



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas Instituto de Investigaciones Biomédicas

RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL A LA PROTEÍNA PE_PGRS 33 Y SUS DOMINIOS EN HUMANOS Y RATONES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Ingrid Beatriz Cohen Falquez

TUTOR

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

Dr. Vianney Ortiz Navarrete. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional.

Ciudad de México, Diciembre de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Inmunología, bajo la dirección de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón.

Durante la realización del presente trabajo se contó con el apoyo de una beca otorgada por la Universidad Nacional Autónoma de México, así como con financiamiento de los proyectos 81214 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) e IN221107 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA).

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón por ser mentora, guía y consejera; no sólo en mi formación académica sino también en la personal. Gracias por su enorme paciencia, apoyo y por la confianza de que este proyecto podría ser una realidad en mi vida.

Agradezco también al Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez y al Dr. Vianney Ortiz Navarrete, miembros de mi comité tutor, por sus críticas constructivas durante la realización de este trabajo y por estar siempre allí cuando surgían dudas e inquietudes.

Gracias a la M. en C. Cristina Parada Colín por su asistencia técnica y disposición a apoyarme en todo momento. Tu contribución a este trabajo fue muy grande Cristi.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Marta, Fernando, Edén, Wendy, Angélica, Pedro, Javier, Jaime, Elizabeth y Antonio por compartir su conocimiento conmigo y por todos los recuerdos agradables que han dejado en mi memoria.

Gracias a mis amigas Claudia, Paulina, Tere, Olga y Valentina; sus oraciones y palabras de ánimo fueron mis constantes compañeras.

Mil gracias a la familia Monroy Nájera por adoptarme como miembro de su maravillosa familia mientras realizaba el posgrado. Por siempre los llevaré en el corazón.

Mis agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México por la beca otorgada para la realización de este trabajo como parte del posgrado en Ciencias Biomédicas.

Dedicatoria

*A ti, mi Dios eterno, por guiar los pasos que me condujeron a culminar esta etapa de mi vida.
Gracias Señor por el conocimiento que obtuve, pero sobre todo por fortalecer mi carácter.*

*A mis padres Paul y Tere, por ser apoyo incondicional en éste y todos los períodos de mi vida.
Gracias padre por ser un hombre leal, con quien puedo conversar de corazón y por tu enorme confianza en mí. Gracias madre por secundarme en todas las aventuras que se me ocurrían. Gracias por ser un ejemplo de mujer decidida, valiente y capaz de sacar adelante una carrera y continuar amando a su familia con toda su alma.*

*A mi esposo amado, Antonino, por ser la principal fuente de ánimo cuando las fuerzas desfallecían.
Gracias por ser un maravilloso refugio contra mis temores y miedos y por creer que podía llegar a la meta cuando ni yo misma lo creía.*

A mis hijas Ana Sofía y Marian, quienes llenan mis días de ternura, belleza y alegría. Ustedes sacan lo mejor de mí, tesoros de mi vida.

A mi abuelo Leonardo Falquez, cuya confianza en mí me infundía ánimos para seguir adelante. Sé que te alegrarías enormemente por ver este sueño convertirse en realidad

TABLA DE CONTENIDO

INDICES.....	8
Lista de abreviaturas.....	8
Índice de figuras y tablas.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
1.INTRODUCCION.....	12
1.1. La tuberculosis.....	12
1.1.1. Patogénesis de la tuberculosis pulmonar.....	14
1.1.2. Respuesta inmune a la tuberculosis.....	15
1.1.3. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis.....	17
1.2. Familia de genes PE de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.2.1. Proteínas PE_PGRS.....	21
1.2.1.1. Proteínas PE_PGRS y latencia.....	22
1.2.1.2. La proteína PE_PGRS33.....	24
1.2.1.3. Dominios PE y PGRS de la proteína PE_PGRS33.....	26
2. JUSTIFICACION.....	28
3. HIPOTESIS.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivos específicos.....	31
5. MATERIALES Y METODOS.....	32
5.1. Identificación de epítopes MHC-I en las PE_PGRS.....	32
5.1.1. Predicción de epítopes de unión a MHC-I.....	32
5.1.2. Ensayo de unión de péptidos a moléculas MHC-I.....	33

5.2. Preparación de las proteínas recombinantes PE_PGRS33, PE y PGRS.....	34
5.2.1. Clonación de los fragmentos PE y PGRS.....	34
5.2.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	35
5.3. Ensayos en ratones.....	39
5.3.1. Preparación del antígeno para inmunización.....	39
5.3.2. Inmunización de los ratones.....	39
5.3.3. Ensayo de proliferación con CFSE.....	40
5.3.4. Medición de IFN- γ en ratones.....	41
5.3.5. Detección de anticuerpos en ratones.....	42
5.4. Estudio en humanos.....	42
5.4.1. Características de los donadores.....	42
5.4.2. Determinación de IFN- γ para detectar individuos LTBI y no infectados.....	43
5.4.3. Determinación de IFN- γ para detectar individuos con respuesta positiva a la PE_PGRS33.....	44
5.4.4. Determinación de IFN- γ para estudiar respuesta a la PE_PGRS33 y sus dominios en individuos LTBI y no infectados.....	44
5.4.5. Detección de anticuerpos antígeno específicos en individuos LTBI y no infectados.....	45
5.5. Análisis estadísticos.....	46
6. RESULTADOS.....	47
6.1. Identificación de epítopes MHC-I en las PE_PGRS.....	47
6.1.1. Predicción de epítopes de unión a MHC-I.....	47
6.1.2. Ensayo de unión de péptidos a moléculas MHC-I.....	47
6.2. Respuesta inmune humoral y celular a la PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en ratones.....	49
6.2.1. Respuesta inmune humoral en ratones.....	49
6.2.2. Proliferación antígeno específica de células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en ratones.....	51

6.2.3. Secreción de IFN- γ en respuesta al estímulo con PE_PGRS33, PE y PGRS en ratones.....	53
6.3. Respuesta inmune humoral y celular a la PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en humanos.....	54
6.3.1. Respuesta de IFN- γ a la proteína PE_PGRS33 completa en individuos LTBI y en no infectados.....	54
6.3.2. Respuesta de IFN- γ a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en individuos LTBI y en no infectados.....	55
6.3.3. Respuesta inmune humoral a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en individuos LTBI y en no infectados.....	56
7. DISCUSION.....	59
8. CONCLUSIONES.....	66
9. BIBLIOGRAFIA.....	68

INDICES

Lista de abreviaturas

	Abreviatura
Bacilo Calmette-Guérin	BCG
Tuberculosis	TB
Infección latente por <i>M. tuberculosis</i>	LTBI
Interleucina-12	IL-12
Interleucina-18	IL-18
Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II	MHC II
T helper cell type 1	Th1
Interferon- γ	IFN- γ
Factor de necrosis tumoral- α	TNF- α
Células citolíticas	CTLs
Factor de crecimiento transformante tipo beta	TGF- β
Sintetasa 2 de óxido nítrico	NOS2
Proteínas purificadas derivadas de <i>M. tuberculosis</i>	PPD
Ensayos de liberación de IFN- γ	IGRAs
Antígeno temprano secretorio de 6 kDa	ESAT-6
Antígeno de filtrado de cultivo de 10 kDa	CFP-10
Secuencia repetitiva polimórfica rica en Guanina y Citosina	PGRS
Gli	Glicina
Ala	Alanina
Factor de necrosis tumoral α	TNF- α
Receptor tipo toll tipo 2	TLR-2
Ovoalbúmina	OVA
Electroforesis en geles de poliacrilamida- Dodecil sulfato de Sodio	SDS-PAGE
Kilodaltons	kDa
Peroxidasa	HRP
Inmunoglobulina G	IgG
Densidad óptica	OD
Picogramos	Pg
Unidades Internacionales	IU
World Health Organization	WHO

Índice de figuras y tablas

Figura 1.1. Clasificación de los miembros de la familia de proteínas PE.....	20
Figura 5.1. Secuencias amplificadas por PCR para obtener los dominios PE y PGRS de la proteína PE_PGRS33.....	35
Figura 5.2. Proteínas recombinantes purificadas.....	38
Figura 6.1. Ensayo de unión de péptidos de la proteína PE_PGRS33 a moléculas MHC-I.....	48
Figura 6.2. Respuesta de anticuerpos IgG contra la proteína PE_PGRS33 y sus dominios.....	49
Figura 6.3. Respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG2a contra la proteína PE_PGRS33 y sus dominios.....	51
Figura 6.4. Proliferación antígeno-específica de células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en ratones...	52
Figura 6.5. Secreción de IFN- γ en respuesta al estímulo con los antígenos en ratones...	53
Figura 6.6. Respuesta de IFN- γ a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en LTBI y en individuos no infectados.....	56
Figura 6.7. Respuesta inmune humoral a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en humanos.....	57
Tabla 6.1. Respondedores a la proteína PE_PGRS33 completa en individuos LTBI y no infectados.....	55

