiendo ser de células T o B), estos sistemas pueden ser el administrar al antígeno utilizando vectores, tal como los virus. Éste consiste en sustituir uno o más genes del organismo vector por el o los genes del patógeno que inducen la protección, esto conlleva la ventaja de promover una liberación eficiente y prolongada de los antígenos del patógeno por las propias células del hospedero. La principal desventaja de esta metodología es la inmunidad preexistente del hospedero hacia el propio vector, lo cual podría neutralizar la vacuna antes de estimular al sistema inmune (Nayak y col., 2010).

Por otro lado, se encuentra la tecnología de las vacunas de ADN. Uno de sus enfoques consiste en clonar en un plásmido bacteriano la secuencia de nucleótidos del antígeno, con su eventual expresión por las células del individuo y presentación al sistema inmune. Las ventajas son la inducción de una fuerte respuesta de células T citotóxicas, así como la activación de la inmunidad innata a través del reconocimiento del ADN no metilado proveniente del plásmido bacteriano por el TLR9. Sin embargo, algunos estudios han mostrado

una baja inmunogenicidad en humanos, además del riesgo de la inserción del material genético de la vacuna en el genoma del hospedero (Crommelin, 2013).

En resumen, es importante tener en consideración lo citado anteriormente para el diseño óptimo de una vacuna, sin olvidar el requisito fundamental para la creación de cualquier vacuna eficiente: el conocimiento de las interacciones patógeno-sistema inmune.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivo y Mantenimiento de Líneas Celulares**

En el presente proyecto se realizaron cultivos de las líneas celulares 3A9 (hibridoma de células T específico contra HEL), M12.C3.F6 (linfoma murino de células B) e hibridomas de células T específicos contra la proteína PE\_PGRS33. Todos los cultivos se mantuvieron en medio DMEM (Sigma-Aldrich, No. Cat. D5648) suplementado al 10% con suero fetal bovino (Gibco, No. Cat. 16000-044) inactivado por calentamiento, en una atmósfera húmeda, al 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. De manera conjunta, se cultivó la línea celular de macrófagos RAW 264.7 en medio DMEM (Sigma-Aldrich, No. Cat. D5648) suplementado al 10% con suero fetal bovino (Microlab, No. Cat. SU-440) inactivado por calentamiento, en una atmósfera de humedad, al 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.

### **Generación y Caracterización de Factores de Activación en un Sistema de Procesamiento y Presentación de PE\_PGRS33 *in vitro***

Para obtener los factores de activación (citocinas) en respuesta al estímulo de células T por la proteína PE\_PGRS33, se estableció un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*. Este sistema consistió en cultivar 50 000 células M12.C3.F6 (célula presentadora de antígeno) en conjunto con 100 000 hibridomas de células T por pozo en placas de 96 pozos (Gastélum, 2010). Como control positivo, se utilizó el hibridoma 3A9 específico contra la lisozima de huevo de gallina (HEL). Los hibridomas de células T específicos contra la proteína PE\_PGRS33 fueron generados en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Gastélum, 2008).

Una vez colocadas las células en la placa de 96 pozos, se procedió a adicionar la proteína PE\_PGRS33 y HEL, ambos a una concentración final de 1

$\mu\text{M}$ . Las células se dejaron en cultivo por 20 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y atmósfera de 95% de humedad. Pasado este tiempo, se procedió a retirar el sobrenadante para evaluar el efecto de las citocinas secretadas sobre los macrófagos RAW 264.7.

Para corroborar la activación de los hibridomas de células T se detectó la secreción de IL-2 por citometría de flujo, empleando un kit de la casa comercial Miltenyi Biotec (Anexo 10).

Por último, se realizó la caracterización de las citocinas presentes en el sobrenadante del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33 por citometría de flujo. Para esto, se utilizó el kit Legendplex (Biolegend, No. Cat. 740118) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante.

#### **Evaluación de la Expresión de MHC-II (I-A<sup>k</sup>) en Células RAW 264.7 Estimuladas con los Factores de Activación del Sistema de Procesamiento y Presentación de PE\_PGRS33**

Con el objetivo de verificar la inducción de expresión de MHC-II en los macrófagos RAW 264.7, se procedió a cultivar 100 000 células por pozo durante 4 horas para permitir su adherencia en placas de 96 pozos. Enseguida, se les adicionó el sobrenadante producido con el sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33 y se cultivaron por 24 horas más. Como control positivo, unos pozos se estimularon con 40 ng/mL de PMA.

Después, las células fueron cosechadas, transferidas a tubos de FACS y centrifugadas a 433 g por 5 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , para descartar el sobrenadante. El botón celular obtenido se fijó por 20 minutos con 200  $\mu\text{L}$  de solución fijadora (Biolegend, No. Cat. 420801) y se centrifugaron nuevamente. Posteriormente, se adicionó 500  $\mu\text{L}$  de solución de permeabilización (Biolegend, No. Cat. 421002) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, se centrifugó, se descartó la solución y el botón celular se tiñó con un anticuerpo

monoclonal anti-IA<sup>k</sup> acoplado a FITC (Becton and Dickinson, No. Cat. 553540), por 30 minutos en oscuridad (Hernández y col., 2010). Finalmente, las células se lavaron con 4 mL de PBS, se fijaron con 200  $\mu$ L de p- formaldehído al 1% y 200  $\mu$ L de PBS. Se adquirieron 10 000 eventos en un citómetro de flujo FACS CANTO II.

#### **Generación de Especies Reactivas de Oxígeno en Células RAW 264.7 Estimuladas con los Factores de Activación del Sistema de Procesamiento y Presentación de PE\_PGRS33**

Para este ensayo se cultivaron 250 000 células RAW 264.7 por pozo durante 24 horas en placas de 48 pozos. Luego se adicionó el sobrenadante en combinación con el reactivo NBT (Sigma-Aldrich, No. Cat. N6876) a una concentración final de 1 mg/mL y se incubaron por 45 minutos. Las células se lavaron dos veces con 1 mL de PBS, se les adicionó 100  $\mu$ L de metanol absoluto y se dejó secar al aire. Para finalizar, se agregó una mezcla compuesta de 140  $\mu$ L de DMSO y 120  $\mu$ L de KOH 2M para disolver los cristales de formazán resultantes de la reducción del NBT. El contenido del pozo se transfirió a una placa de 96 pozos para tomar la lectura de densidad óptica a 630 nm.

Como control positivo se utilizó PMA a una concentración final de 1  $\mu$ g/mL y como control negativo DPI a concentración de 40  $\mu$ M en conjunto con 1  $\mu$ g/mL de PMA (Choi y col., 2006; Vera-Jiménez y col., 2013).

**Cuantificación de la Secreción de IL-12 y TNF- $\alpha$  por Células RAW 264.7  
Estimulados con los Factores de Activación del Sistema de  
Procesamiento y Presentación de PE\_PGRS33**

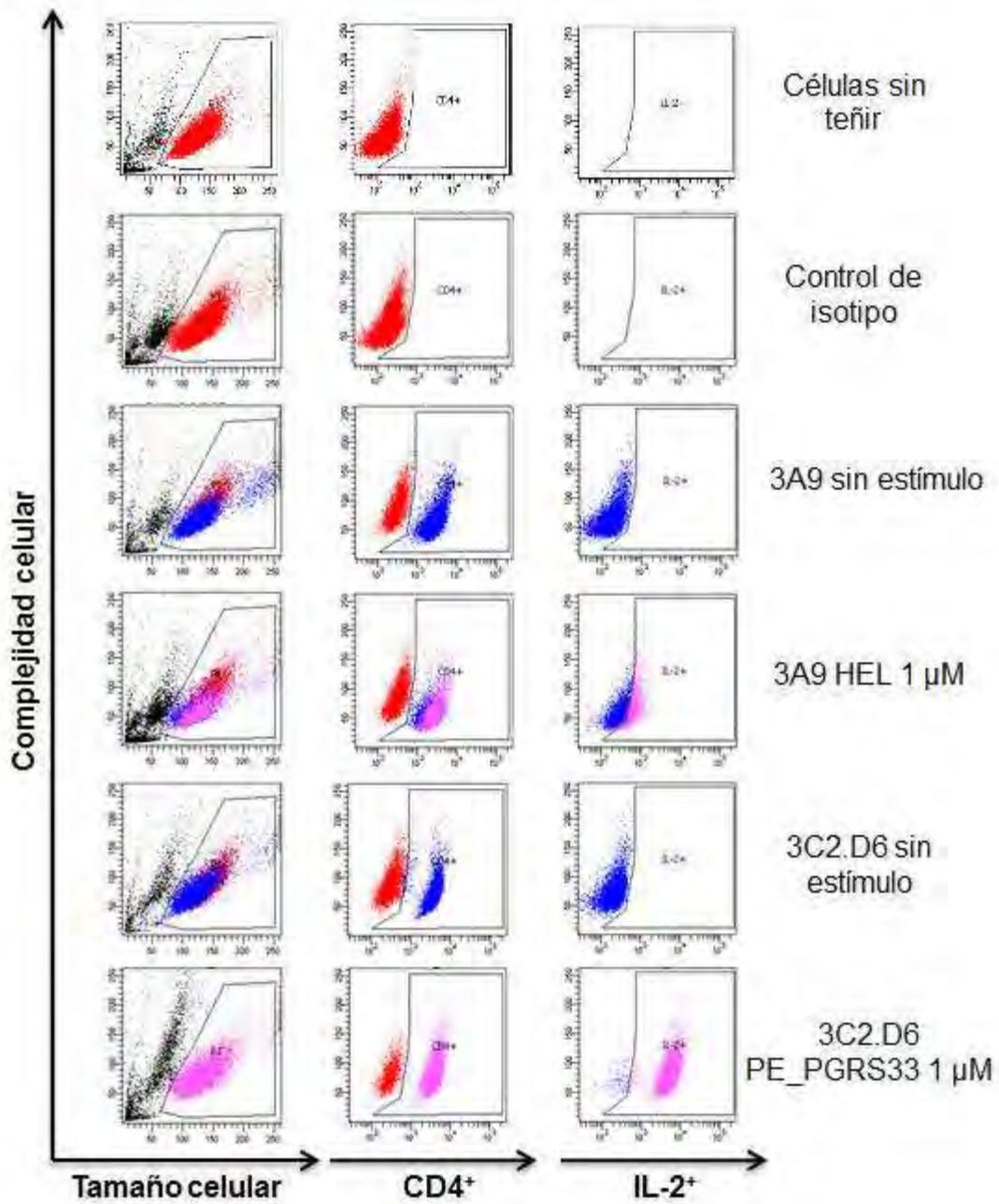
La cuantificación de TNF- $\alpha$  e IL-12 se realizó mediante la técnica de ELISA siguiendo las instrucciones del protocolo para realizar un inmuno ensayo de ligandos específicos en sándwich de la casa comercial Biolegend ([http://www.biolegend.com/media\\_assets/support\\_protocol/BioLegend\\_Sandwich\\_ELISA\\_protocol\\_012715.pdf](http://www.biolegend.com/media_assets/support_protocol/BioLegend_Sandwich_ELISA_protocol_012715.pdf)). Brevemente, se estableció un cultivo de macrófagos RAW 264.7 en placa de 96 pozos, el cual constó de 100 000 células por pozo a las que se les permitió adherirse por 4 horas. Acto seguido, se adicionó el sobrenadante preparado con el sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33 y se cultivó por 24 horas más. Como control positivo, las células se estimularon con LPS a una concentración de 1  $\mu$ g/mL. Finalmente, se recuperó el sobrenadante del cultivo de macrófagos y se sometió a la técnica de ELISA descrita previamente.

De manera adicional, también se analizó el perfil de citocinas de los macrófagos RAW 264.7 utilizando el kit Legendplex previamente mencionado.

## RESULTADOS

### **Generación y Caracterización de Factores de Activación Inducidos por la Proteína PE\_PGRS33 en un Sistema de Procesamiento y Presentación de antígeno *in vitro***

Las citocinas ejercen un papel fundamental en el orquestado de la respuesta inmune (RI) hacia los agentes infecciosos, no siendo la excepción *M. tuberculosis*. Una vez reconocidos los antígenos de la micobacteria por el sistema inmune, se generarán citocinas que van a dirigir la respuesta de los distintos componentes celulares de la RI contra el bacilo de la tuberculosis. Dentro de las principales poblaciones celulares que participan en el control de la infección están los macrófagos, cuyas funciones inmunes se regulan por el efecto de citocinas secretadas de forma antígeno-específica. Por ende, el primer objetivo de esta investigación fue generar citocinas (factores de activación) producto del reconocimiento de la proteína PE\_PGRS33 en un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*, utilizando hibridomas de células T específicos contra esta proteína. Como puede apreciarse en el análisis de citometría de flujo presentado (figura 6), una vez que se realizó el cultivo del hibridoma de células T 3C2.D6 con la proteína PE\_PGRS33, se evaluó la secreción de IL-2 por parte del hibridoma como una señal de su activación antígeno-específica.