RESUMEN

La proteína PE_PGRS33 es miembro de la familia PE, la cual incluye las subfamilias PE y PE_PGRS. Entre las PE_PGRS esta proteína es uno de los antígenos más estudiados y se ha comprobado que cada uno de sus dominios, el PE y el PGRS, juega diferentes roles en las propiedades biológicas atribuidas a la proteína completa. Sin embargo, la contribución de tales dominios al reconocimiento inmune de la proteína PE_PGRS33 y su papel potencial en la infección tuberculosa latente en humanos es aún desconocida. En este estudio, las propiedades inmunogénicas de la proteína PE_PGRS33 completa y de cada dominio por separado fueron evaluadas en ratones BALB/c inmunizados y en muestras de sangre periférica de individuos infectados latentemente o no con tuberculosis. En ratones, se detectaron niveles similares de anticuerpos contra la PE_PGRS33 y sus dominios, así como una secreción similar de IFN- γ en respuesta a la re-estimulación con tales antígenos. Por el contrario, la PE_PGRS33 y el dominio PE estimularon una mayor proliferación de las células T CD4⁺ y CD8⁺ comparado con el dominio PGRS. El estudio en ratones sugirió que la principal diferencia en la inmunogenicidad de los dominios PE y PGRS radica en la mayor inducción a la proliferación de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ por parte del dominio PE. En humanos, se detectó la secreción de IFN- γ en respuesta a la PE_PGRS33 tanto en individuos latentemente infectados como en no infectados. Se demostró la presencia de anticuerpos contra la proteína completa en individuos latentemente infectados y en no infectados, la cual tuvo como blanco el dominio PGRS y no el dominio PE. Tales observaciones sugieren que las respuestas de células T y B a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios son inducidas por la vacunación con BCG y que pueden ser mantenidas por muchos años en humanos no infectados. También se concluye que la respuesta de IFN- γ detectada contra este antígeno no se asocia con infección latente por *M. tuberculosis*. Los resultados reportados en este trabajo contribuyen a la elucidación del papel de la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en la respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

The PE_PGRS33 protein is a member of the PE family, which encompasses the PE and the PE_PGRS subfamilies. Among PE_PGRS's, this protein is one of the most studied antigens and its immunomodulatory properties are influenced by both PE and PGRS domains. However, the contribution of these domains to the host immune recognition of the PE_PGRS33 protein and their potential role in latent tuberculosis infection in humans is still unknown. In this study, the immunogenic properties of the complete PE_PGRS33 protein and each domain were evaluated in BALB/c mice and in blood samples from latent tuberculosis infected (LTBI) and non infected humans. In mice, PE_PGRS33 and its domains induced similar antibody production and secretion of IFN- γ . PE_PGRS33. The PE domain stimulated higher CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation compared to the PGRS domain. The findings in mice suggested that the principal difference in the PE and PGRS domain's immunogenicity is the higher activation of CD4⁺ and CD8⁺ sub-populations by the PE domain. In humans, the secretion of IFN- γ in response to PE_PGRS33 was detected in both LTBI and in non-infected vaccinated individuals. It was observed antibody response in LTBI and in non-infected vaccinated individuals, this response targets epitopes located in the PGRS domain but not in the PE domain. These observations in humans suggest that T and B cell responses to PE_PGRS33 are induced by BCG vaccination and can be maintained for many years in non-infected individuals. This also indicates that the IFN- γ response detected might not be associated with latent tuberculosis infection. These results contribute to the elucidation of the role of the PE_PGRS33 protein and its PE and PGRS domains in the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*.

1. INTRODUCCION

1.1. La tuberculosis

La tuberculosis (TB) es la segunda causa mundial de mortalidad, después del SIDA, ocasionada por un agente infeccioso; siendo esta enfermedad responsable de 1.5 millones de muertes en el 2013 alrededor del mundo (WHO Global tuberculosis report, 2014). La incidencia de tuberculosis (nuevos casos detectados) durante el 2013 fue de 9 millones de casos, los cuales se ubican principalmente en Asia y regiones del Pacífico Occidental (56%) y en África (25%). En México, la incidencia en el mismo año fue de 18-23 casos por 100.000 habitantes (WHO Global tuberculosis report, 2014). Un estimado de 1.1 millones (13%) de los 9 millones de personas que desarrollaron tuberculosis en el 2013 se encontraban también infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). La co-infección TB-VIH incrementa la morbilidad y mortalidad de los pacientes con TB activa. La TB es más común en hombres que en mujeres y afecta principalmente a adultos en la edad económicamente más productiva. A pesar de que la incidencia y la mortalidad por TB han disminuido lentamente cada año, el número de muertes que ocasiona es aún muy alto; por lo cual se continúa haciendo un gran esfuerzo por combatir dicha enfermedad (WHO Global tuberculosis report, 2014).

La tuberculosis afecta primariamente el sistema respiratorio (tuberculosis pulmonar) y es caracterizada por tos crónica productiva, fiebre baja, sudores nocturnos y pérdida de peso (McMurray DN, 1996). La enfermedad puede afectar también otros órganos (tuberculosis

extrapulmonar), siendo las localizaciones más comunes la pleural, ósea, ganglionar y el sistema nervioso central (Pacheco MC et al., 2013).

El agente causal de la tuberculosis es el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), reportado por primera vez por Robert Koch. Es miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, conformado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microtii*; todos patógenos para diferentes hospederos. Las micobacterias son bacilos aerobios curvos, con un alto contenido de lípidos en pared celular lo cual le confiere su característica ácido-alcohol resistencia en la tinción de Ziehl-Neelsen. Presenta tiempos de duplicación de 18 a 24 horas y los aislamientos clínicos pueden requerir de 4 a 6 semanas para crecer (McMurray DN, 1996).

La única vacuna aprobada contra la tuberculosis es el bacilo Calmette-Guérin (BCG) la cual es una cepa atenuada de *M. bovis* desarrollada hace más de 100 años (Russell DG, 2011). Es usada en países con tuberculosis endémica dado que protege contra formas más severas de la enfermedad, tales como la tuberculosis meníngea o diseminada; sin embargo su eficacia disminuye en 10 a 15 años y por lo tanto no previene la aparición de TB pulmonar en la edad adulta en el tercer mundo (Brandt L et al., 2002). La eficacia de la vacunación con BCG en la protección contra la TB pulmonar se ha comprobado en países como el Reino Unido pero ha sido muy baja o nula en otros, como la India y algunos países africanos (Black GF et al., 2002; Verma I., Grover A, 2009; Brandt L et al., 2002). La hipótesis más ampliamente aceptada atribuye esta variación a la interacción de la vacuna con micobacterias presentes en el ambiente. La exposición previa a micobacterias ambientales induce una amplia respuesta inmune que rápidamente inhibe la multiplicación de la BCG aplicada en la vacunación. Solo BCG vivas secretan muchos

antígenos de importancia para la inducción de una respuesta inmune protectora. Por lo tanto, el mecanismo descrito podría explicar la baja protección de la vacuna BCG en regiones tropicales como África e India, donde la exposición a micobacterias ambientales es común (Brandt L et al., 2002). Las nuevas estrategias de vacunación incluyen la creación de cepas recombinantes de BCG que sobre-expresen antígenos de *M. tuberculosis* altamente inmunogénicos, cepas atenuadas de *M. tuberculosis* a las que se les han suprimido vías metabólicas requeridas para su supervivencia o determinantes de virulencia. Debido a que la respuesta inmune a estas cepas recombinantes estaría sujeta a los mismos factores ambientales que reducen la efectividad de la BCG en humanos, se han propuesto estrategias como la aplicación de un refuerzo en la adolescencia usando vectores virales que codifiquen antígenos de *M. tuberculosis* o subunidades proteicas (Russell DG et al., 2010).

1.1.1 Patogénesis de la tuberculosis pulmonar

El bacilo tuberculoso es transmitido a través de la inhalación de aerosoles generados cuando una persona que padece la enfermedad tose. Dichos aerosoles alcanzan el pulmón donde las bacterias son fagocitadas por macrófagos alveolares que invaden luego la capa epitelial. La inflamación resultante atrae neutrófilos, monocitos y más macrófagos, los cuales forman el estado inicial de formación del granuloma. Los macrófagos se diferencian en tipos celulares especializados tales como células gigantes multinucleadas, macrófagos espumosos y macrófagos epitelioides. Cuando se desarrolla la inmunidad adquirida los linfocitos son atraídos hacia el lugar de la infección, rodeando el grupo de macrófagos y dándole al granuloma una estructura más organizada (Russell DG et al., 2010).

La aparición de linfocitos T y B específicos para *M. tuberculosis* lleva a la fase de contención de la multiplicación bacteriana (Russell DG et al., 2010). El granuloma consiste ahora en macrófagos infectados y células gigantes espumosas rodeadas por células T de memoria central y células B. Aunque el hospedero falle en erradicar el patógeno, la multiplicación y diseminación de la micobacteria son prevenidas (Walzl G et al., 2011). Este estado se denomina infección latente por *M. tuberculosis* (LTBI, *del inglés* Latent tuberculosis infection) y puede durar toda la vida de la persona. Se estima que un tercio de la población mundial porta tales bacilos persistentes y que aproximadamente un 10% de los individuos con LTBI desarrollan infección activa en el transcurso de su vida (Corbett EL et al., 2003).

La tuberculosis activa es la enfermedad sintomática causada por la infección con *M. tuberculosis*. Puede surgir por la reactivación de la tuberculosis latente, en caso de que el sistema inmunológico de la persona se debilite o por una recaída después de poca adherencia del paciente al tratamiento (Walzl G et al., 2011).

1.1.2 Respuesta inmune a la tuberculosis

El macrófago es el principal reservorio de *M. tuberculosis*, al cual ingresa la bacteria por fagocitosis mediada por receptores y permanece al interior de la vacuola fagocítica (Pieters J, 2001). El macrófago infectado inicia la producción de Interleucina-12 (IL-12) e IL-18 y presenta antígenos micobacterianos en el contexto de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC-II) a células T CD4⁺. Se establece entonces una respuesta de tipo Th1 (*del inglés* T helper cell type 1), donde las células T CD4⁺ secretan Interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), las cuales activan a los macrófagos para que produzcan Oxido Nítrico, un fuerte metabolito microbicida

(MacMicking JD et al. 1997, Flynn JL 2011). De igual forma, el IFN- γ eleva la expresión de MHC II en los macrófagos; con ello se incrementa la presentación de antígenos a las células T (Gehring AJ et al., 2003).

Además de las células T CD4⁺, se ha descubierto que las células T CD8⁺ juegan un papel importante en el control de la infección por *M. tuberculosis*, sobre todo durante la fase latente de la misma. Las células T CD8⁺ pueden producir citocinas como IFN- γ y de igual forma activar macrófagos para eliminar la micobacteria vía Oxido Nítrico. También pueden actuar como células citolíticas (CTLs) para lisar macrófagos infectados; una de las formas puede ser por el sistema Fas- Ligando de Fas, donde la bacteria liberada será posteriormente captada por macrófagos más capacitados para su destrucción. La otra forma de lisis directa es mediada por la liberación de perforinas a partir de la CTL, dicha proteína se intercala en la membrana celular y permite el ingreso de una segunda proteína: la granulisina. El resultado es destrucción del macrófago por los poros que causan las perforinas y lisis de la bacteria por acción de la granulisina (Flynn JL & Ernst JD, 2000).

Teniendo en cuenta que *M. tuberculosis* se encuentra confinado en los fagosomas de la célula hospedera ha sido intrigante determinar la vía por la cual antígenos micobacterianos alcanzan las moléculas del MHC-I y son posteriormente presentados a las células T CD8⁺. Una hipótesis reciente postula que la infección de macrófagos por *M. tuberculosis* induce la apoptosis en dicha célula, causando la liberación de vesículas apoptóticas cargadas de antígenos micobacterianos. Dichas vesículas son posteriormente fagocitadas por células dendríticas no infectadas, donde los antígenos captados son procesados y presentados vía MHC-I y CD1 a las células T CD8⁺ (Winau F et al., 2004).

Los macrófagos deben ser desactivados con el fin de que no induzcan un daño tisular excesivo después de la contención de la infección, esta función se encuentra a cargo de las citocinas IL-10 y TGF- β . IL-10 es producida por macrófagos y células T; su función es disminuir la expresión de IL-12, con lo que a su vez bloquea la secreción de IFN- γ y TNF- α desactivando así al macrófago. TGF- β es producida por monocitos e inhibe la producción de la sintetasa 2 de óxido nítrico (NOS2) por IFN- γ en los macrófagos, interfiriendo con su actividad antimicobacteriana (Flynn JL & Chan J, 2001).

Los mecanismos efectores de células T, más que los anticuerpos, son requeridos para eliminar la micobacteria (Flynn JL & Chan J, 2001). Sin embargo en estudios experimentales usando ratones deficientes en células B y ratones con deficiencia inmune severa combinada a los cuales se les aplicaban anticuerpos contra antígenos micobacterianos, se demostró que existe sinergia e interdependencia entre la inmunidad humoral y la inmunidad mediada por células (Abebe F & Bjune G, 2009). Ha sido reportado también que la respuesta humoral contra ciertos antígenos se asocia con diferentes estadios clínicos de la infección tuberculosa (Koh KW et al., 2009). Por tales razones continúa siendo importante el estudio de antígenos que pudieran estimular la respuesta de anticuerpos, para su uso como herramienta diagnóstica o como vacunas inductoras de la respuesta inmune humoral (Abebe F & Bjune G, 2009. Koh KW et al., 2009).

1.1.3 Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis

El método más usado para el diagnóstico de la tuberculosis activa es la detección por microscopía de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en el esputo de la persona

enferma usando la técnica de Ziehl Neelsen. Esta prueba tiene una sensibilidad del 34 al 80%, siendo negativa en casos con 10.000 bacilos por ml de esputo (Walzl G et al., 2011). La sensibilidad ha sido incrementada con el análisis de tres muestras de esputo consecutivas en los casos con evidencia clínica de la enfermedad (Guía de práctica clínica, Secretaría de Salud de México, 2009).

El cultivo del esputo permite confirmar la presencia de *M. tuberculosis*, sin embargo toma al menos dos semanas contar con los resultados y los países con mayor incidencia no cuentan con los laboratorios adecuados para realizarlo (Walzl G et al., 2011). En algunos casos es difícil obtener una muestra de esputo para estos estudios, especialmente en los niños; por lo que se ha empleado la nebulización con solución salina hipertónica para promover la expectoración (Guía de práctica clínica, Secretaría de Salud de México, 2009).

Para el diagnóstico de la tuberculosis latente se ha empleado por más de un siglo la prueba cutánea de la tuberculina o PPD, la cual consiste en la inyección intradérmica de proteínas purificadas derivadas de *M. tuberculosis* y medición de la hipersensibilidad de tipo retardado (Walzl G et al., 2011). Este método no puede diferenciar entre tuberculosis latente, sensibilización con micobacterias ambientales o vacunación con BCG.

Hace una década se desarrollaron los ensayos de liberación de IFN- γ (IGRAs, *del inglés* IFN- γ release assays). Dichos ensayos miden la secreción de IFN- γ *in vitro* después de la incubación de sangre total o células mononucleares de sangre periférica con antígenos inmunodominantes y específicos de *M. tuberculosis*, tales como ESAT-6 (*del inglés* 6 kDa early secretory antigenic target), CFP-10 (*del inglés* 10 kDa culture filtrate antigen) y TB 7.7 (Walzl G et al., 2011). Estos ensayos se han convertido en la prueba estándar para diagnosticar la sensibilización con *M. tuberculosis* (Ferrara G et al., 2009).

La tuberculosis conlleva a una alta tasa de mortalidad cuando no se instaure un tratamiento. En estudios acerca de la historia natural de la TB pulmonar, aproximadamente el 70% de los pacientes con prueba de esputo positiva para la presencia de Bacilos Acido Alcohol resistentes (BAAR)/HIV negativos, murieron en un lapso de 10 años cuando no se administró tratamiento (Tiemersma EW et al., 2011).