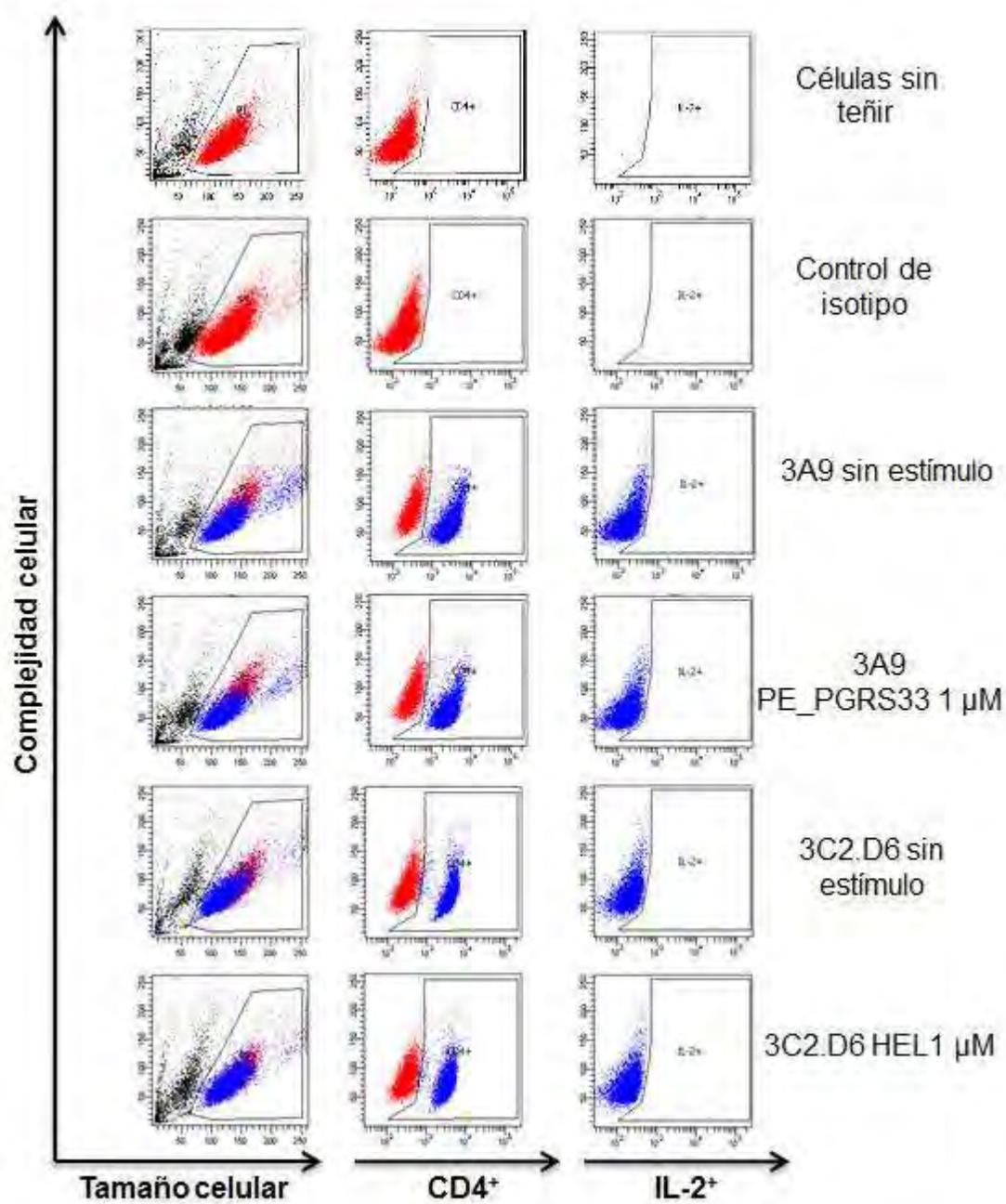


**Figura 6.** Evaluación de la secreción de IL-2 del hibridoma 3C2.D6 por citometría de flujo.

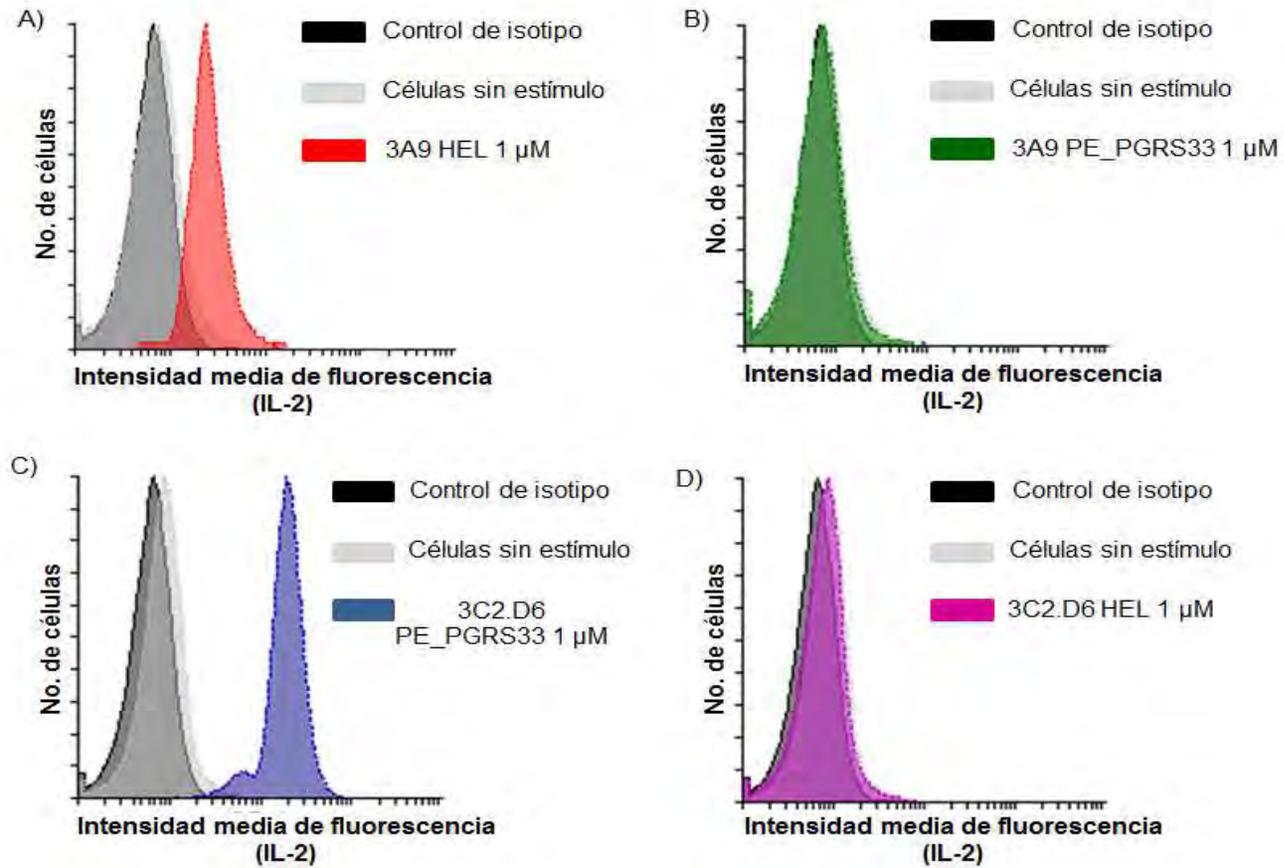
Para realizar el análisis primero se utilizó el marcador CD4 para separar, de manera virtual, la población de hibridomas de células T de la población de la célula presentadora de antígeno. Una vez separadas, se determinó la población de hibridomas que era positiva a IL-2, donde pudimos visualizar que tanto el hibridoma específico contra la proteína PE\_PGRS33 como el hibridoma control (3A9) se activaron y secretaron IL-2 en respuesta a sus respectivos antígenos.

Adicionalmente, para demostrar que la secreción de IL-2 fue antígeno-específica, el hibridoma de células T 3C2.D6 se estimuló con un antígeno irrelevante (HEL) y la respuesta se analizó por citometría de flujo como se describió previamente. En la figura 7 se puede observar que no hubo respuesta de IL-2 al estimular el hibridoma 3C2.D6 con HEL, por lo que la activación del hibridoma con la proteína PE\_PGRS33 fue antígeno-específica.

En la figura 8 se resume, a través del uso de histogramas, la activación del hibridoma 3C2.D6 y su consecuente secreción de IL-2. Esta puede apreciarse por el desplazamiento de la intensidad media de fluorescencia, cuando el hibridoma no recibió estímulo y al adicionarle el antígeno.

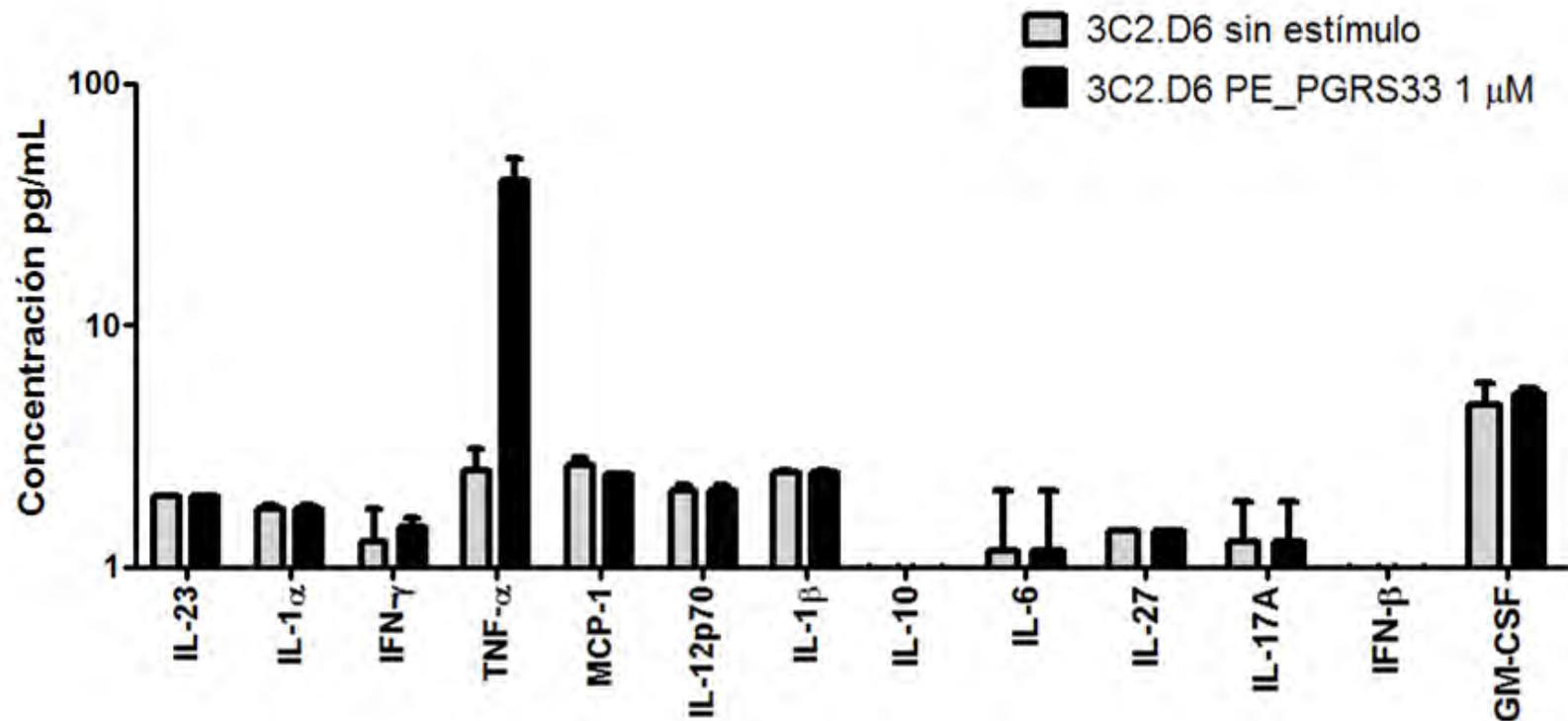


**Figura 7.** Activación antígeno-específica del hibridoma 3C2.D6 específico contra la proteína PE\_PGRS33.



**Figura 8.** Activación de hibridoma 3C2.D6 específico contra la proteína PE\_PGRS33. A- B). Hibridoma control 3A9. C-D) Hibridoma 3C2.D6.

Posteriormente, se caracterizaron las citocinas secretadas por el hibridoma 3C2.D6 en el sobrenadante en respuesta a la proteína PE\_PGRS33, a través de un análisis múltiple de citocinas por citometría de flujo. Esta técnica permitió la detección simultánea de 13 citocinas en el sobrenadante. El análisis mostró que el hibridoma 3C2.D6 secretó TNF- $\alpha$  (figura 9), aunado a la IL-2 previamente detectada.

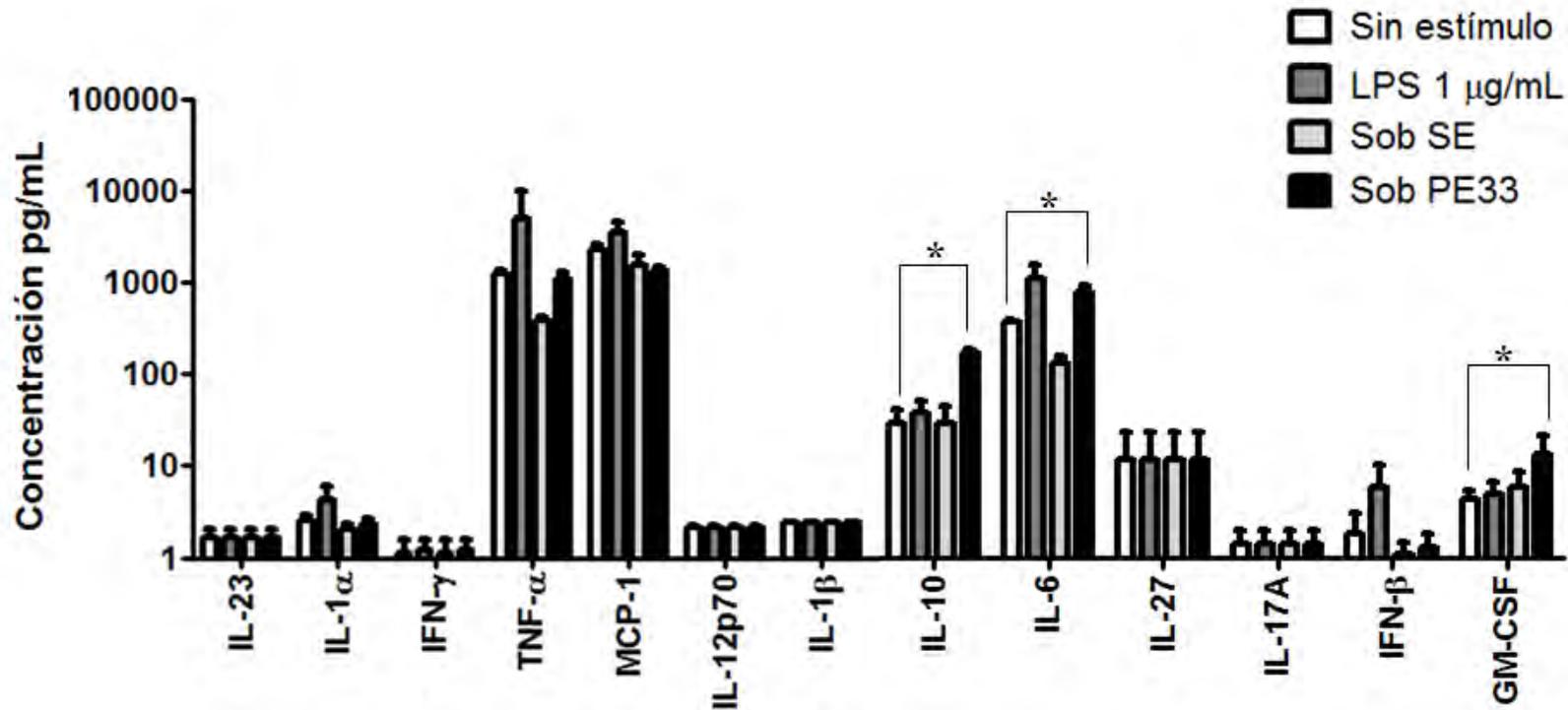


**Figura 9.** Análisis de la secreción de citocinas por el hibridoma 3C2.D6. El hibridoma 3C2.D6, específico contra la proteína PE\_PGRS33, se estimuló por 20 horas con su antígeno específico. Posteriormente, se analizó la secreción de citocinas en el sobrenadante del cultivo en respuesta al antígeno. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las respectivas condiciones.

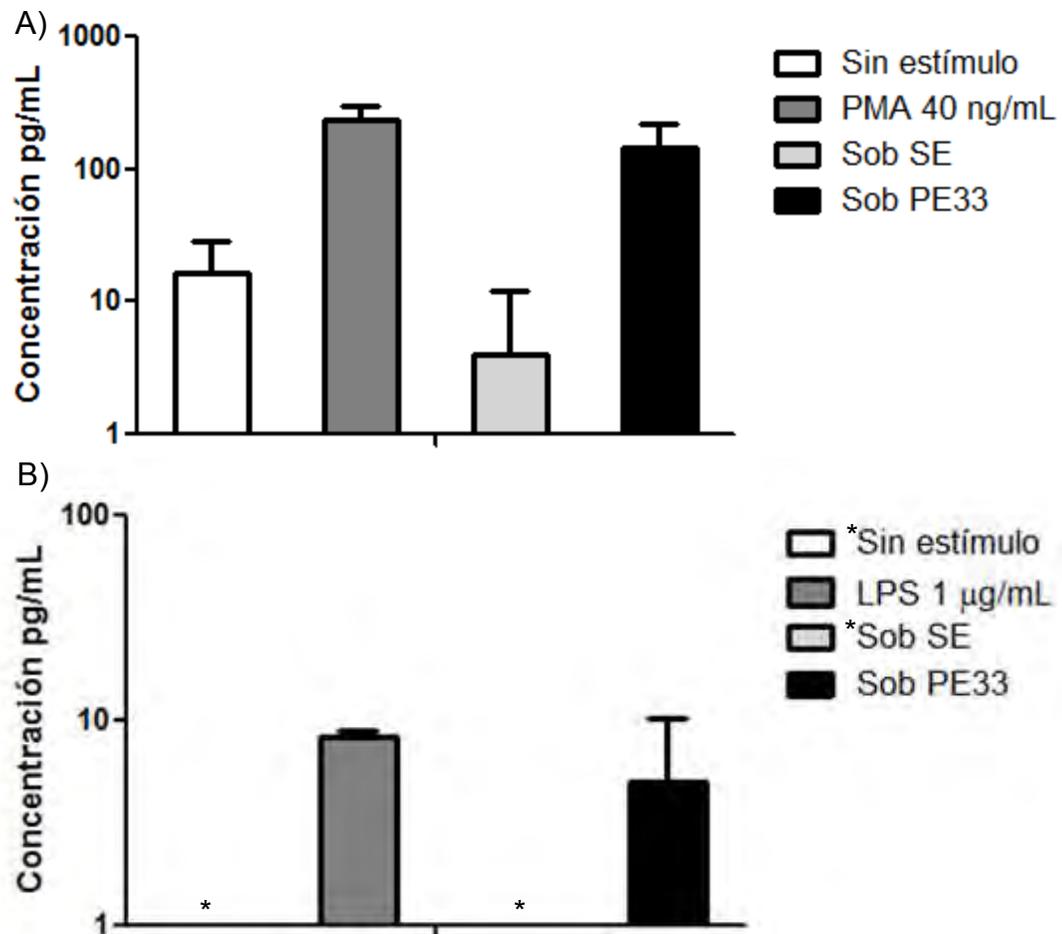
## **Evaluación de la Activación de Células RAW 264.7 Mediante la Detección de Citocinas**

Las células, al ser estimuladas con agentes capaces de promover su activación, adquieren la capacidad de sintetizar y secretar moléculas. Las citocinas son un ejemplo de tales moléculas; por lo tanto, se determinó la capacidad de los macrófagos RAW 264.7 de secretar citocinas al ser estimulados con el sobrenadante del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33. Este objetivo se cumplió realizando el mismo análisis múltiple de citocinas aplicado al sobrenadante del hibridoma 3C2.D6. Además, se realizó un ensayo de ELISA para detectar TNF- $\alpha$ . El análisis de citocinas por citometría de flujo reveló que los macrófagos estimulados con el sobrenadante secretaron IL-6, IL-10, GM-CSF, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los macrófagos estimulados con el sobrenadante y aquellos en estado basal. (figura 10).