El tratamiento de primera línea para los pacientes con tuberculosis incluye los antibióticos rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol; los cuales deben ser administrados al paciente durante 9 meses. Dicha terapia es eficaz, sin embargo presenta varias limitaciones tales como la falta de adherencia de los pacientes al régimen completo lo cual conlleva a la selección de cepas resistentes a múltiples fármacos. La tuberculosis multidrogoresistente (TB MDR) se define como la resistencia a rifampicina e isoniazida (los antibióticos más potentes contra la TB). El tratamiento para los pacientes con TB MDR es largo y requiere del uso de antibióticos más tóxicos y costosos que los de primera línea (WHO Global tuberculosis report, 2014).

La efectividad de la terapia también depende de una adecuada infraestructura de salud pública, la cual no existe en los países con mayor incidencia de la enfermedad (Russell DG, 2011).

El control adecuado de la tuberculosis sólo podría ser alcanzado a través del desarrollo de nuevas vacunas, mejores métodos diagnósticos y regímenes terapéuticos novedosos y acortados (Abu-Raddad LJ et al., 2009).

1.2. Familia de genes PE de *Mycobacterium tuberculosis*

La secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv reveló la existencia de una familia compuesta por casi 100 genes distribuidos por todo el genoma, los cuales codifican proteínas con una significativa homología en los primeros 110 aminoácidos aproximadamente. Dichas proteínas han recibido el nombre de PE, dada la conservación de los residuos prolina y glutámico en las posiciones 8 y 9 cercanas al extremo amino terminal de la secuencia (Cole ST et al., 1998). La familia PE puede subdividirse en dos subfamilias (**Figura 1.1**). La más grande de éstas se compone de 61 miembros PE-PGRS, los cuales contienen el dominio PE (secuencia homóloga) seguido por el dominio PGRS (*de la sigla en inglés* Polymorphic GC-rich Repetitive Sequence). Este último dominio varía en tamaño entre los miembros de la subfamilia y es rico en motivos repetitivos glicina-glicina-alanina (Gli-Gli-Ala) (Cole ST et al., 1998). La subfamilia PE está compuesta por 38 miembros, que en muchos casos están formados sólo por el dominio PE y en otros es seguido por una región carboxilo terminal que comparte muy poca similitud de secuencia (Cole ST et al., 1998).



Figura 1.1. Clasificación de los miembros de la familia de proteínas PE. Adaptado de Cole ST et al., 1998.

Hasta ahora, la similitud de secuencia con genes no micobacterianos se encuentra restringida a proteínas ricas en glicina, incluyendo el antígeno EBNA-1 del virus Epstein Barr, que muestra una significativa similitud con el dominio PGRS de las proteínas PE-PGRS (Brennan, MJ & Delogu G, 2002). EBNA 1 contiene numerosas repeticiones Gli-Ala (la fuente de la homología) que inhiben el procesamiento proteosomal y presentación de EBNA 1 a través del MHC-I, impidiendo el reconocimiento y destrucción de las células infectadas con el virus por parte de los linfocitos T CD8⁺ (Levitskaya J et al., 1995). Dentro de las repeticiones Gli-Ala que pueden dar lugar a esta interferencia con la vía ubiquitina-proteosoma, se ha identificado una, AGGAGGAG (Sharipo A et al., 2001), la cual se encuentra presente en 41 miembros de la familia PE-PGRS; en algunos de ellos, hasta 6 veces dentro del dominio PGRS.

1.2.1 Proteínas PE_PGRS

Una característica relevante de los genes *pe_pgrs* en cepas clínicas de *M. tuberculosis* es la alta variabilidad en su secuencia (McEvoy CR et al., 2012; Talarico S et al., 2005; Talarico S et al 2008; Wang J et al., 2011). La expresión genética en algunos miembros de las PE_PGRS es también variable entre diferentes cepas clínicas (Flores J & Espitia C, 2003; Gao Q, 2005). Los mencionados estudios indican que las proteínas PE_PGRS son una fuente importante de polimorfismo en *M. tuberculosis*.

Algunas proteínas PE-PGRS se localizan en la pared celular de las micobacterias, donde pueden interactuar con el sistema inmune del hospedero (Brennan MJ et al., 2001; Delogu G et al., 2004; Banu S et al., 2002). Al respecto, se han hallado anticuerpos contra la PE_PGRS51, PE_PGRS62, PE_PGRS33 y el dominio PGRS de la Wag 22 (Rv1759c^{PE-PGRS}) en

el suero de pacientes con tuberculosis o durante la tuberculosis experimental en ratones (Espitia C et al., 1999; Singh KK et al., 2001; Koh KW et al., 2009; Delogu G & Brennan MJ, 2001). Varias PE_PGRS inducen respuestas de células T en humanos y son reconocidas por moléculas MHC-I restringidas a células T CD8⁺ en ratones (Chaitra MG et al., 2007; Chaitra MG et al., 2008). Estos hallazgos indican que muchos miembros de la subfamilia PE_PGRS son inmunogénicos.

La alta inmunogenicidad y naturaleza polimórfica de las PE_PGRS indican que dichas proteínas podrían estar involucradas en variación antigénica y/o en escape del sistema inmune (Banu S et al., 2002).

No se ha dilucidado el papel exacto que las PE_PGRS juegan en la biología de las micobacterias, sin embargo las especies de rápido crecimiento-no patógenas carecen o poseen muy pocos genes *pe_pgrs* (Poulet S & Cole ST, 1995). Ciertas PE-PGRS influyen en interacciones con otras micobacterias, así como con macrófagos (Brennan MJ et al., 2001) y proteínas de la matriz extracelular del hospedero tales como la fibronectina (Espitia C et al., 1999). Todo lo anterior sugiere que éstas proteínas son importantes en la patogénesis de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

1.2.1.1 Proteínas PE_PGRS y latencia

Durante la infección tuberculosa latente (LTBI) el bacilo permanece por años en un estado durmiente en el interior de los tejidos del hospedero, siendo controlado pero también influenciando la respuesta inmune que establece y mantiene la latencia. Esto lo haría a través de la expresión en superficie y/o secreción de ciertos antígenos (Parrish NM et al., 1998; Campuzano J et al., 2007).

Los siguientes estudios sugieren que algunas proteínas PE_PGRS podrían jugar un papel en la infección tuberculosa latente. Mutantes de *Mycobacterium marinum* en tres genes *pe_pgrs* fueron incapaces de replicarse en el interior de los macrófagos y mostraron una persistencia disminuida en granulomas (Ramakrishnan L et al., 2000). La proteína PE_PGRS33 estimula la producción de TNF- α (Basu S et al., 2007), una de las citocinas involucradas en la inducción y mantenimiento de la tuberculosis latente en modelos animales (Flynn JL et al., 1998; Arriaga AK et al., 2002). Cepas clínicas de *M. tuberculosis* que portan grandes variaciones genéticas en el *rv1818c* (gen codificante para la PE_PGRS33) han sido asociadas con ausencia de cavitaciones en los pulmones, sugiriendo que la proteína PE_PGRS33 podría estar influenciando la organización del granuloma o jugando un papel importante en el establecimiento y/o mantenimiento de la infección latente (Talarico S et al., 2007). Adicionalmente se sugirió que el antígeno Rv1759c^{PE_PGRS} participa en la generación de la respuesta inmune que mantiene la infección latente en un modelo murino de tuberculosis crónica (Campuzano J et al., 2007).

Por lo tanto, una de las funciones que ha sido sugerida para algunas proteínas PE_PGRS es permitir al bacilo persistir en su hospedero. Sin embargo, se desconoce si individuos con infección latente por *M. tuberculosis* muestran respuesta inmune contra las PE_PGRS y si este reconocimiento pudiera ser diferente hacia el dominio PE y PGRS.

La identificación como inmunógenos de antígenos secretados por el bacilo durante la latencia en seres humanos es importante ya que éstos podrían ser usados como marcadores inmunológicos de esta etapa de la infección o para el desarrollo de vacunas (Shuck SD et al., 2009; Campuzano J et al., 2007). La incorporación de antígenos asociados a la latencia a vacunas de subunidades que se aplicarían como refuerzo años después de la

vacunación con BCG, podría actuar como vacuna post-exposición para la prevención de la reactivación de la TB latente (Singh S et al., 2014).