Asimismo, el ensayo de ELISA mostró secreción de TNF- $\alpha$  e IL-12 por parte de los macrófagos estimulados con los factores de activación del hibridoma 3C2.D6 (figura 11). No obstante, no fue posible apreciar diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 10.** Secreción de citocinas por macrófagos RAW 264.7 estimulados con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33. Sin estímulo, células RAW 264.7 en estado basal. LPS, lipopolisacárido. Sob SE, células RAW 264.7 estimuladas con sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 sin antígeno. SOB PE33, células RAW 264.7 estimuladas con sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 con PE\_PGRS33. \*Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) mediante el uso de la prueba U de Mann-Whitney.

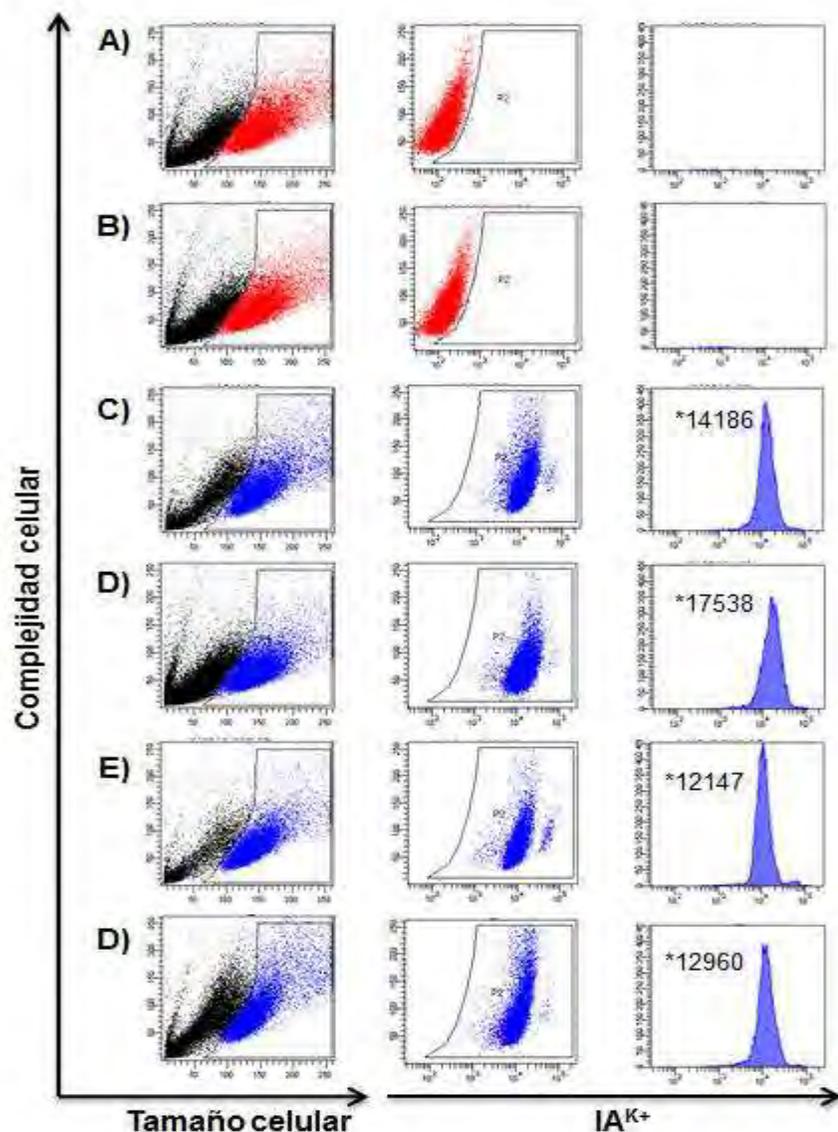


**Figura 11.** Secreción de TNF- $\alpha$  e IL-12 por macrófagos RAW 264.7 estimulados con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33. Los macrófagos RAW 264.7 se estimularon por 24 horas con el sobrenadante del sistema de presentación de PE\_PGRS33. Eventualmente, se analizó el sobrenadante del cultivo de los macrófagos con el objetivo de detectar la secreción de (A) TNF- $\alpha$  y (B) IL-12. Sin estímulo, células RAW 264.7 en estado basal. PMA, forbol miristato acetato. LPS, lipopolisacárido. Sob SE, células RAW 264.7 estimuladas con sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 sin antígeno. Sob PE33, células RAW estimuladas con sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 con PE\_PGRS33.\*Niveles de citocinas debajo del límite de detección.

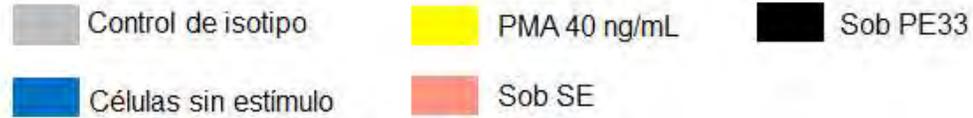
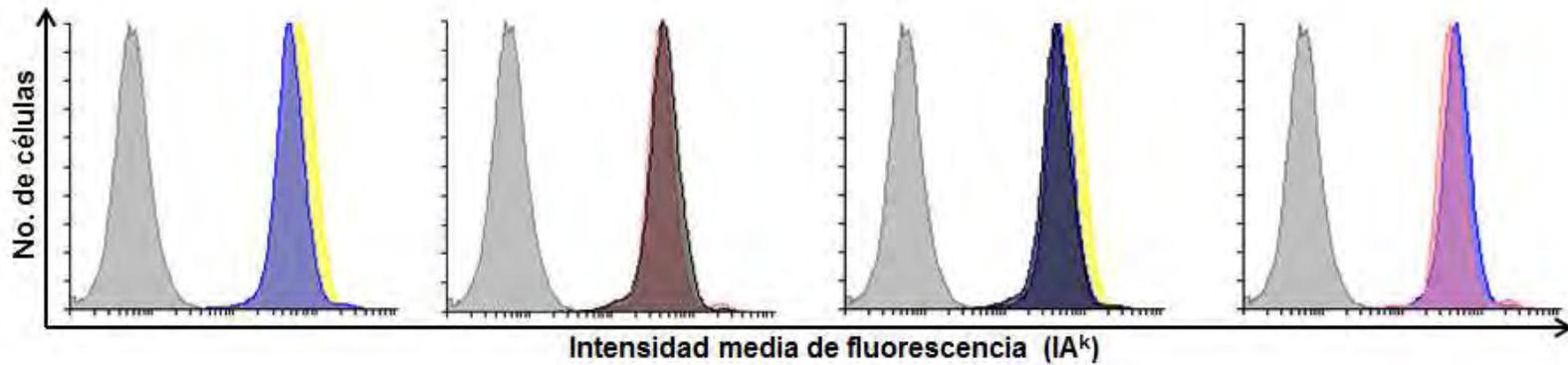
### **Inducción de la Expresión de MHC-II (I-A<sup>k</sup>) en células RAW 264.7**

Las moléculas del MHC de clase I y II constituyen una parte vital para el reconocimiento de antígenos por parte del sistema inmune, estando regulada su expresión por la acción de determinadas citocinas. Como respuesta al estímulo de las citocinas, las CPA pueden aumentar o disminuir la síntesis y expresión de MHC en su superficie.

Basado en lo anterior, se planteó el objetivo de analizar la activación de los macrófagos RAW 264.7 estimulados con los sobrenadantes del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33, mediante la evaluación de la expresión de MHC clase II en estas células. En la figura 12 se muestra el resultado obtenido al estimular a los macrófagos con el sobrenadante del ensayo de presentación de PE\_PGRS33, donde es posible apreciar que las citocinas presentes en el sobrenadante no lograron inducir un aumento en la expresión de moléculas MHC-II (I-A<sup>k</sup>) en las células RAW, ya que no hay un aumento en la intensidad media de fluorescencia de las células estimuladas con el sobrenadante respecto a las que no fueron estimuladas. De manera conjunta, en la figura 13 se muestra una comparación entre los desplazamientos de los histogramas que representan las intensidades medias de fluorescencia de cada una de las condiciones evaluadas.



**Figura 12.** Expresión de MHC-II (I-A<sup>k</sup>) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33. A) Células sin teñir. B) Control de isotipo. C) Células sin estimular. D) Células con PMA (40 ng/mL). E) Células estimuladas con sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 sin PE\_PGRS33. D) Células estimulas con sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 con PE\_PGRS33. \*Intensidad media de fluorescencia.



42

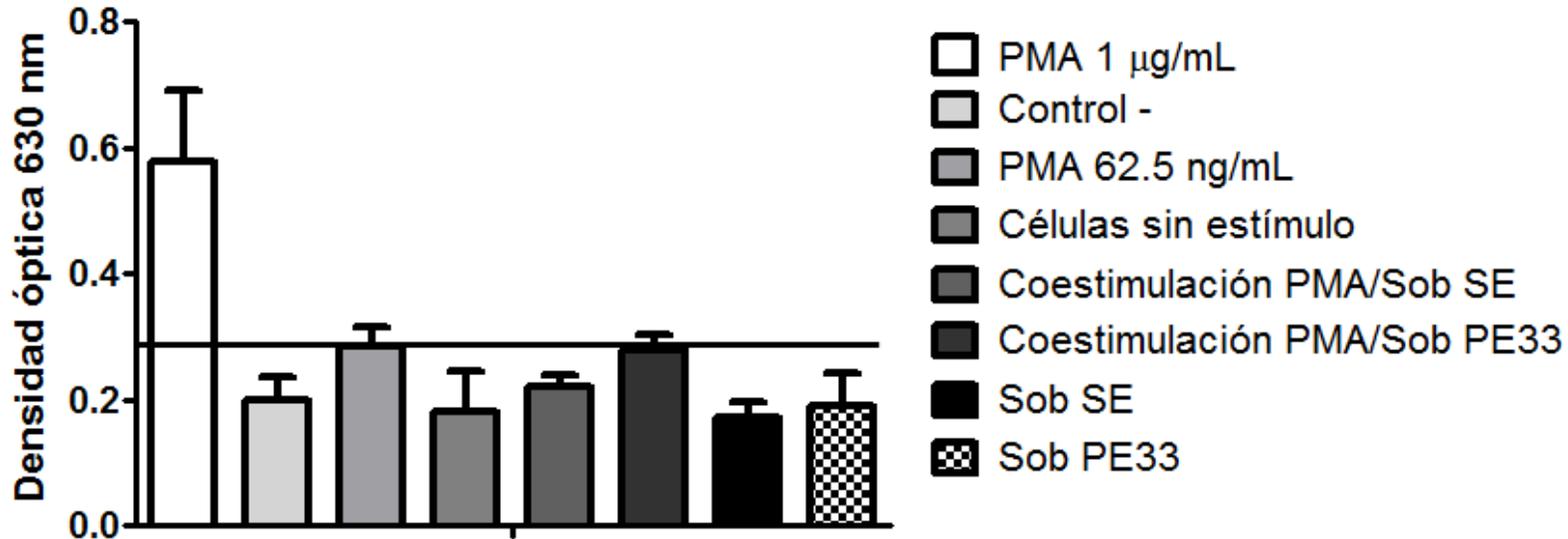
**Figura 13.** Intensidad media de fluorescencia ( $I-A^k$ ) asociada a la expresión de MHC-II en células RAW 264.7 estimuladas con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33. PMA, forbol miristato acetato. Sob SE, células RAW 264.7 estimuladas con sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 sin antígeno. Sob PE33, células RAW 264.7 estimuladas con sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 con PE\_PGRS33.

### **Inducción de Estallido Respiratorio en Células RAW 264.7**

La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) constituye un importante mecanismo de defensa en contra de agentes microbianos, promoviendo la fagocitosis y consecuente destrucción de agentes infecciosos.

Por lo tanto, se propuso el objetivo de evaluar la capacidad de los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33, de inducir el proceso de estallido respiratorio en macrófagos RAW 264.7 estimulados con estos factores.

Para cumplir con este objetivo, se utilizó la metodología basada en la reducción del NBT. Los resultados (figura 14) muestran que el sobrenadante del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33 no fue capaz de inducir la producción de ERO en los macrófagos. Esto se manifiesta al visualizar como la señal de densidad óptica de las células expuestas al sobrenadante no sobrepasa el punto de corte establecido (figura 14).



**Figura 14.** Inducción de estallido respiratorio en células RAW 264.7 estimuladas con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33. Macrófagos RAW 264.7 fueron puestos en contacto con los factores de activación por 45 minutos; adicionalmente, se utilizó una concentración subóptima de PMA de 62.5 ng/mL para realizar una coestimulación con los sobrenadantes. PMA, forbol miristato acetato; Sob SE, sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 sin su antígeno específico; Sob PE33, sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 estimulado con la proteína PE\_PGRS33.

## DISCUSIÓN

Uno de los objetivos de la presente investigación fue generar y caracterizar factores de activación (citocinas) en un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*, utilizando como antígeno a la proteína PE\_PGRS33 de *M. tuberculosis*. Para cumplir este objetivo, se utilizaron hibridomas de células T específicos contra la PE\_PGRS33. De entre un conjunto de hibridomas específicos contra esta proteína, se eligió como modelo la clona 3C2.D6. Como previamente se dijo, en primer lugar se evaluó la reactividad de la clona 3C2.D6 hacia su antígeno específico a través de la detección de IL-2, obteniendo un resultado positivo lo cual nos habla acerca de la capacidad del hibridoma de reconocer los péptidos de la proteína PE\_PGRS33 presentados mediante los complejos péptido-MHC. Esto puede compararse con trabajos de nuestro grupo de investigación (Gastélum-Aviña y col., 2016) donde se determinó la reactividad de hibridomas de células T hacia la proteína PE\_PGRS33 basándose en la detección de IL-2 por citometría de flujo. Estos resultados demuestran la capacidad de nuestros hibridomas de reaccionar y activarse en respuesta al estímulo de su antígeno específico.

Asimismo, se puede citar el hecho de otros grupos de investigación que han recurrido al uso de ensayos de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro* para el estudio de la respuesta inmune a determinados antígenos o para el análisis de las interacciones péptido- MHC (Strong y col., 2011; Carrero y col., 2012). Estos ensayos se llevaron a cabo en condiciones similares a los realizados en la presente investigación y en los cuales se logró inducir la activación de células T.

Las citocinas son utilizadas como marcadores de activación de células. Para los linfocitos T, la IL-2 es una de las primeras citocinas secretadas como respuesta a un proceso de activación ya que constituye un factor esencial de proliferación para estas células (O'Garra, 1998). Por lo tanto, el haber

detectado la secreción de IL-2 por parte del hibridoma 3C2.D6 garantiza su activación.