1.2.1.2 La proteína PE_PGRS33

El gen *rv1818c* codifica la proteína PE_PGRS33 y es considerado un miembro típico de la subfamilia PE_PGRS por varias razones: Muestra un alto grado de homología con otros genes *pe_pgrs* de tamaño similar (Delogu G & Brennan MJ, 2001); codifica para una proteína con un alto contenido en glicina (41%) y alanina (20%), como el encontrado en las repeticiones próximas al C-terminal de la mayoría de las PE_PGRS y la proteína tiene un tamaño de 499 aa, muy cercano al promedio de las PE_PGRS el cual es de 550 aminoácidos (Cole ST et al., 1998).

Adicionalmente, en uno de los primeros estudios relacionados con las PE_PGRS se encontró que una mutación en un gen de *M. bovis* BCG homólogo al *rv1818c* generaba en tal micobacteria un crecimiento disperso en medio líquido e infección reducida en los macrófagos. Este hallazgo sugirió que la proteína codificada por este gen es importante para la interacción con otras micobacterias y con células del hospedero (Brennan MJ et al., 2001). Posiblemente por tales razones, la proteína PE_PGRS33 ha sido la más estudiada y de la cual se ha obtenido la mayor cantidad de información relacionada con las PE_PGRS.

El gen *rv1818* es expresado durante el crecimiento de la micobacteria en medio líquido (Brennan MJ et al., 2001), durante la infección en modelos murinos de tuberculosis pulmonar (Delogu G & Brennan MJ 2001), así como en diferentes regiones del pulmón durante la tuberculosis en humanos (Rachman H et al., 2006).

La proteína PE_PGRS33 se localiza en la membrana externa de la pared celular de la micobacteria, a la cual se encuentra débilmente asociada (Cascioferro A et al., 2007). Esto significaría que perturbaciones a la pared celular como las que ocurren al encuentro con las defensas antibacterianas del sistema inmune llevarían a la liberación de la PE_PGRS33 y su interacción con componentes del hospedero (Dheenadhayalan V et al., 2006; Basu S et al., 2007; Cascioferro A et al., 2007).

Se ha sugerido que la PE_PGRS33 juega un papel importante y probablemente no redundante en la patogénesis de *M. tuberculosis* (Talarico S et al., 2007). La expresión del *rv1818c* en *M. smegmatis* le confirió a esta micobacteria no patógena la capacidad de sobrevivir mejor en cultivos de macrófagos e incrementó sustancialmente su persistencia en tejidos del hospedero (Dheenadhayalan V et al., 2006). La secuenciación del gen *rv1818c* en 639 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* evidenció que algunos de ellos contenían grandes inserciones, deleciones o mutaciones de cambio de marco abierto de lectura que resultarían en modificaciones significativas en la proteína PE_PGR33. La asociación de estos cambios con la ausencia de cavitación y el agrupamiento de casos de tuberculosis permitió establecer una posible participación de la proteína PE_PGRS33 en el establecimiento o mantenimiento de la infección latente, como fue arriba mencionado (Talarico S et al., 2007). En este estudio también se hizo evidente que variaciones en la secuencia del gen *rv1818c* tenían un impacto en las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con tuberculosis (Talarico S et al., 2007).

La proteína PE_PGRS33 induce apoptosis y necrosis en células del hospedero (Dheenadhayalan V et al., 2006; Cadieux N et al., 2011; Balaji KN et al., 2007; Basu S et al., 2007). Dicha proteína induce la secreción de TNF- α al interactuar con el TLR-2 y

desencadena una cascada de señalización mitocondrial que conlleva a apoptosis (Basu S et al., 2007). La proteína PE_PGRS33 puede interactuar directamente con la mitocondria y desencadenar necrosis primaria, además de la apoptosis. (Cadieux N et al., 2011).

La respuesta inmune generada contra la proteína PE_PGRS33 ha sido parcialmente caracterizada (Delogu G & Brennan MJ, 2001; Chaitra MG et al., 2007). En ratones C57BL6 inmunizados con el gen *rv1818c* y en ratones infectados con *M. tuberculosis* se generan anticuerpos que reconocen la proteína completa purificada (Delogu G & Brennan MJ, 2001). Al inmunizar ratones BALB/C con el gen *rv1818c* se indujo una fuerte respuesta de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Chaitra MG et al., 2007). Se desconoce sin embargo si hay otras poblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune celular a esta proteína.

1.2.1.3 Dominios PE y PGRS de la proteína PE_PGRS33

Desde la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv se observaron diferencias entre el dominio PE y PGRS de los 61 miembros de la subfamilia PE_PGRS. El dominio PE tiene un tamaño relativamente constante (110 aminoácidos) y alto grado de homología (Cole ST et al., 1998). El dominio PGRS varía en tamaño (100 a 1400 aminoácidos), secuencia y en el número de repeticiones Gli-Gli-Ala o Gli- Gli- Asn (Cole ST et al., 1998).

El dominio PE de la proteína PE_PGRS33 contiene la información necesaria para la localización de la proteína completa en la pared celular bacteriana (Cascioferro A et al., 2007), parece estar involucrado en la inducción de necrosis (Cadieux N et al., 2011) y mutaciones experimentales en dicho dominio afectan las propiedades pro-inflamatorias de la proteína PE_PGRS33 (Zumbo A et al., 2013). Dicho dominio es altamente conservado en secuencia entre aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (Talarico S et al., 2005). Por otra

parte, el dominio PGRS es capaz de dirigir la proteína PE_PGRS33 a la mitocondria produciendo apoptosis celular (Cadieux N et al., 2011). Este dominio media la interacción con TLR 2-activando la cascada de señalización inductora de apoptosis (Basu S et al., 2007). Deleciones en este dominio modulan la secreción de TNF- α inducida por la proteína PE_PGRS33 (Basu S et al., 2007). El dominio PGRS exhibe las mayores variaciones de secuencia en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (Talarico S et al., 2005).

Brennan y Delogu compararon la inmunogenicidad de la proteína PE_PGRS33 con la del dominio PE al vacunar ratones con las respectivas secuencias de DNA. Fue reportado que el dominio PE, pero no la proteína completa inducía la respuesta inmune celular. Por el contrario, el dominio PE no indujo la respuesta inmune humoral, como si lo hizo la proteína completa (Delogu G & Brennan MJ, 2001). En este trabajo la contribución del dominio PGRS a la respuesta inmune generada por la PE_PGRS33 fue inferido a partir del estudio de la proteína completa y del dominio PE. (Delogu G & Brennan MJ, 2001). Hasta ahora, la inmunogenicidad del dominio PGRS no ha sido directamente ensayada, sino inferida a partir del estudio de la inmunogenicidad de la proteína completa y el dominio PE.

2. JUSTIFICACION

Los dominios PE y PGRS que conforman la proteína PE_PGRS33 muestran diferencias llamativas en composición de aminoácidos (Cole ST et al., 1998), conservación de secuencia entre especies de *M. tuberculosis* (Talarico S et al., 2005) y papel biológico (Cascioferro A et al., 2007; Talarico S et al., 2007; Cadieux N et al., 2011, Zumbo A et al., 2013; Basu S et al., 2007). Con respecto a la inmunogenicidad de la proteína PE_PGRS33 y su dominio PE, fue reportado que este dominio, pero no la proteína completa inducía respuesta inmune celular en ratones vacunados con el gen *rv1818c*. Por el contrario, el dominio PE no indujo una respuesta inmune humoral, como si lo hizo la PE_PGRS33 completa (Delogu G & Brennan MJ., 2001). Esto planteaba la posibilidad de que el dominio PGRS estuviera inhibiendo la presentación y/o procesamiento de la proteína completa, como lo hace el antígeno EBNA-1 del virus Epstein Barr (Brennan MJ & Delogu G, 2002; Levitskaya J et al., 1995).

Sin embargo, en nuestro grupo fue determinado que varias PE_PGRS poseen epítopes que de acuerdo a la predicción, tienen elevada afinidad de unión por moléculas MHC-I (Presente trabajo). Dichos epítopes se encuentran en el dominio PE y en el dominio PGRS, lo cual abría la posibilidad de que ambos dominios indujeran una respuesta inmune mediada por células T CD8⁺. Por tanto, se planteó determinar si los dominios PE y PGRS están involucrados en la respuesta inmune celular y humoral inducida por la proteína completa. De esta forma se estudiaría directamente la inmunogenicidad del dominio PGRS sin inferirla a partir del estudio de la proteína completa y el dominio PE, como había ocurrido en estudios anteriores.

Considerando que los modelos de ratón han proporcionado gran cantidad de información sobre las interacciones funcionales e inmunológicas entre el hospedero y proteínas de *M. tuberculosis*, se decidió llevar a cabo la primera parte del estudio en ratones BALB/c.