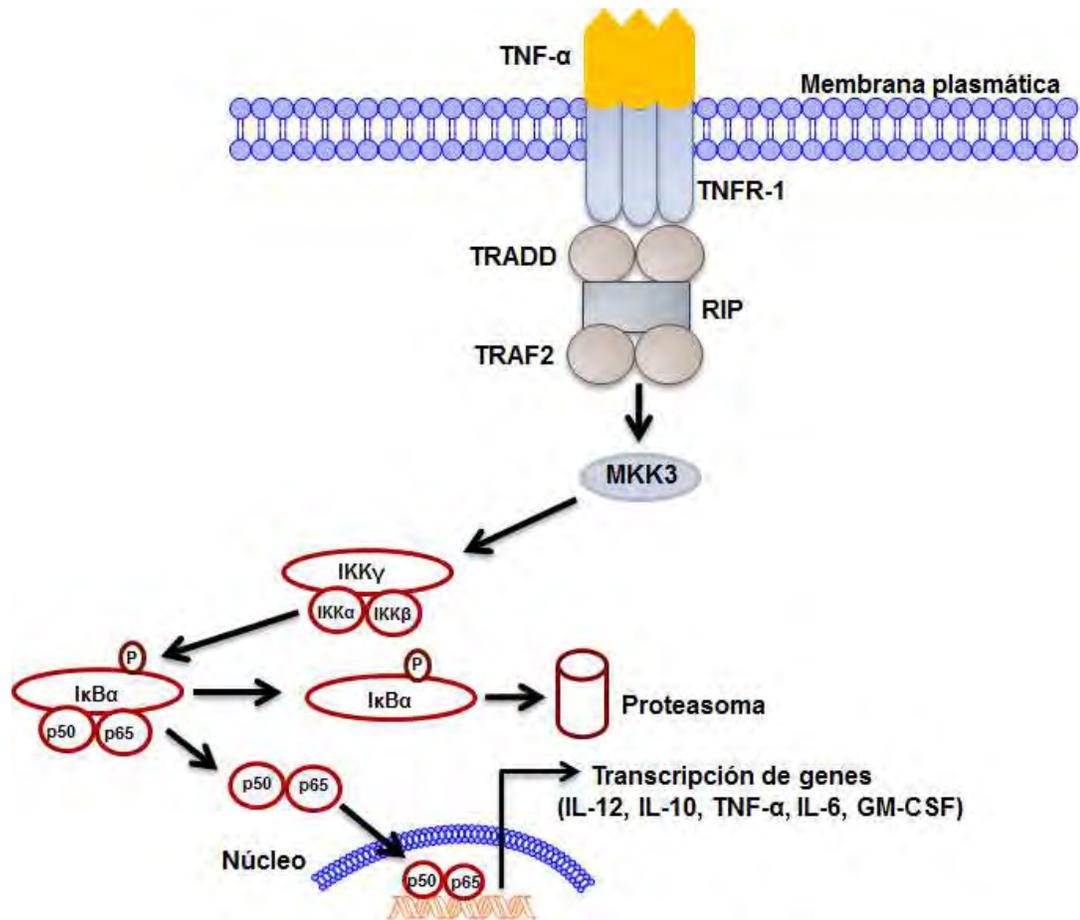
Al caracterizar el sobrenadante del hibridoma 3C2.D6 se detectó la presencia de únicamente TNF- $\alpha$ . A esta citocina se le atribuyen propiedades inflamatorias y es conocida su relevancia en la inmunidad en contra de *M. tuberculosis*, particularmente en la formación y mantenimiento del granuloma. Hasta el momento, los estudios respecto a la proteína PE\_PGRS33 se han enfocado solamente en la búsqueda de secreción de IFN- $\gamma$ . Algunos han puesto de manifiesto la capacidad de las células T de secretar IFN- $\gamma$  en presencia de la proteína PE\_PGRS33 así como cuando se estimula con su dominio PE (Delogu y col., 2001; Cohen y col., 2014). Sin embargo, existen datos que la capacidad de células T CD8<sup>+</sup> de secretar TNF- $\alpha$  en respuesta a antígenos de origen micobacteriano como ESAT-6 y Ag85A (Jeong y col., 2014). Además, Harari y colaboradores en 2011 evaluaron el perfil de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ ) de células CD4<sup>+</sup> en pacientes con TB activa, reportando un incremento en la población de células CD4<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. Esto pone de manifiesto la importancia de células T secretoras de TNF- $\alpha$  en el control de la infección por *M. tuberculosis*.

TNF- $\alpha$  es una citocina pleiotrópica involucrada en la defensa del hospedero, inflamación y apoptosis. Esta molécula juega un doble papel en la regulación del sistema inmune, actuando por un lado como un mediador inflamatorio responsable de iniciar una fuerte respuesta inflamatoria y, por otro lado, como un mediador inmunosupresor participando en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune (Akdis y col., 2016).

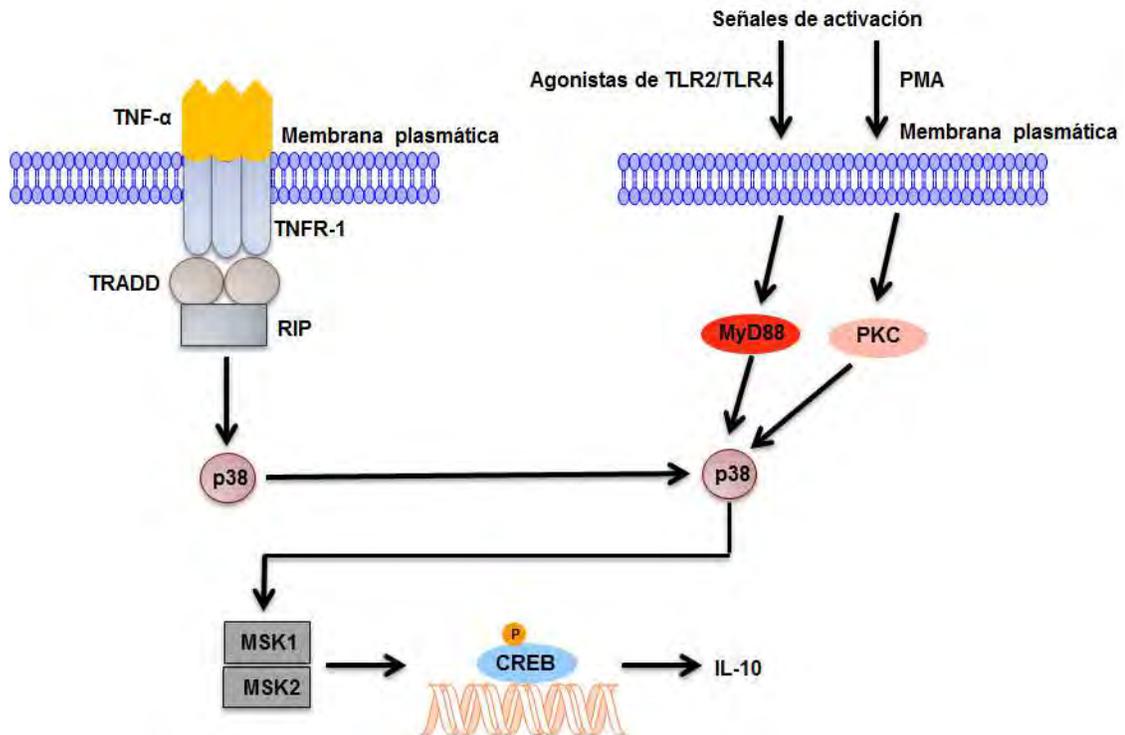
TNF- $\alpha$  es secretado principalmente por macrófagos en respuesta a distintos estímulos como lipopolisacárido o el mismo TNF- $\alpha$ . Al unirse a su receptor, esta molécula puede activar la vía de señalización del NF- $\kappa$ B (Wajant y col., 2003) (factor nuclear kappa B, por sus siglas en inglés) con lo cual permite la transcripción de genes asociados a la producción de distintas

citocinas. Es a partir de este punto donde se puede poner en contexto los resultados obtenidos una vez que se estimularon los macrófagos RAW 264.7 con el sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6. Como se mencionó con anterioridad, el hibridoma 3C2.D6 secretó TNF- $\alpha$  el cual entró en contacto con los macrófagos induciendo la secreción de cinco citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12 y GM-CSF (figura 15). Respecto a TNF- $\alpha$ , IL-6, GM-CSF, IL-12 e IL-10; se encuentra reportado el hecho de que la secreción de las cinco citocinas está regulada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Wajant y col., 2003; Saraiva y col., 2010; Scheller y col., 2011; Bhattachayra y col., 2015) cuya vía de señalización puede ser activada por el estímulo del TNF- $\alpha$ . Respecto a la IL-10, TNF- $\alpha$  puede inducir otra vía de señalización para su producción en el macrófago a cargo de p38, una vez que este es activado en la vía de señalización del TNF- $\alpha$  (figura 16) (Saraiva y col., 2010).

Continuando con los resultados mostrados en la figura 10, es posible observar que para el caso de IL-6 y TNF- $\alpha$ , los macrófagos estimulados con sobrenadante del cultivo del hibridoma 3C2.D6 sin PE\_PGRS33 mostraron una disminución en los niveles de cada una de las citocinas en comparación con el control basal. Esta observación suscita la posibilidad de que el sobrenadante del hibridoma 3C2.D6 sin estimular contenga algún factor capaz de disminuir los niveles de ambas citocinas inflamatorias en los macrófagos. Este factor podría ser la IL-4, ya que se conoce su efecto inhibitorio sobre la secreción de citocinas de tipo inflamatorio. La presencia de IL-4 en el sobrenadante del hibridoma puede provenir de la línea celular M12.C3.F6 (linfoma murino de células B) puesto que a través de un ensayo de proliferación de células CTLL-2 (anexo 8) se puede observar la capacidad del sobrenadante, de únicamente células M12.C3.F6, de inducir proliferación en las células CTLL-2 cuya capacidad de responder a IL-4 ya es conocida (Belani y col., 1996).



**Figura 15.** Modelo del mecanismo de secreción de citocinas en células RAW 264.7 estimuladas por factores inducidos por PE\_PGRS33. Las células RAW 264.7 fueron estimuladas con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33, induciendo la secreción de IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6 y GM-CSF. TNFR-1, receptor de factor de necrosis tumoral 1. TRADD, proteína de dominio de muerte asociada al receptor del factor de necrosis tumoral. TRAF2, factor 2 asociado al receptor de factor de necrosis tumoral. MKK3, proteína quinasa de especificidad dual. RIP, proteína de interacción con receptor.

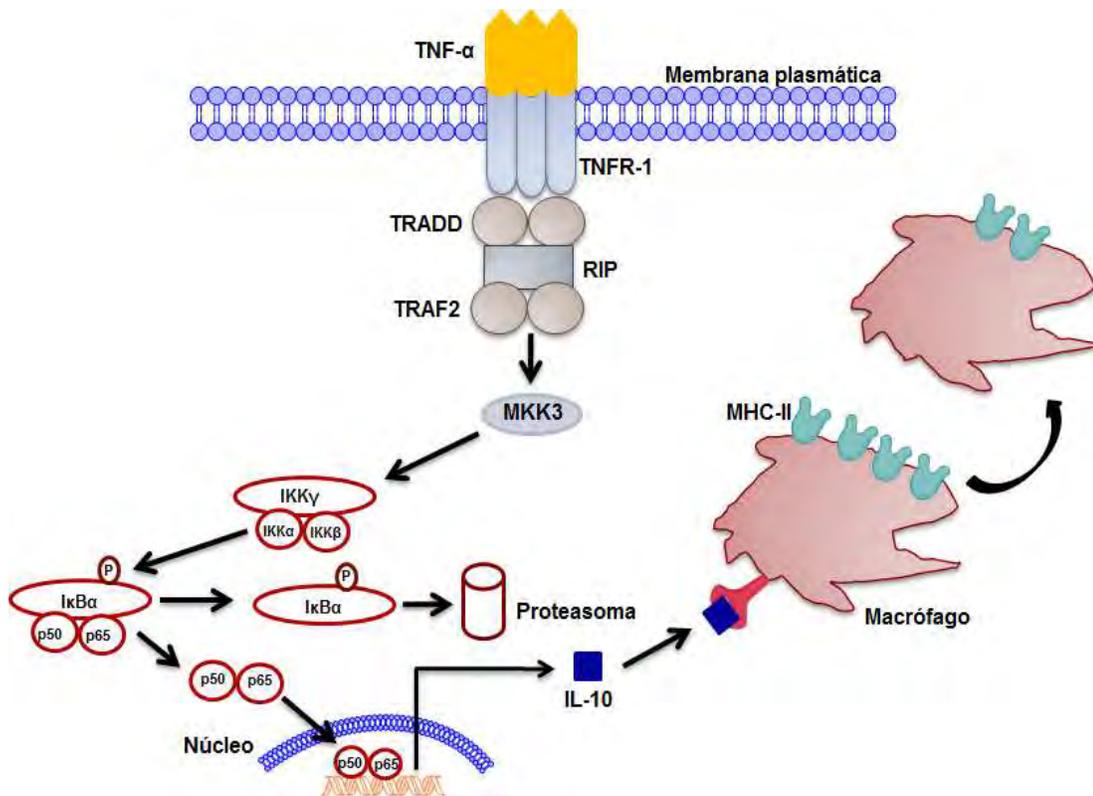


**Figura 16.** Vía alternativa de producción de IL-10 en células RAW 264.7 estimuladas con los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33. TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . TNFR-1, receptor de factor de necrosis tumoral 1. TRADD, proteína de dominio de muerte asociada al receptor del factor de necrosis tumoral. RIP, proteína de interacción con receptor. MyD88, proteína de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88. PKC, proteína quinasa c. TLR2/TLR4, receptor de tipo toll 2 y 4. PMA, forbol miristato acetato. MSK1/2, proteína quinasa activada por estrés 1 y 2. CREB, elemento de unión de respuesta a AMP cíclico.

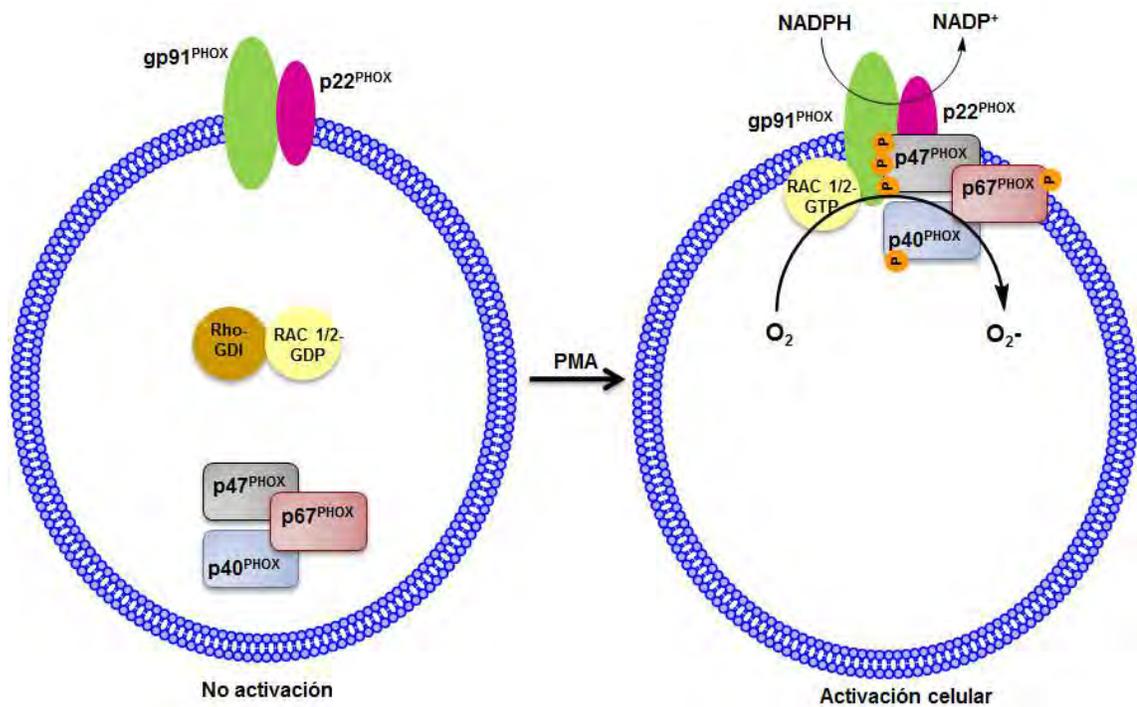
Los resultados representados en la figura 10 muestran a los macrófagos RAW 264.7 secretando cantidades significativas de IL-10. La IL-10 es conocida por sus propiedades anti-inflamatorias, así como por inhibir respuestas Th1 y disminuir la expresión de moléculas MHC-II en células presentadoras de antígeno (Saraiva y col., 2010). Esto puede explicar la falta de expresión de MHC-II en las células RAW 264.7 estimuladas con el sobrenadante del hibridoma 3C2.D6, ya que la IL-10 secretada por ellas mismas, podría estar funcionando como un factor inhibitorio (figura 17).

En relación a los resultados de estallido respiratorio, ya es conocido que la activación de la NADPH oxidasa se encuentra ampliamente regulada por procesos de fosforilación/desfosforilación (principalmente de p47phox) donde podemos observar un estado de pre-activación a uno de activación según el grado de fosforilación. Ciertos agentes tienen la capacidad ya sea de pre-activar o activar de manera completa a esta oxidasa. Dentro de aquellos que pueden activar a la NADPH oxidasa se encuentran compuestos de tipo farmacológico como el forbol miristato acetato (PMA) el cual es capaz de fosforilar 8 de los 9 sitios disponibles de p47phox, con lo cual el complejo logra ensamblarse en la membrana del fagolisosoma para comenzar la reducción del oxígeno molecular y producir las especies reactivas de oxígeno (figura 18). Por el contrario, estímulos del tipo citocinas, solamente fosforilan de manera parcial a p47phox y, por esta razón, el proceso de estallido respiratorio no es detectable en la presencia de estos agentes (Iles y col., 2002; El-Benna y col., 2008).

Lo anterior se pone en concordancia con los resultados mostrados en la figura 14 puesto que el efecto del sobrenadante del hibridoma es a base de citocinas. Esto puede explicar el hecho de que la señal del estallido respiratorio mostrada por los macrófagos RAW 264.7 haya sido indetectable.



**Figura 17.** Modelo de inhibición en la expresión de MHC-II (I-A<sup>k</sup>) en células RAW 264.7. Las células RAW 264.7 secretaron IL-10 en presencia del sobrenadante del hibridoma 3C2.D6. En la figura se ejemplifica un posible mecanismo para explicar la regulación negativa en la expresión de MHC-II (I-A<sup>k</sup>) en los macrófagos. TNFR-1, receptor de factor de necrosis tumoral 1. TRADD, proteína de dominio de muerte asociada al receptor del factor de necrosis tumoral. TRAF2, factor 2 asociado al receptor de factor de necrosis tumoral. MKK3, proteína quinasa de especificidad dual. RIP, proteína de interacción con receptor. MHC-II, complejo principal de histocompatibilidad de clase II. TNF-α, factor de necrosis tumoral α.



**Figura 18.** Proceso de inducción de estallido respiratorio. En ausencia de activación el complejo de la NADPH oxidasa se mantiene disociado; en presencia de agentes como PMA, se induce un alto nivel de fosforilación en la subunidades citosólicas permitiendo el ensamble del complejo para llevar a cabo la producción de ERO. Estímulos como las citocinas no son capaces de inducir una fosforilación adecuada de las subunidades citosólicas por lo cual el complejo se mantiene disociado. PMA, forbol miristato acetato. NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato. GTP, guanosín trifosfato. GDP, guanosín difosfato.

## CONCLUSIONES

- La proteína PE\_PGRS33 indujo la secreción de TNF- $\alpha$  en un hibridoma de células T antígeno específico estimulado mediante un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*.
- El sobrenadante del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33 promovió la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6), anti-inflamatorias (IL-10) y factores de crecimiento (GM-CSF) en células RAW 264.7.
- Los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33 no provocaron un aumento en la expresión de moléculas MHC-II (I-A<sup>k</sup>) en células RAW 264.7.
- Los factores de activación del sistema de procesamiento y presentación de PE\_PGRS33 no indujeron estallido respiratorio en células RAW 264.7.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abebe, F. 2012. Is interferón-gamma the light marcar for vacile Cálmate–Guérin-induced immune protection? The missing link in our understanding of tuberculosis Immunology. Clinical and Experimental Immunology. 169: 213- 219.
- Basu, S., Pathak, S., Banerjee, A., Yang, Z. 2007. Execution of macrophage apoptosis by PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- $\alpha$ . The Journal of Biological Chemistry. 282: 1039- 1050.
- Belani, R., Weiner, J. 1996. Expression of both B7-1 and CD28 contributes to the IL-2 responsiveness of CTLL-2 cells. Immunology. 87: 271- 274.
- Bhatia, S.K. 2010. Tuberculosis. Ch. 8 en Biomaterials for Clinical Aplications. Springer, p. 167-181.
- Bhattacharya, P., Thirupathi, M., Kumar, P. 2015. GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity. Cytokine. 75: 261- 271.
- Brennan, M., Delogu, G. 2002. The PE multigene family: a molecular mantra for mycobacteria. Trends in Microbiology. 10: 246- 249.
- Brown, G.D. 2007. Macrophages. Ch. 1 en Immunology of Fungal Infections. Springer, p. 3- 25.
- Cadieux, N., Parra, M., Cohen, H., Maric, D. 2011. Induction of cell death after localization to the host cell mitochondria by the *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS33 protein. Microbiology. 157: 793- 804.
- Cadieux, N., Parra, M., Cohen, H., Maric, D. 2011. Induction of cell death after localization to the host cell mitochondria by the *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS33 protein. Microbiology. 157: 793- 804.

- Canaday, D., Wilkinson, R., Silver, R., Boom, H. 2001. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand independent mechanism. *The Journal of Immunology*. 167: 2734-2742.
- Carrero, J., Vivanco-Cid, H., Unanue, E. 2012. Listeriolysin O is strongly immunogenic independently of its cytotoxic activity. *Plos One*. 7: 1-10.
- Cascioferro, A., Delogu, G., Colone, M., Sali, M. 2007. PE is a functional domain responsible for protein translocation and localization on mycobacterial cell Wall. *Molecular Microbiology*. 66: 1536- 1547.
- Chacón-Salinas, J., Serafín-López, R., Ramos-Payán, P., Méndez-Aragón, R. 2005. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected *in vitro* with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical and Experimental Immunology*. 140: 443- 449.
- Choi, H., Kim, J., Cha, Y., Kim, C. 2006. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*. 27: 31-44.
- Cohen, I., Parada, C., Acosta-Gío, E., Espitia, C. 2014. The PGRS domain from PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is target of humoral immune response in mice and humans. *Frontiers in Immunology*. 5: 1-9.
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393: 537- 544.
- Cooper, A. 2009. Cell mediated immune responses in Tuberculosis. *Annual Review of Immunology*. 27: 393- 422.

- Copin, R., Coscollá, M., Seiffert, S. 2014. Sequence diversity in the *pe\_pgrs* genes of *Mycobacterium tuberculosis* is independent of human T cell recognition. *mBio*. 5: 1- 11.
- Crommelin, D.J.A. 2013. Vaccines. Ch. 22 en *Pharmaceutical Biotechnology*. Springer, p. 439- 457. New York.
- Delogu, G., Brennan, M. 2001. Comparative immune response to PE and PE\_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 69: 5606- 5611.
- Dheenadhayalan, V., Delogu, G., Brennan, M. 2006. Expression of the PE\_PGRS 33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microbes and Infection*. 8: 262- 272.
- El-Benna J, Dang P, Gougerot-Pocidal MA. 2008. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in Immunopathology*. 30:279-289.
- Elkington, P., Shiomi, T., Breen, R. 2011. MMP-1 drives immunopathology in human tuberculosis and transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 121: 1827- 1833.
- Espitia, C., Vallecillo, A. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* *pe\_pgrs33* is repressed during stationary phase and stress conditions, and its transcription is mediated by sigma factor A. 2009. *Microbial Pathogenesis*. 46: 119-127.
- García, M., Sarmiento, M., Acosta, A. 2009. La inmunidad antituberculosa y su aplicación en el desarrollo de candidatos vacunales. *VacciMonitor*: 25-34.

- Gastélum Aviña, P. 2008. Generación de hibridomas de células T específicos contra la proteína PE\_PGRS33 (Rv1818c) de *Mycobacterium tuberculosis*. Especialización en Inmunohematología Diagnóstica, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.
- Gastélum Aviña, P. 2010. Caracterización parcial de la proteína PE\_PGRS33 (Rv1818c) de *Mycobacterium tuberculosis*, en un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*. Maestría en Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.
- Gastelum-Aviña, P., Lares-Villa, F., Valenzuela, O., Robles-Zepeda, R., Velazquez, C., Garibay-Escobar, A. 2016. A rapid alternative method to evaluate T-cell hybridoma activation using an improved cytokine (IL-2) secretion assay. *Journal of Immunological Methods*. 438: 42- 50.
- Gastelum-Aviña, P., Velazquez, C., Espitia, C., Lares-Villa, F., Garibay-Escobar, A. 2015. A PE\_PGRS33 protein of *Mycobacterium tuberculosis*: an ideal target for future tuberculosis vaccine design. *Expert Review of Vaccines*. 14: 699- 711.
- Georgiev, V. 2009. Tuberculosis. Ch. 14 en *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. Springer, p. 103- 124.
- Giese, M. *Introduction to molecular vaccinology*. Springer.
- Gordon, S., Martinez, F., 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 32: 593- 604.
- Han, Q., Bagheri, N., Hafler, D. 2012. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *PNAS*. 109: 1607- 1612.
- Hanakawa, S. 2016. Macrophages. Ch. 10 en *Immunology of Skin*. Springer, p. 169- 178. Kyoto, Japón.

- Harari, A., Rozot, V., Stalder, JM., Calandra, T. 2011. Dominant TNF- $\alpha$ + *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nature Medicine*. 17: 372-376.
- Hernandez, J., Velazquez, C., Valenzuela, O., Garibay-Escobar, A. 2010. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. *Immunological Investigations*. 39: 197-205.
- Iles KE, Forman HJ. 2002. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunologic Research*. 26: 95-105.
- Jasenosky, L., Scriba, T., Hanekom, W., Goldfeld, A. 2015. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunological Reviews*. 264: 74- 87.
- Jeong, Y., Jeon, B., Chang, J. 2014. Differentiation of antigen-specific T Cells with limited functional capacity during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*. 82: 132- 139.
- Kauffman, S. 2004. New issues in tuberculosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 63: 50- 56.
- Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Van Crevel., R. 2011. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011: 1-12.
- Lemmer, Y., Kalombo, L., Pietersen, R., Jones, A. 2015. Mycolic acids, a promising mycobacterial ligand for targeting of nanoencapsulated drugs in tuberculosis. *Journal of Controlled Release*. 211: 94-104.
- Mahboud, B.H. 2013. Tuberculosis-current issues in diagnosis and management, 1st ed. InTech. Croatia.

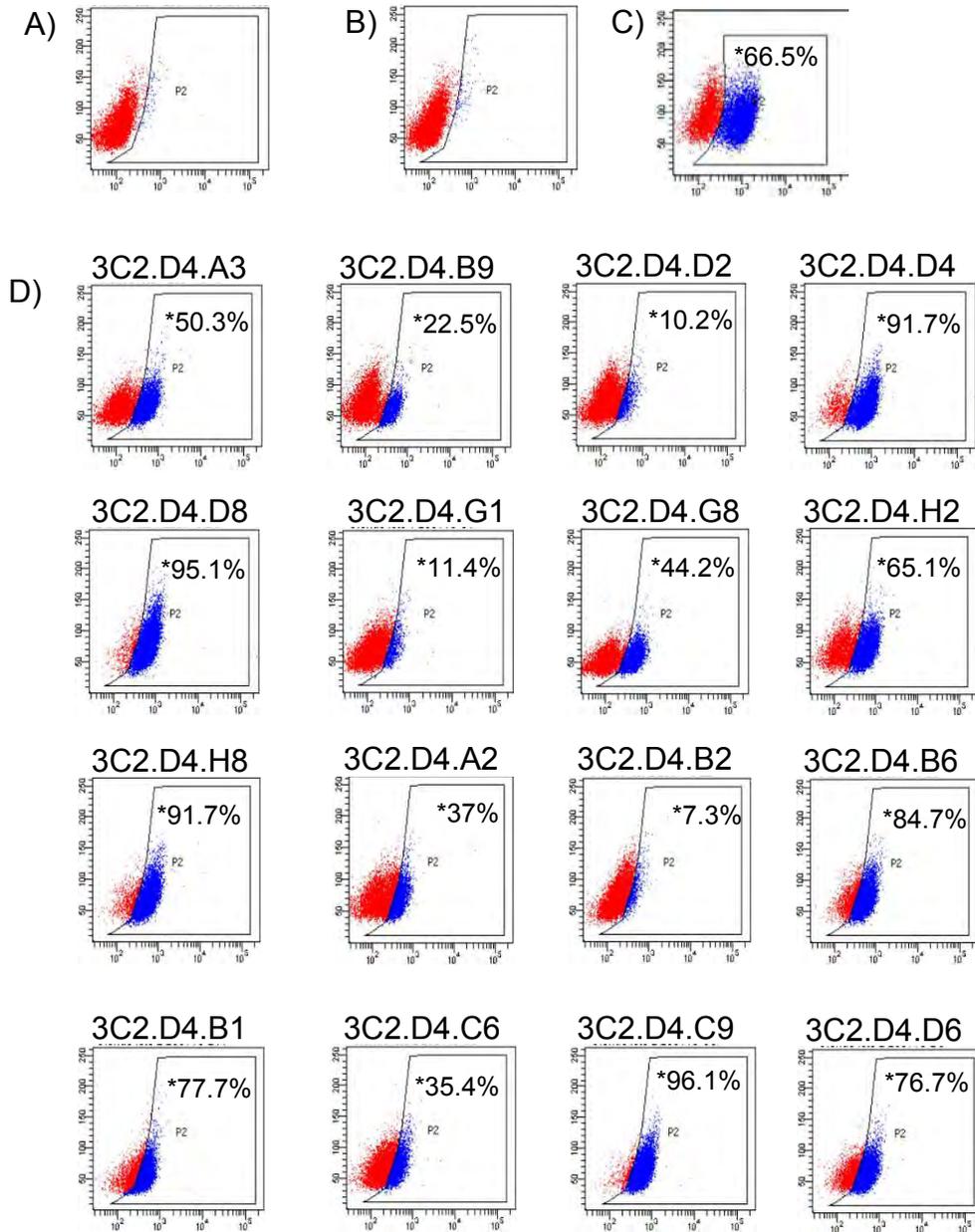
- Martineau, A., Caldwell, J., Oni T. 2011. Reciprocal seasonal variation in vitamin D status and tuberculosis notifications in Cape Town, South Africa. *PNAS*. 108: 19013- 19017.
- Meena, L. 2015. An overview to understand the role of PE PGRS family proteins in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and their potential as new drug targets. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 62: 145- 153.
- Mosser, D., Edwards, J. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. 8: 958- 969.
- Murray, P., Wynn, T. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*. 11: 723- 737.
- Nayak, S., Herzog, R. 2010. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Therapy*. 17: 295- 304.
- O'Garra, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 8: 275- 283.
- O'Garra, A., Redfort, P., Bloom, C. 2013. The immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*. 31: 475- 527.
- Pashine, A., Ulmer, J. 2005. Targeting the innate de immune response with improved vaccines adjuvans. *Nature*. 11: 563- 568.
- Pavón, L. 2016. *Inmunología molecular, celular y traslacional*, 1er ed. Wolters Kluwer. Barcelona, España.
- Pearl, J., Torrado, E., Cooper, A. 2012. Nitric oxide inhibits the accumulation of CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>Tbet<sup>+</sup>CD69<sup>lo</sup> T cells in mycobacterial infection. *European Journal of Immunology*. 42: 3267- 3279.
- Principi, N., Esposito, S. 2015. The present and future of tuberculosis vaccinations. *Tuberculosis*. 95: 6- 13.

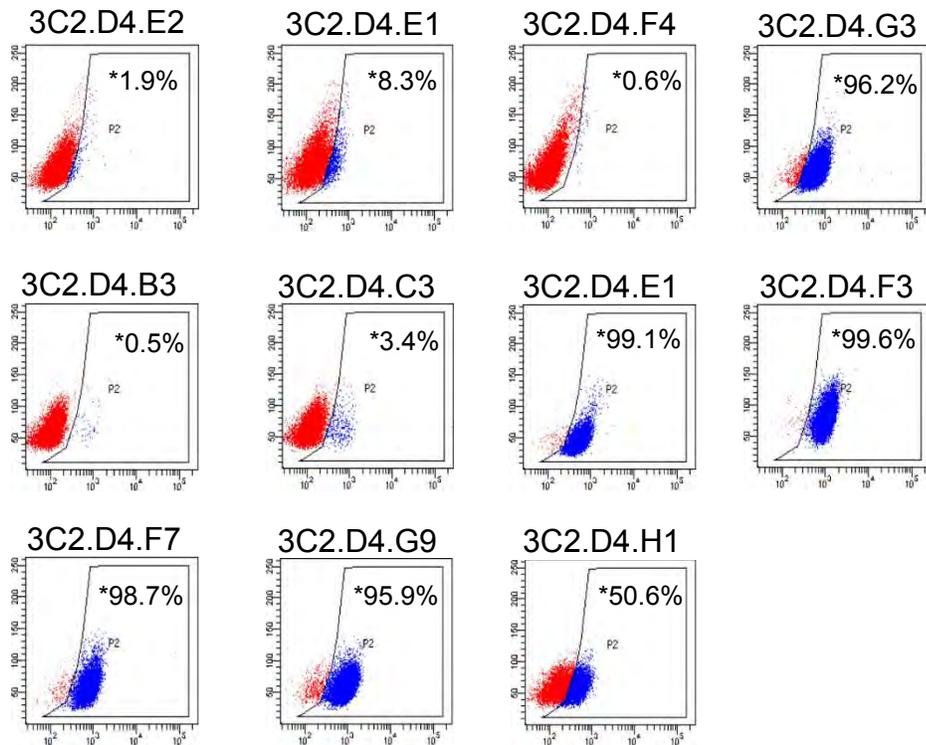
- Raja, A. 2004. Immunology of tuberculosis. Indian Journal of Medical Research. 213- 232.
- Robinson, R., Cooper, A., Orme, I. 2015. The onset of adaptive immunity in the mouse model of tuberculosis and the factors that compromise its expression. Immunological Reviews. 264: 46- 59.
- Saraiva, M., O'Garra, A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nature Reviews Immunology. 10: 170- 181.
- Scanga, C., Bafica, A., Feng, C., Cheever, A. 2004. MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. Infection and Immunity. 72: 2400- 2404.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochimica et Biophysica Acta. 1813: 878- 888.
- Seder, RA., Darrah, PA., Roederer, M. 2008. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. Nature Reviews Immunology. 8: 247- 258.
- Serbina, N., Jia, T., Hohl, T., Pamer, E. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. Annual Review of Immunology. 26: 421- 452.
- Sica, A., Mantovani, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. Journal of Clinical Investigation. 122: 787- 795.
- Singh, P., Parra, M., Cadieux, N., Brennan, M. 2008. A comparative study of host response to three *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS proteins. Microbiology. 154: 3469- 3479.