Adicionalmente, una de las funciones que ha sido sugerida para algunas proteínas PE_PGRS es permitir al bacilo persistir en su hospedero. Sin embargo, se desconoce si seres humanos con infección latente por *M. tuberculosis* muestran respuesta inmune contra las PE_PGRS y si este reconocimiento pudiera ser diferente hacia el dominio PE y PGRS. Para clarificar este segundo punto, el estudio fue extendido a individuos con infección tuberculosa latente e individuos no infectados, en los cuales la secreción de IFN- γ en respuesta a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios y los niveles de anticuerpos específicos para esta proteína fueron evaluados.

La identificación como inmunógenos de antígenos que podrían estar siendo secretados por el bacilo durante la latencia en seres humanos es importante ya que éstos podrían ser usados como marcadores inmunológicos de esta etapa de la infección o empleados en el desarrollo de vacunas que refuercen el sistema inmune en dicho estadio (Schuck SD et al., 2009; Campuzano J et al., 2007; Singh S et al., 2014).

3. HIPOTESIS

- ◆ La inmunización con la proteína PE_PGRS33 induce la respuesta inmune, tanto celular como humoral contra los dominios PE y PGRS que constituyen dicha proteína.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la respuesta inmune generada contra la proteína PE_PGRS33 así como contra cada uno de sus dominios PE y PGRS por separado en ratones inmunizados y en humanos con y sin infección latente por *M. tuberculosis*.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ◆ Identificar posibles epítopes peptídicos en las proteínas PE_PGRS reconocidos por linfocitos T CD8⁺.
- ◆ Estudiar la respuesta inmune de tipo celular contra la proteína PE_PGRS33 completa, y sus dominios PE y PGRS en los ratones inmunizados.
- ◆ Evaluar la respuesta inmune humoral contra la proteína PE_PGRS33 completa, y sus dominios PE y PGRS en los ratones inmunizados.
- ◆ Determinar la presencia de respuesta celular a la proteína PE_PGRS33 en individuos con tuberculosis latente y en individuos no infectados
- ◆ Evaluar la respuesta celular a los dominios PE y PGRS en individuos con tuberculosis latente y en individuos no infectados.
- ◆ Estudiar la respuesta inmune humoral contra la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en individuos con tuberculosis latente y en individuos no infectados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Identificación de epítopes MHC-I en las PE_PGRS.

5.1.1 Predicción de epítopes de unión a MHC-I.

Como primer paso se llevó a cabo la búsqueda de epítopes en las PE_PGRS que pudiesen ser presentados a las células T CD8⁺. Para este fin, las secuencias de aminoácidos de los dominios PE y PGRS de tales proteínas se sometieron a un análisis empleando dos bases de datos. En la primera predicción se usó el programa SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>), el cual asigna puntuaciones de acuerdo a la presencia de aminoácidos de anclaje a motivos presentes en moléculas K^b y D^b (Rammensee H et al., 1999). Se realizó una segunda predicción usando el programa BIMAS (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/), el cual identifica péptidos que contienen epítopes de unión a MHC-I H2-D^b y H2-K^b basado en el tiempo medio de disociación de la β2 microglobulina (Parker et al., 1994).

De acuerdo a la predicción efectuada por tales programas se encontraron dos péptidos en la región PE con alta afinidad de unión por moléculas MHC-I K^b. Se detectó también un péptido en la región PGRS con alta afinidad por MHC-D^b. Dichos péptidos fueron sintetizados químicamente (Washington Biotechnology Inc., Baltimore, MD) y posteriormente purificados por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) a un nivel de pureza de más del 94%.

5.1.2. Ensayo de unión de péptidos a moléculas MHC-I

El siguiente paso consistió en usar un ensayo de unión cuantitativo para señalar la probabilidad experimental de que tales péptidos se uniesen a moléculas MHC-I. Para probar la habilidad de unión de los péptidos escogidos a moléculas K^b y D^b, se usó la línea celular de ratones RMA-S, la cual es deficiente en el transportador asociado con procesamiento de antígenos tipo 2 (TAP). Dichas células exportan a la superficie MHC-I vacíos que decaen rápidamente, pero que se estabilizan y son reconocidos por un anticuerpo anti-MHC-I cuando se unen con afinidad a un péptido presente en el medio extracelular.

La línea celular RMA-S se cultivó con 200µM y 1mM de cada péptido, previamente solubilizado en DMSO al 10%, durante 12 horas a 37°C. Como referencia de unión positiva a K^b se empleó el péptido de la ovoalbúmina del aminoácido 257 al 264 (OVA₂₅₇₋₂₆₄). Pasado tal tiempo se realizaron lavados con Buffer fosfato salino (PBS 1X) y las células fueron independientemente teñidas a 4°C con anticuerpos monoclonales contra K^b (Y3; Ozato K, 1981), D^b (28-14-8S; ATCC HB-27) y K^d (SD1-1.1.1; ATCC HB-159), éste último se usó como control de isotipo. Después de lavar nuevamente con PBS se incubaron las células con anticuerpo IgG anti-ratón hecho en cabra marcado con Isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis, Mo.) y 10.000 células fueron analizadas por citometría de flujo en un FACSort (Becton Dickinson, Mountain View, CA.)

5.2 Preparación de las proteínas recombinantes PE_PGRS33, PE y PGRS.

5.2.1 Clonación de los fragmentos PE y PGRS.

El gen *rv1818c* de *Mycobacterium tuberculosis* clonado en el vector pET15b fue donado por el Dr. Michael Brennan. Dicho gen codifica la proteína PE_PGRS33 y la inserción en el plásmido mencionado adiciona un tallo de histidinas en el extremo carboxilo de la proteína, una vez expresada.

Un fragmento de 1172 pares de bases (del nucleótido 339 al 1494) que contiene la región PGRS del gen *rv1818c* fue amplificado por Reacción en cadena a la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (**Figura 5.1**). Se usó el oligonucleótido sentido 5'-GGAATTCCATATGGGGCGCCCACTGATCGGT-3', el cual contiene un sitio de corte NdeI y el oligonucleótido reverso 5'-ATGGATCCCTACGGTAACCCGTTTCATCCCGTTC-3', el cual contiene un sitio de corte BamHI y un codón de paro. El fragmento NdeI-BamHI fue luego clonado en el vector pET15b (Novagen), con lo cual la proteína una vez expresada, contaría también con un tallo de histidinas en su extremo carboxilo terminal.

La secuencia a partir del nucleótido 1 al 339, que contiene la región PE del gen *rv1818c*, fue amplificada por PCR (**Figura 5.1**). Se empleó el oligonucleótido sentido 5'-CGGGATCCATGTCATTTGTGGTCACGATCC-3', que posee un sitio de corte BamHI y el oligonucleótido reverso 5'-CGGAATTCACAACAGCGCCAGGGCG-3', el cual porta un sitio de corte EcoRI. El fragmento EcoRI-BamHI fue clonado en el plásmido pGEX-4T-2 (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA) para crear una fusión con la secuencia codificante para Glutatión S transferasa (GST).

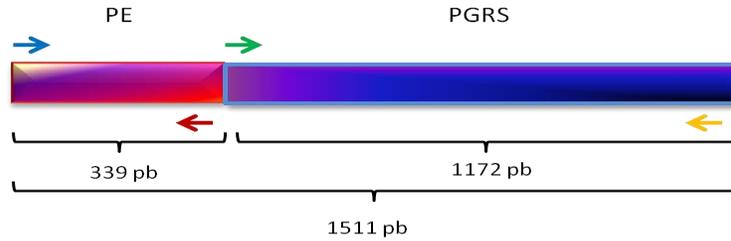


Figura 5.1. Secuencias amplificadas por PCR para obtener los dominios PE y PGRS de la proteína PE_PGRS33.

5.2.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

La proteína PE_PGRS33 y su dominio PGRS fueron expresados en *E. coli* C41 (DE3). La expresión de las proteínas se indujo con Isopropyl β d tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM. A 1 gr de pelet de bacterias se le adicionaron 3 ml de búfer fosfato salino (PBS) adicionado con inhibidor de proteasas libre de EDTA 1X (Complete inhibitor, Roche) y se sonicó 12 minutos totales: 1 min de sonicación, 1 min de descanso; todo el proceso se llevó a cabo manteniendo los tubos en hielo.