- Strong, B., Unanue, E. 2011. Presentation of Type B Peptide–MHC Complexes from Hen Egg White Lysozyme by TLR Ligands and Type I IFNs Independent of H2-DM Regulation. *The Journal of Immunology*. 187: 2193- 2201.
- Talarico, S., Cave, M., Foxman, B., Marrs, C. 2007. Association of *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS33 polymorphism with clinical and epidemiological characteristics. *Tuberculosis*. 87: 338- 346.
- Vera-Jimenez, N., Pietretti, D., Wiegertjes, G., Nielsen, M. 2013. Comparative study of  $\beta$ -glucan induced respiratory burst measured by nitroblue tetrazolium assay and real-time luminol-enhanced chemiluminescence assay in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 34: 1216- 1222.
- Wajant, H., Pfizenmaier, H., Scheurich, P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation*. 10: 45-65.
- Wijaya, E., Amin, Z., Rumende, C. 2006. The effect of vitamin D as supplementary treatment in patients with moderately advanced pulmonary tuberculous lesión. *Acta Med Indones-Indones J Intern Med*. 38: 3- 5.
- Zierhut, M. 2016. Tuberculosis. Ch. 105 en *Intraocular Inflammation*. Springer, p. 1111- 1127. Berlín.
- Zumbo, A., Palucci, I., Cascioferro, A., Sali, M. 2013. Functional dissection of protein domains involved in the immunomodulatory properties of PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathogens and Disease*. 69: 232- 239.

# ANEXO 1

## Subclonación de Hibridoma 3C2.D4

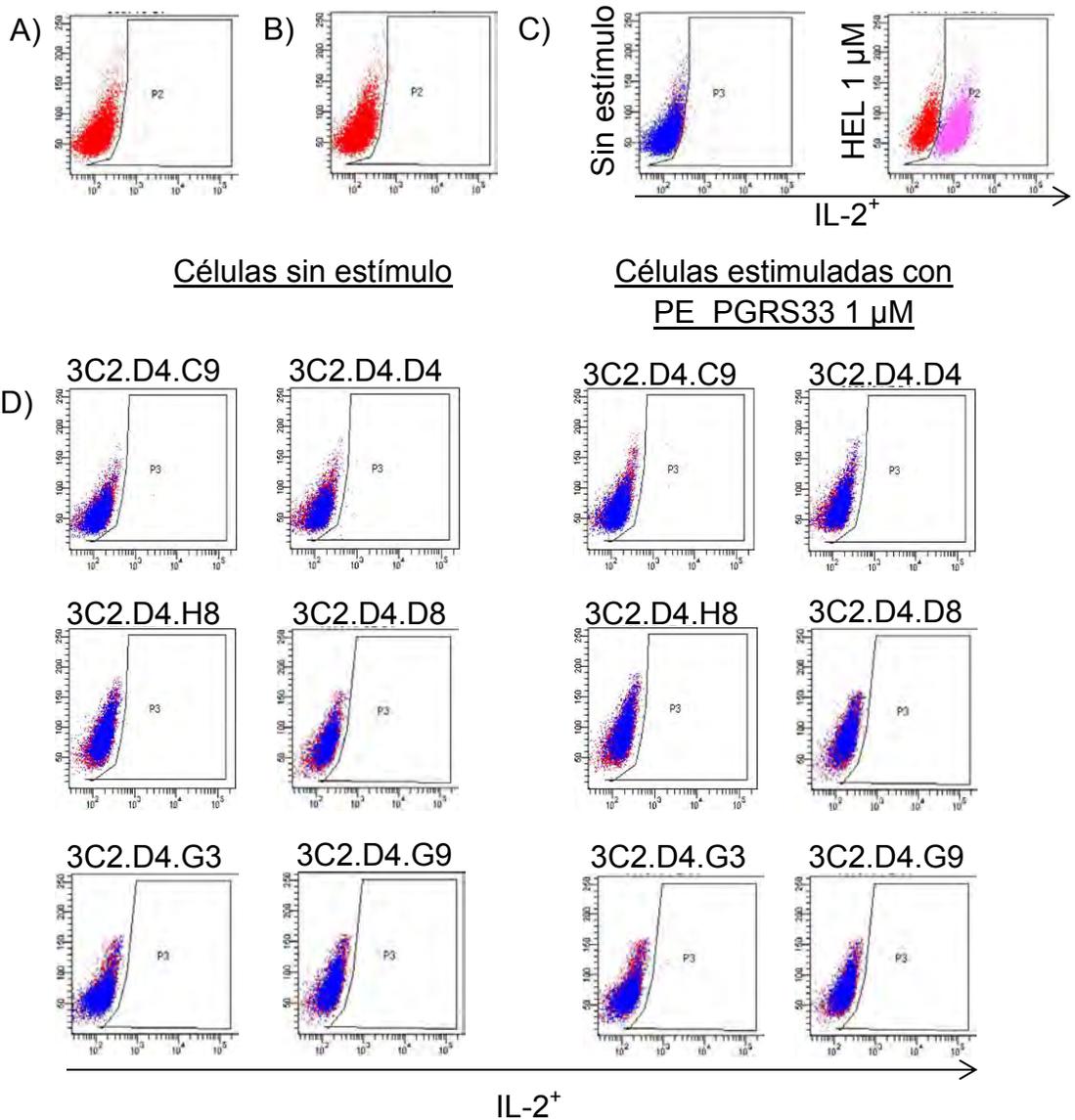


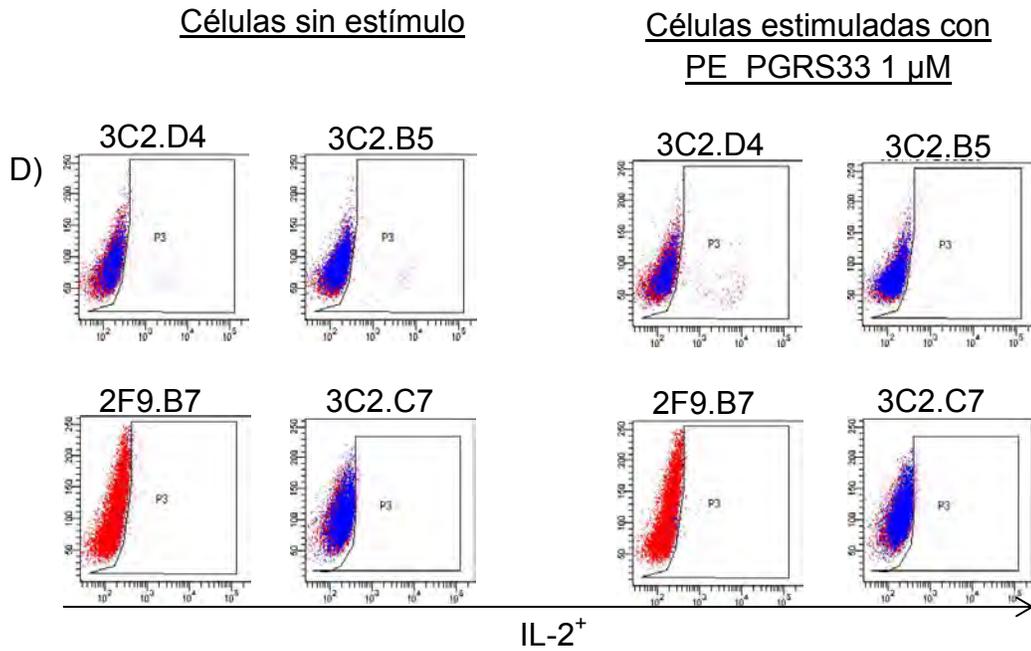


Mediante el método de dilución limitante, se realizó una subclonación del hibridoma 3C2.D4 para elevar el porcentaje de población CD4<sup>+</sup>. La detección del marcador CD4 se llevó a cabo por citometría de flujo, obteniendo un total de 9 clonas donde más del 90% de la población expresó CD4. A) Células sin teñir. B) Control de isotipo. C) Hibridoma 3C2.D4 antes de subclonarse. D) Clonas derivadas del hibridoma 3C2.D4. \*Porcentaje de la población CD4<sup>+</sup>.

## ANEXO 2

### Evaluación de la Activación de Hibridomas de Células T Específicos Contra la Proteína PE\_PGRS33, Mediante la Detección de IL-2 por Citometría de Flujo

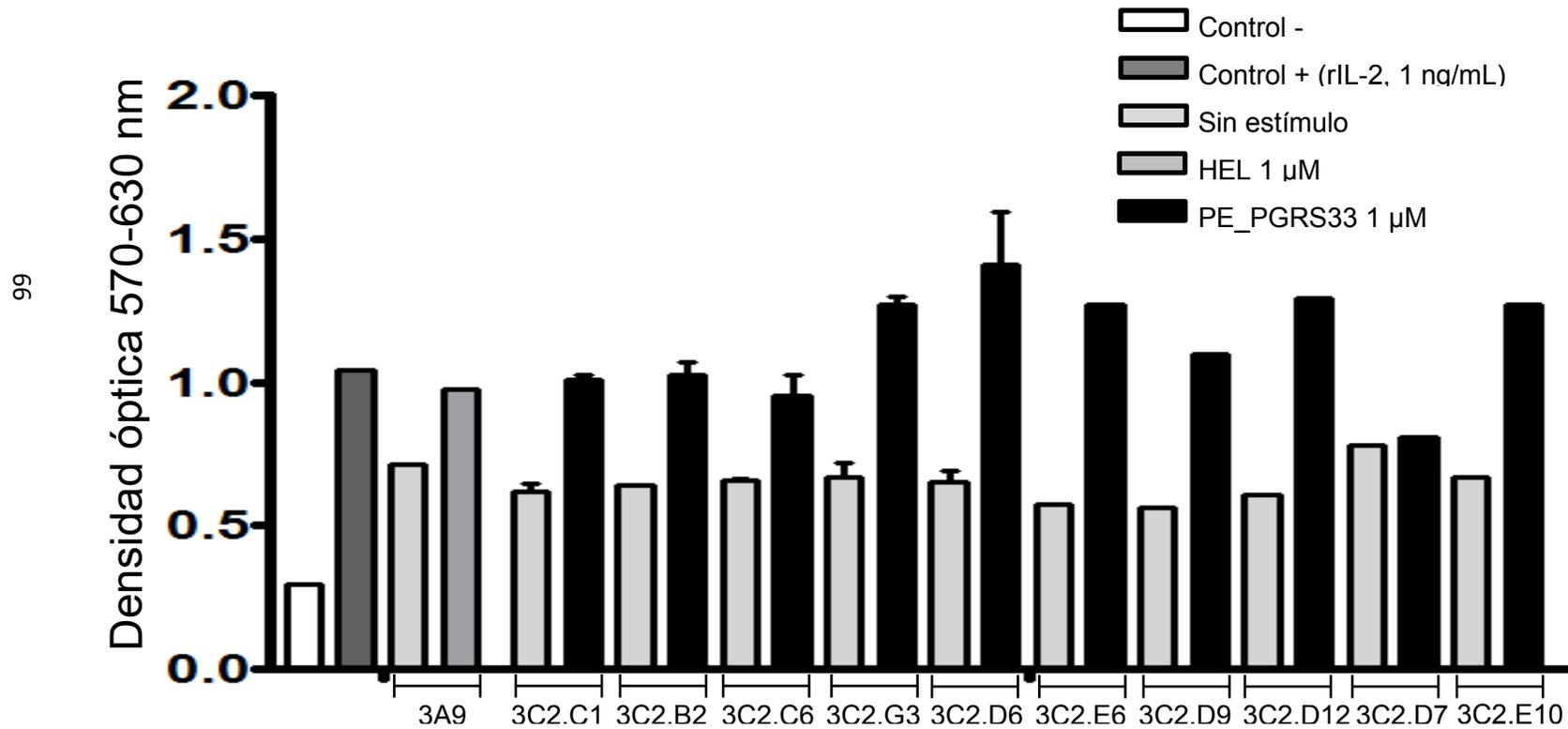




Se evaluó la actividad de 10 hibridomas de células T específicos contra la proteína PE\_PGRS33, mediante detección de IL-2 por citometría de flujo. Ninguno de los hibridomas evaluados presentó actividad contra su antígeno-específico. A) Células sin teñir. B) Control de isotipo. C) Hibridoma control específico contra HEL (3A9). D) Hibridomas de células T específicos contra PE\_PGRS33. HEL, lisozima de huevo de gallina.

### ANEXO 3

#### Subclonación de Hibridoma 3C2 Específico Contra la Proteína PE\_PGRS33

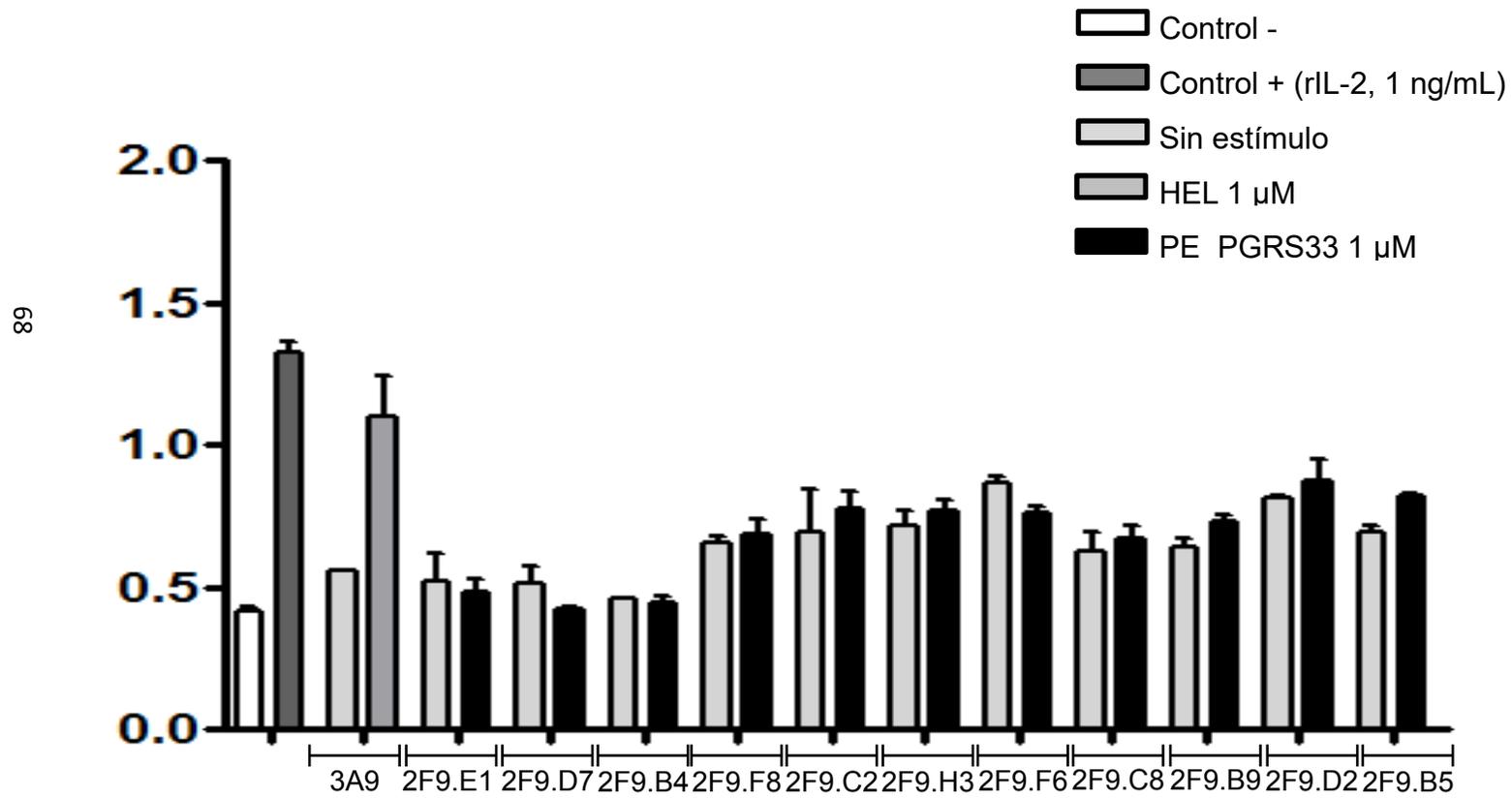


## **Subclonación de Hibridoma 3C2 Específico Contra la Proteína PE\_PGRS33**

El hibridoma 3C2, específico contra la proteína PE\_PGRS33, se sometió al proceso de subclonación por dilución limitante con el objetivo de encontrar una clona reactiva a la PE\_PGRS33. Se evaluó la actividad de 10 clonas a través del bioensayo de proliferación de la línea celular CTLL-2, donde 9 de los 10 hibridomas presentaron actividad. Como control de activación, se utilizó el hibridoma 3A9 específico contra HEL.

## ANEXO 4

### Subclonación de Hibridoma 2F9 Específico Contra la Proteína PE\_PGRS33

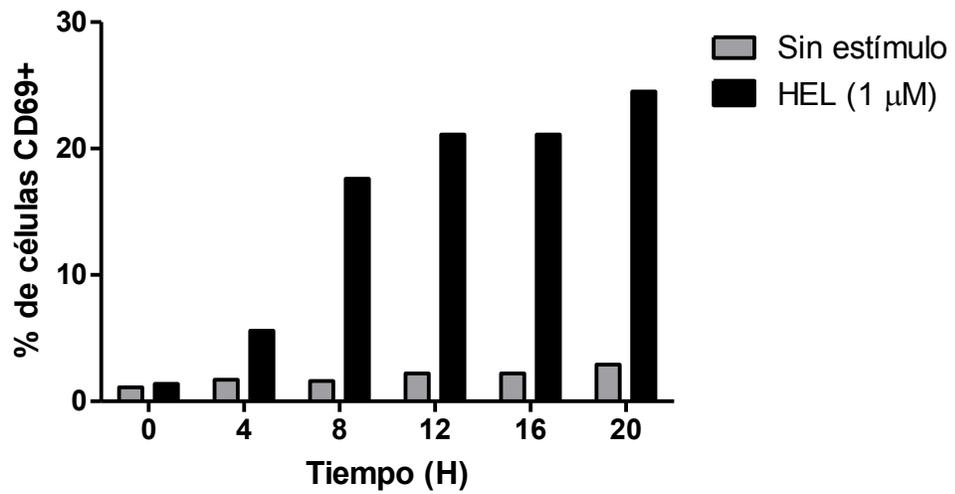


### **Subclonación de Hibridoma 2F9 Específico Contra la Proteína PE\_PGRS33**

Con el objetivo de encontrar hibridomas reactivos a la proteína PE\_PGRS33, se realizó una subclonación del hibridoma 2F9. Se evaluó la actividad de 11 clonas a través del bioensayo de proliferación de CTLL-2. Ninguna de las clonas presentó actividad. Como control de activación, se utilizó el hibridoma 3A9 específico contra HEL.

## ANEXO 5

### Cinética de Expresión de CD69 en Hibridoma 3A9

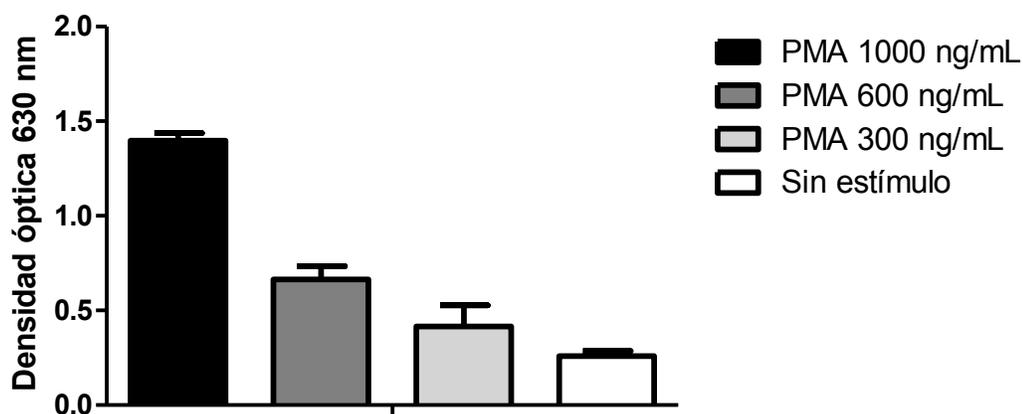


Se llevó a cabo una cinética de activación del hibridoma 3A9 específico contra HEL, para encontrar un método adicional para probar la activación de hibridomas de células T.

## ANEXO 6

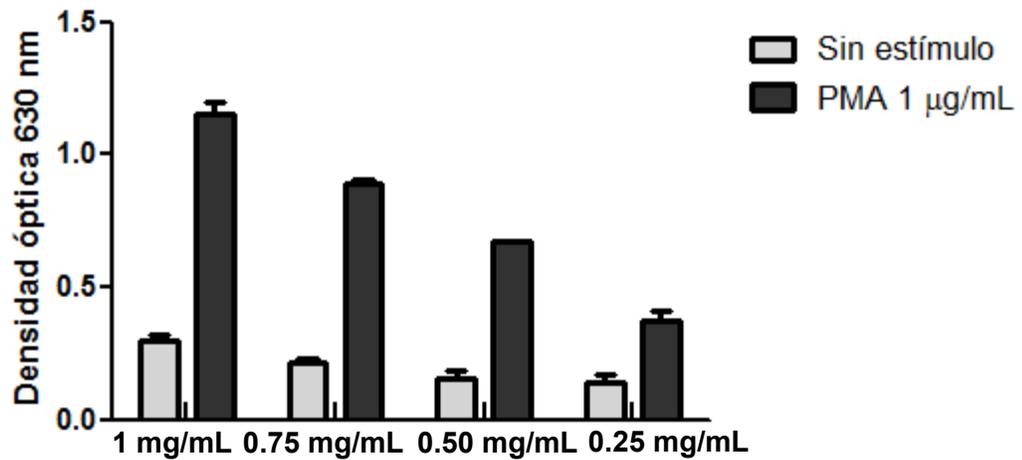
### Implementación del Método de Reducción del Nitroazul de Tetrazolio (NBT) para Determinar la Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en Células RAW 264.7

#### Determinación de la Concentración Óptima de PMA



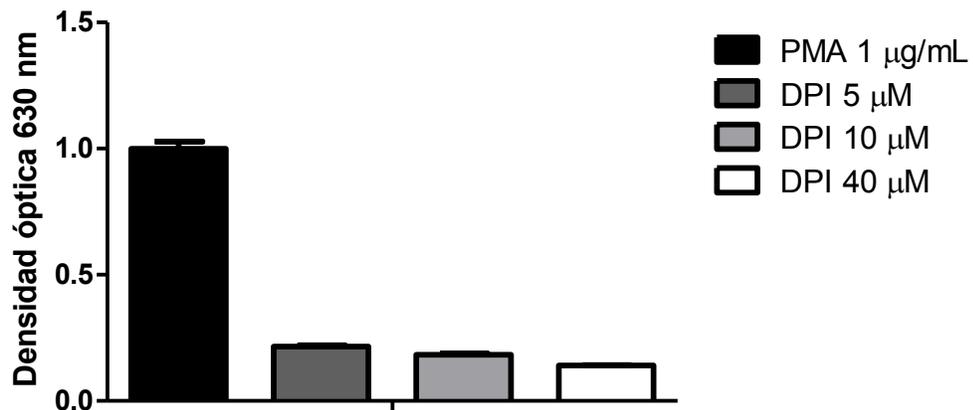
Como inductor del proceso de estallido respiratorio se utilizó PMA (forbol miristato acetato), para lo cual se determinó la concentración óptima a usar mediante un ensayo donde se evaluaron distintas concentraciones de PMA en macrófagos RAW 264.7. El estímulo se proporcionó por un tiempo de 45 minutos. La concentración seleccionada fue aquella que originó la mayor señal de densidad óptica

### Titulación de la Concentración Óptima de NBT



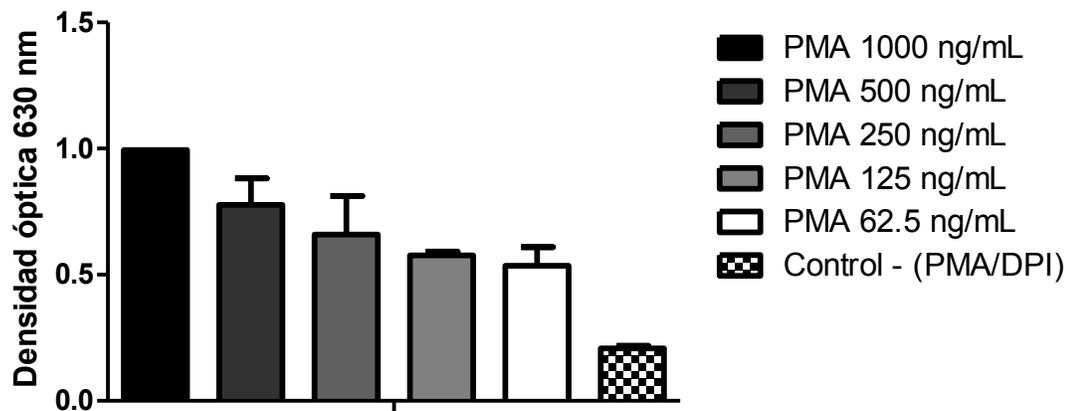
Una vez determinada la concentración óptima del control positivo, se procedió a obtener la concentración adecuada de NBT a través de una titulación de distintas concentraciones del reactivo. La mejor señal se presentó al utilizar la concentración mayor del reactivo NBT.

### Titulación de DPI



Durante el transcurso de la presente investigación, se propuso el uso del inhibidor de flavoproteínas DPI como control negativo. Por lo tanto, se procedió a realizar una titulación del reactivo, seleccionando la concentración que presentó una menor señal de densidad óptica.

### Determinación de Concentración Subóptima de PMA

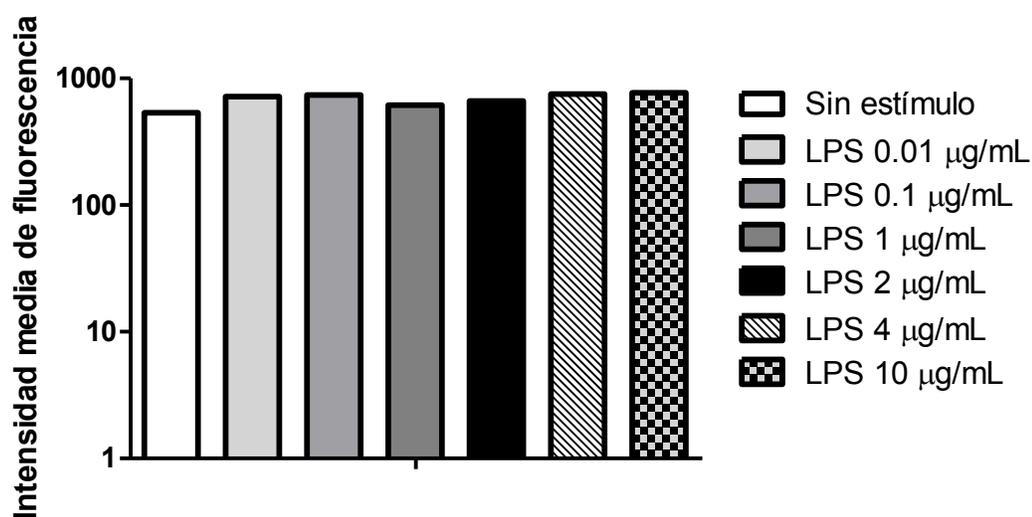


Para finalizar, se evaluó la concentración subóptima para inducir el proceso de estallido respiratorio en macrófagos RAW 264.7. Se eligió la concentración menor de todas las evaluadas.

## ANEXO 7

### Implementación de Condiciones Para Evaluar la Expresión de Moléculas MHC-II (IA<sup>k</sup>) en Células RAW 264.7

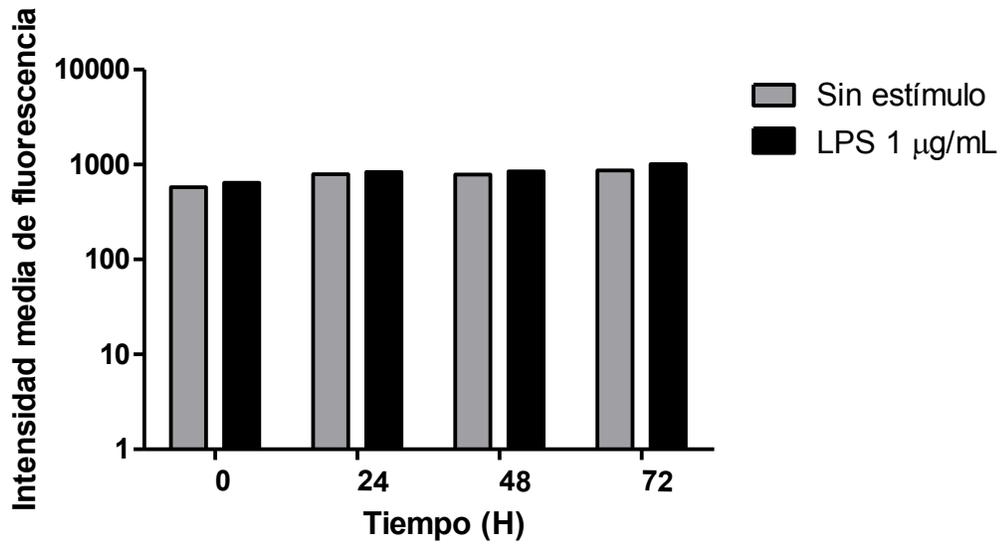
#### Curva de Concentraciones de LPS



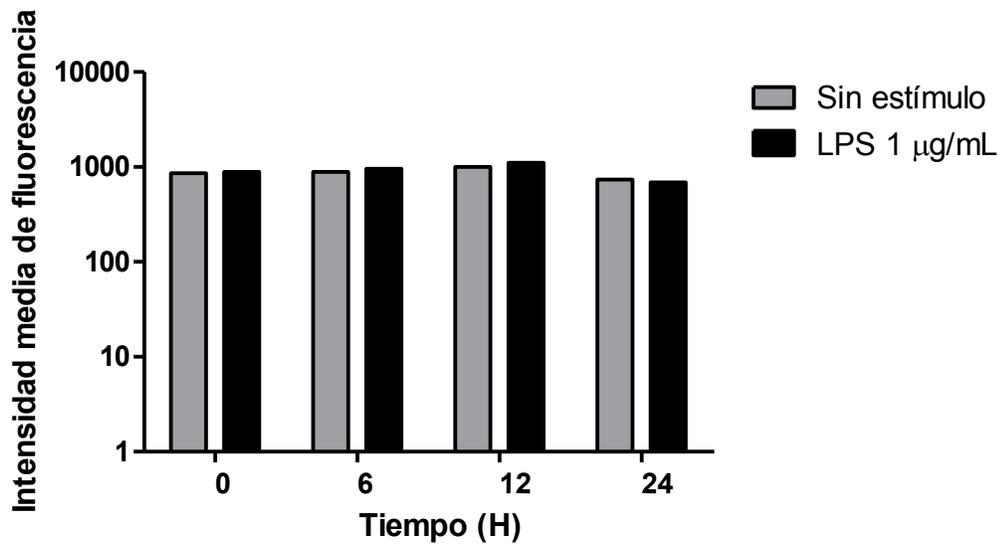
Basados en datos reportados en la bibliografía, se propuso utilizar LPS (lipopolisacárido) como control positivo para inducir un aumento en la expresión de moléculas de MHC-II en células RAW, las cuales se estimularon por 24 horas con distintas concentraciones de LPS. Sin embargo, no se logró apreciar una diferencia en la expresión de MHC-II con ninguna de las concentraciones utilizadas respecto a las células sin estimular.