Se centrifugó a 10300 g por 30 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó y al pelet se le adicionó PBS 1X/ Tritón X-100 2%. El pelet fue agitado vigorosamente durante 30 segundos y se centrifugó 10300 g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y se repite el lavado con PBS 1X/Tritón X-100 1% y finalmente con PBS; manteniendo el pelet para el siguiente paso. Por cada 1 gr de pelet de cultivo inicial se adicionaron 6 ml de Buffer de solubilización (Na₂HPO₄ 50 mM (pH 8.0), urea 8 M, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM) y se incubó en por 14 horas en movimiento rotatorio a 4°C. El pelet solubilizado se centrifugó a 10300 g por 30 minutos a 4°C; el sobrenadante se separó y las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad a metales en un equipo Akta-Prime (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA) usando una Columna: His-Trap HP (GE

Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA). La cromatografía tuvo 4 pasos de elución: 10, 30, 50 y 100% del buffer de elución (Fosfato de Sodio 50 mM pH 8.0, Cloruro de Sodio 300 mM, Imidazol 500 mM, Urea 8 M), con un flujo de 1 ml/min. Se reunieron las fracciones en las que la proteína apareció pura y se efectuaron diálisis secuenciales, en una proporción de búfer de 100 veces el volumen de la muestra y dejando la diálisis por 12 horas mínimo en cada paso; todo a 4°C. El búfer para la primera diálisis fue Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Urea 6M, para la segunda fue Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Urea 4M, la tercera se realizó con búfer Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Urea 2M y la cuarta con búfer Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM. En éste último permanecieron las proteínas hasta su uso. La cuantificación de las proteínas se realizó por un ensayo de Lowry.

El dominio PE fusionado a la proteína GST fue expresado en *E. coli* BL21 (DE3) e inducido por la adición de IPTG 0.25 mM. Las células bacterianas se cultivaron por centrifugación y se lisaron por sonicación. Los cuerpos de inclusión se disolvieron en Tris-HCl 50mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, urea 8 M, Dithiothreitol (DTT) 1 mM y EDTA 1 mM. El sobrenadante fue dializado contra una solución de Tris-HCl 50mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, y DTT 1 mM, EDTA 1 mM, urea 4M y posteriormente contra una solución Tris-HCl 50mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, y DTT 1 mM, EDTA 1 mM, urea 2M. La diálisis final se llevó a cabo con Tris-HCl 50mM (pH 8.0), NaCl 100 mM, y DTT 1 mM (búfer A). Para la purificación se usó una resina de agarosa-glutati6n (SIGMA), la cual se equilibra adicionando 5 ml de búfer de uni6n (Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 20 µg/ml) por 0.5 ml de resina y dejando 1 hora en movimiento a 4°C. Se centrifuga a 500g, 5 min, 4°C y se descarta el búfer. Los reactivos Trit6n X-100 1%, PMSF 20 µg/ml y EDTA

1mM se adicionaron a la muestra dializada y se incubó en movimiento rotatorio por 30 minutos a 4°C. Esta muestra se adicionó a la matriz de Agarosa-glutación previamente equilibrada (2 ml de muestra por 0.5ml de resina, SIGMA) y se dejó en un tubo de 15 ml de capacidad por 12 horas en movimiento rotatorio a 4°C. Se centrifugó a 500 g por 5 minutos a 4°C y al pellet se le hizo un lavado con 10 ml de Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, PMSF 20 µg/ml, Tritón X-100 0.1% dejando en movimiento por 20 minutos a 4°C. El segundo lavado se efectuó bajo las mismas condiciones pero usando un búfer de Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, DTT 1 mM. La proteína se eluyó adicionando a la matriz 0.5 ml de Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, Glutación reducido 20 mM e incubando por 1 hora y media en movimiento a 4°C. Después de centrifugar a 500 g por 5 minutos, 4°C; se recuperó la muestra. El glutación se removió por diálisis en una proporción de búfer Tris-HCl 50mM (pH 8.0), NaCl 100 mM de 100 veces el volumen de la muestra, dejando la diálisis por 12 horas mínimo a 4°C. La diálisis se repitió bajo las mismas condiciones y la proteína se mantuvo en dicho búfer hasta su uso.

La proteína GST, la cual sería usada como control de la fusión PE-GST, se expresó a partir del plásmido pGEX-4T-2 original. La expresión y purificación se realizó de la manera descrita para la proteína PE fusionada con GST. La cuantificación de las proteínas se realizó por un ensayo de Lowry.

Después del proceso de purificación, las proteínas se cargaron en geles de poliacrilamida al 12% y se realizó electroforesis en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli UK, 1970). Luego se llevó a cabo la transferencia a membranas de nylon- PVDF (del inglés polyvinylidene difluoride, Millipore) y tinción con azul de coomassie. Esto permitía verificar el peso molecular de las proteínas al comparar con un patrón de pesos

moleculares (pesos conocidos en kilodaltons) y determinar la pureza de las mismas (Figura 5.2).

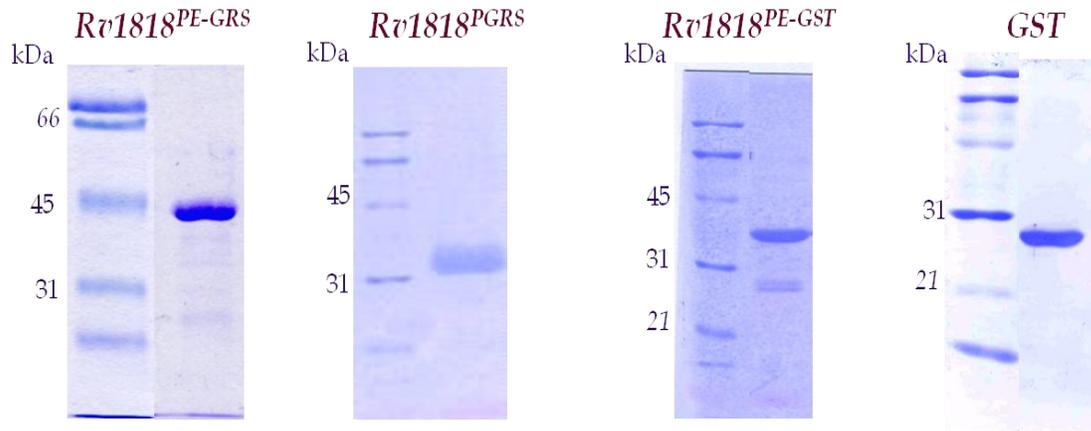


Figura 5.2. Proteínas recombinantes purificadas. Tinción con azul de coomassie.

Las membranas con proteínas fueron usadas también durante los procesos de expresión y purificación para llevar a cabo Western blots. Después de la transferencia a PVDF, las membranas se bloqueaban con PBS-Tween 20 0.05% / albúmina de suero bovino (BSA) 3%, se lavaban con PBS- Tween 20 0.05% y eran incubadas con los anticuerpos. En el caso de las proteínas PE_PGRS33 y PGRS, se incubaban con Anti-histidina (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA) o con un anticuerpo policlonal producido después de inmunizar conejos New Zealand tres veces con la proteína PE_PGRS33 completa. En el caso de la PE-GST y la GST se usó un anticuerpo Anti-GST (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA).

5.3. Ensayos en ratones

5.3.1 Preparación del antígeno para la inmunización

Se cargaron 100 µg de la proteína PE_PGRS33 en un gel de acrilamida/poliacrilamida al 12% y se realizó electroforesis en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli UK, 1970). Se llevó a cabo la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Amersham) y se identificó la proteína con la tinción de Ponceau S. La banda fue escindida de la membrana, desteñida y cortada en piezas diminutas, para posteriormente obtener partículas cargadas con el antígeno (Filley E et al., 1989). Describiéndolo brevemente; los segmentos de nitrocelulosa se disolvieron en dimetil sulfóxido, posteriormente se precipitaron con un búfer de carbonato/bicarbonato 0.05M, pH 9.6, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 500µl de PBS estéril. De igual manera se procesaron partículas de nitrocelulosa sin antígeno, con el fin de ser inyectadas en los ratones control.

La razón de usar esta metodología fue minimizar la contaminación con otras proteínas de diferente peso molecular que pudiesen estar en la muestra y así inmunizar los ratones sólo con la proteína de estudio.