## Cinética de Expresión de MHC-II en Células RAW 264.7

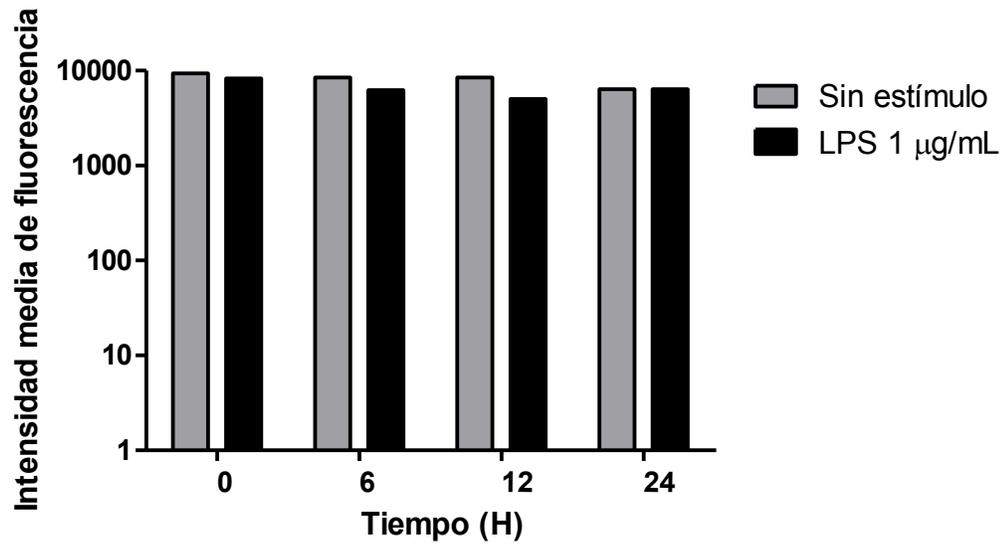
A)



B)



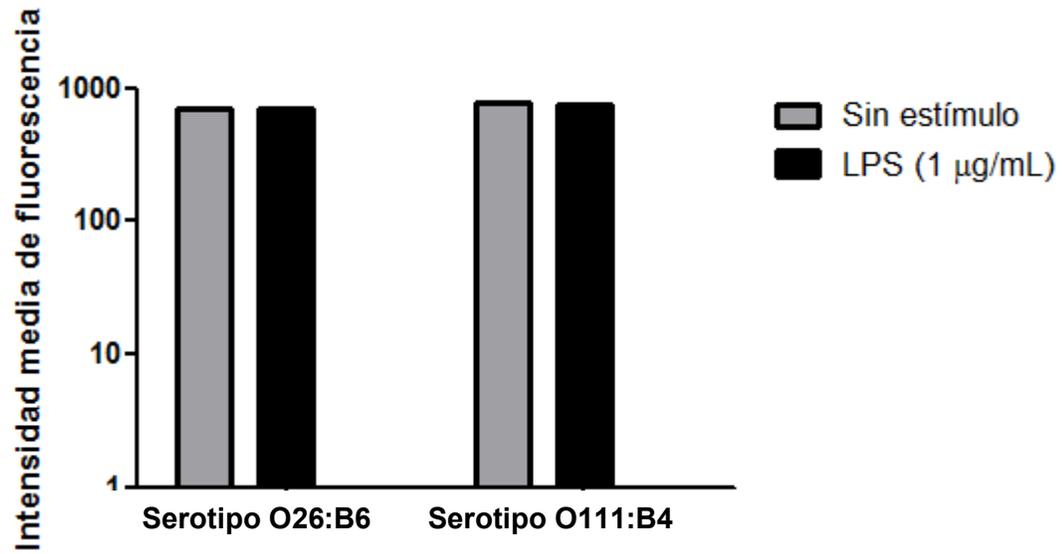
C)



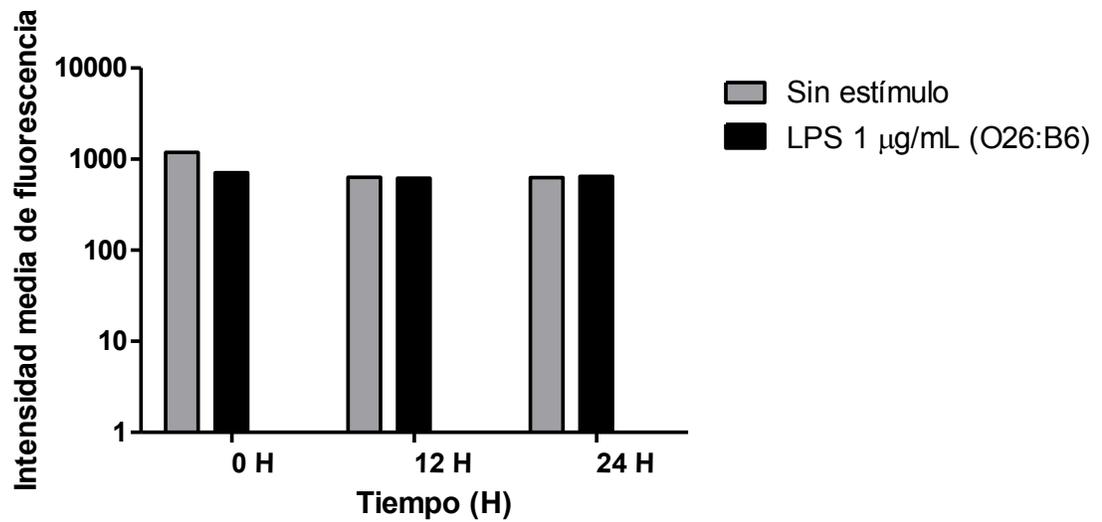
Se implementó una cinética de expresión de MHC-II en los macrófagos RAW. En los gráficos A y B la evaluación se realizó en superficie y, en C, de forma intracelular. No obstante, no se observó diferencias en ninguna de las condiciones evaluadas con respecto al control de células sin estimular.

## Comparación Entre Distintos Serotipos de LPS

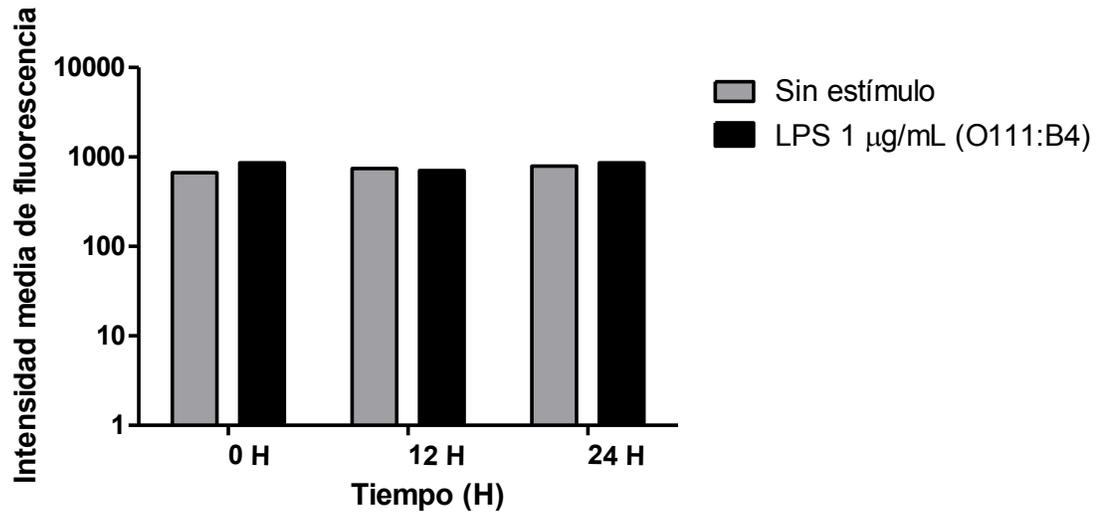
A)



B)

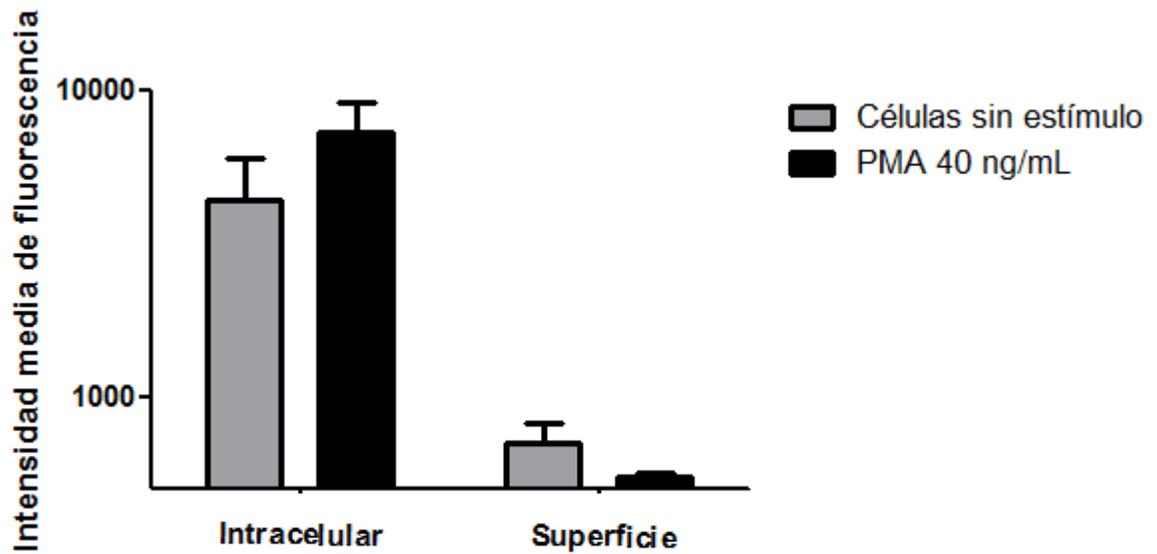


C)



Eventualmente se realizó una comparación entre el efecto producido en la expresión de MHC-II por dos serotipos distintos de LPS (O26:B6 y O111:B4). A) Evaluación a 24 H. B) y C) cinética 0-24 H. Todas las pruebas se llevaron a cabo analizando la expresión en la superficie celular. En todos los ensayos previamente mostrados se utilizó el serotipo O26:B6 de LPS.

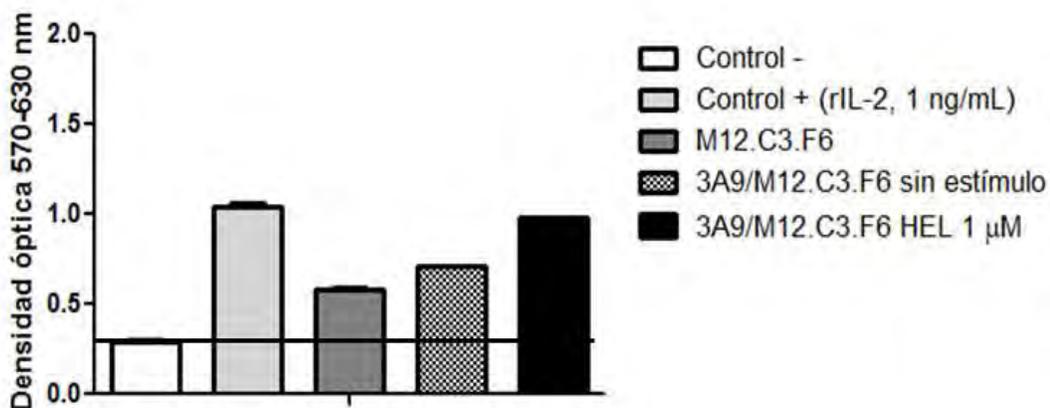
## Inducción de Expresión de MHC-II con PMA



Tratando de establecer las condiciones para evaluar la expresión de MHC-II en células RAW 264.7, las células fueron estimuladas con PMA por 24 horas. Posteriormente, se analizó la expresión de MHC-II de manera intracelular y en superficie. Solamente se encontraron diferencias al medir de forma intracelular.

## ANEXO 8

### Ensayo de Proliferación de Células CTLL-2



Se realizó un ensayo de proliferación con la línea celular CTLL-2 donde se observa la capacidad de activación del hibridoma 3A9 específico contra HEL. Además, se puede apreciar la presencia de un factor de proliferación en el sobrenadante del cultivo de células M12.C3.F6. HEL, lisozima de huevo de gallina.

## ANEXO 9

### **Protocolo Para la Evaluación de Estallido Respiratorio en Macrófagos RAW 264.7 Mediante la Reducción de NBT**

1. En placa de 48 pozos, cultivar  $2.5 \times 10^5$  células RAW/pozo por 24 horas.
2. Retirar el medio de cultivo y hacer dos lavados con 1 mL de PBS cada uno, cuidando no despegar las células de la placa.
3. Adicionar el reactivo NBT a una concentración final de 1 mg/mL en conjunto con los estímulos. Incubar por 45 minutos.
4. Realizar dos lavados con 1 mL de PBS.
5. Adicionar 100  $\mu$ L de metanol absoluto, dejar incubar 5 minutos y secar al aire.
6. Agregar 140  $\mu$ L de DMSO y 120  $\mu$ L de KOH 2M para disolver el formazán generado por la reducción del NBT.
7. Transferir el contenido de cada pozo a una placa de 96 pozos y tomar la lectura de densidad óptica a 630 nm.

## ANEXO 10

### **Protocolo Para Evaluar la Activación de Hibridomas de Células T, a Través de la Detección de IL-2 por Citometría de Flujo**

1. Preparar una suspensión celular del hibridoma de células T y de la célula presentadora de antígeno (CPA) a concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL cada una.
2. En placa de 96 pozos, colocar 100  $\mu$ L de la suspensión del hibridoma de células T y 50  $\mu$ L de la suspensión de CPA. Adicionar el antígeno-específico en un volumen de 50  $\mu$ L.
3. Agregar el primer anticuerpo de captura (anti-CD45/IL-2) del kit de la casa comercial Miltenyi Biotec (No. Cat. 130-090-492) a cada pozo a una dilución final 1:50.
4. Incubar la placa durante 16 horas.
5. Cosechar las células y colocarlas en tubos de FACS. Realizar dos lavados con 3 mL de PBS frío (350 xg, 10 minutos, 4 °C).
6. Agregar el segundo anticuerpo (anti-IL-2-PE) a una dilución final 1:50. Adicionar también el anticuerpo anti-CD4-FITC (eBioscience, No. Cat. 11-0041-85)
7. Incubar a 4 °C por 30 minutos en ausencia de luz.
8. Realizar dos lavados con 3 mL de PBS frío (350 xg, 10 minutos, 4 °C).
9. Fijar con 200  $\mu$ L de PBS y 200  $\mu$ L de p-formaldehído al 2%.
10. Filtrar el contenido de cada tubo con tela de organza y adquirir en un citómetro de flujo.

## ANEXO 11

### Cultivo y Lavado de Células CTLL-2

1. Una vez descongeladas, cultivar las células en una caja de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> en un volumen final de 10 mL de D10F (Gibco, No. Cat. 12100-038) y adicionar IL-2 recombinante (Sigma-Aldrich, No. Cat. I0523) a concentración de 1 ng/mL.
2. Cada tres días, retirar las células de la caja de cultivo con pipeta serológica y depositarlas en un tubo cónico con 30 mL de DMEM (Sigma-Aldrich, No. Cat. D5648).
3. Centrifugar a 623 xg/ 4 °C/ 7 minutos.
4. Retirar el sobrenadante con pipeta serológica para evitar perder células.
5. Resuspender el botón celular en un 1 mL de DMEM utilizando micropipeta y, posteriormente, agregar 29 mL de DMEM.
6. Volver a centrifugar en las condiciones previamente citadas hasta completar un número de 5 lavados.
7. Después del quinto lavado, resuspender el botón celular en 1 mL de D10F.
8. Tomar una alícuota y contar las células en cámara de Neubauer.
9. Colocar las células en la caja de 25 cm<sup>2</sup> a una concentración de 15000 células/mL.
10. Agregar IL-2 recombinante a concentración de 1 ng/mL.

**NOTA:** El medio D10F se suplementa con suero fetal bovino marca Gibco (No. Cat. 16000-044) inactivado por calentamiento.

## Anexo 12

### **Establecimiento del Sistema de Procesamiento y Presentación de PE\_PGRS33**

1. Hacer una suspensión celular del hibridoma específico contra la proteína PE\_PGRS33 a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL. Preparar una suspensión celular, con la misma concentración, de la línea celular M12.C3.F6 (célula presentadora de antígeno).
2. En placa de 96 pozos, colocar 100  $\mu$ L de la suspensión del hibridoma con 50  $\mu$ L de la suspensión de M12.C3.F6.
3. Adicionar 50  $\mu$ L de una solución 4  $\mu$ M de PE\_PGRS33 (concentración final 1  $\mu$ M), previamente preparada en D10F.
4. Incubar por 20 horas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

Como control positivo, se emplea el hibridoma de células T 3A9 específico contra HEL. Las condiciones son las mismas que se aplican al hibridoma específico contra PE\_PGRS33.