5.3.2. Inmunización de los ratones

Se emplearon hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad (Harlan México), las cuales fueron mantenidas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo condiciones libres de patógenos. Todos los estudios se llevaron a cabo siguiendo las guías institucionales. En cada experimento se usaron dos grupos de ratones (n=5 por grupo), un

grupo fue inmunizado con inyecciones intraperitoneales de 20 μg de PE_PGRS33 en partículas de nitrocelulosa (100 μl de PBS conteniendo 20 μg de PE_PGRS33 por ratón). El grupo control fue inyectado vía intraperitoneal con 100 μl de PBS que contenía partículas de nitrocelulosa sin antígeno. Se llevaron a cabo dos inmunizaciones posteriores a intervalos de tres semanas, con la misma cantidad de antígeno y empleando la misma vía de inmunización.

5.3.3 Ensayo de proliferación con CFSE

Se obtuvieron las células del bazo de los ratones inmunizados y controles. Después de lisar los eritrocitos, 10^7 células del bazo fueron incubadas 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester 0.5 μM (CFSE, Invitrogen). La reacción se detuvo adicionando 9 volúmenes de medio RPMI 1640 (GIBCO, BRL) mas suero bovino fetal 10% (GIBCO, BRL). Las células teñidas con CFSE se centrifugaron, se lavaron dos veces con PBS mas suero bovino fetal 10% y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal 10% (SBF), glutamina 1.5mM, penicilina 100U/ml, estreptomycin 100 μg /ml, aminoácidos no esenciales 1%, búfer HEPES 20mM y 2-mercaptoetanol 50 μM (todo obtenido de GIBCO, BRL). Las células viables se contaron por el método de exclusión de azul de tripano y 1.5 millones de células teñidas se estimularon con 25 μg de los antígenos PE_PGRS33, PE, PGRS o GST. A cada pozo se le adicionaron 10 μg /ml de Polimixina B (SIGMA) con el objetivo de eliminar los efectos de trazas de lipopolisacárido que pudiesen estar presentes en las proteínas recombinantes. Las células se incubaron 96 horas a 37°C en presencia de 5% CO_2 . Como control positivo, 1.5 millones de células teñidas se estimularon con 2 μg /ml de concanavalina A (SIGMA) 37°C in 5% CO_2 por 72h. El control negativo consistió en

células teñidas con CFSE que no fueron estimuladas con ningún antígeno. Después de los tiempos mencionados las células de cada pozo se colectaron, se lavaron con PBS Dulbecco (DPBS), SBF 2% mas azida de Sodio 0.09% y se incubaron con anticuerpo anti Fc γ R (CD16-CD32, CALTAG, Burlingame, CA) con el fin de bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos conjugados. Las células marcadas con CFSE fueron incubadas con anticuerpo anti- CD4 marcado con ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen) y anticuerpo anti-CD8 conjugado a alofocianina (APC) (CALTAG-INVITROGEN) por 15 minutos en hielo y oscuridad, posteriormente se lavaron con DPBS, SBF 2% mas azida de Sodio 0.09% y finalmente se resuspendieron en DPBS. La citometría de flujo se llevó a cabo en un FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA), los linfocitos y blastos se identificaron por tamaño y granularidad y se adquirieron 10.000 eventos con estas características. El porcentaje de células en proliferación fue determinado haciendo una ventana de las células CD4⁺ o CD8⁺. Posteriormente la población de células cuya intensidad de tinción con CFSE iba disminuyendo (células en proliferación) se comparó con la población de células que exhibían alta tinción de CFSE (células que no habían experimentado división celular) (Mannering, 2003). El programa Cellquest™ se empleó para adquirir y analizar los datos. Las muestras y controles se adquirieron y analizaron bajo las mismas condiciones.

5.3.4 Medición de IFN γ en cultivos de esplenocitos de ratones

Las células del bazo de los ratones inmunizados y ratones control fueron incubadas con 25 μ g de los antígenos PE_PGRS33, PGRS, PE o GST mas 10 μ g/ml de Polimixina B durante 96 horas. Los sobrenadantes de cultivo fueron colectados y la cantidad de IFN- γ se determinó mediante un ensayo de ELISA (PEPROTECH, México DF, México) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.3.5 Detección de anticuerpos en sueros de ratones

Dos semanas después de la última inmunización se colectó sangre total de la cola de los ratones. Las muestras fueron centrifugadas para obtener el suero y se determinaron los títulos de IgG, IgG1 e IgG2a mediante un ensayo de ELISA, el cual se describe brevemente a continuación. Se adicionaron 5 µg/ml de PE_PGRS33, PGRS, PE o GST a cada pozo de placas de 96 pozos (Maxisorp Nunc Immunoplates) y las placas fueron mantenidas a 4°C durante toda la noche. Para prevenir la unión inespecífica, los pozos se bloquearon con PBS-BSA 2%-Tween 20 0.05% durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se incubaron con diferentes diluciones del suero de los ratones (1:100, 1:300 o 1:500) en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Después de que las placas fueron lavadas con PBS-BSA 2%-Tween 20 0.05% dos veces, éstas se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados: IgG, IgG1, IgG2a anti-ratón hechos en cabra y conjugados a peroxidasa (HRP) (Todos obtenidos de ZYMED, San Francisco, CA) durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron como se mencionó anteriormente y la reacción de color se evidenció con el uso de *o*-fenilendiamina tetrahidroclorido (SIGMA, St. Louis, MO). Los valores de absorbancia se midieron a una densidad óptica de 492nm usando un lector de ELISA.

5.4. Estudio en humanos

5.4.1. Características de los donadores

Los 88 individuos que participaron en el estudio eran estudiantes de posgrado de la facultad de odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Todos los

participantes habían sido vacunados con *Mycobacterium bovis* BCG al nacer, tenían edades entre 25 y 32 años, eran clínicamente sanos y no se encontraron en ellos hallazgos indicativos de tuberculosis al realizar radiografías de tórax. El estudio se apejó a las normas éticas de extracción y procesamiento de muestras de sangre del Laboratorio de Micobacterias del Instituto de Investigaciones Biomédicas y cada individuo dio su consentimiento firmado. No se ofrecieron incentivos para su participación en el estudio.

5.4.2. Determinación de IFN- γ para detectar individuos LTBI y no infectados

Se colectaron 10 ml de sangre total de cada individuo participante en el estudio. Una muestra de 5 ml fue conservada para el estudio de anticuerpos y una muestra de 5 ml se depositó en tubos heparinizados y fue empleada para determinar la secreción de IFN- γ usando el kit QuantiFERON[®]-TB Gold (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia. Número de catálogo: 05980201). Brevemente, 1 ml de sangre total heparinizada a partir de cada sujeto fue incubada con los antígenos ESAT-6 y CFP-10 durante 16 horas a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas y los plasmas se emplearon para cuantificar la producción de IFN- γ usando el ensayo de ELISA que forma parte del kit QuantiFERON[®]-TB Gold, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. En este método los estándares de IFN- γ y las muestras de plasma se añadieron a placas de 96 pozos cubiertas con anticuerpo contra IFN- γ humano hecho en ratón. El conjugado anti-IFN- γ - humano marcado con HRP fue incorporado inmediatamente después de las muestras y estándares y mantenidos en movimiento a temperatura ambiente por 2 horas. Después de la adición del sustrato enzimático para la HRP, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 min. La reacción fue detenida con el reactivo incluido en el

kit y la densidad óptica se midió después de 5 minutos usando un lector de ELISA. Los resultados fueron analizados usando el software de análisis del kit QuantiFERON®-TB Gold.

Esta determinación fue usada para dividir el grupo de individuos en latentemente infectados y no infectados con TB.

5.4.3. Determinación de IFN- γ para detectar individuos con respuesta positiva a la proteína PE_PGRS33.

Un volumen de 1ml de sangre total heparinizada a partir de cada individuo de los 88 participantes en el estudio, se incubó con 25 μ g/ml de la proteína PE_PGRS33 durante 16 horas a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Las muestras fueron centrifugadas y el plasma se usó para cuantificar la secreción de IFN- γ empleando el ensayo de ELISA que forma parte del kit QuantiFERON®-TB Gold, como se describió arriba. Esta determinación permitió identificar individuos con respuesta positiva a la proteína PE_PGRS33 completa entre los donadores latentemente infectados y no infectados con TB.

5.4.4. Determinación de IFN- γ para estudiar la respuesta a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en los individuos LTBI y no infectados.

Los individuos categorizados como respondedores a la proteína PE_PGRS33 por el ensayo de secreción de IFN- γ , fueron citados en una ocasión posterior para continuar el estudio. A partir de los individuos que accedieron participar, se colectaron 5 ml de sangre total en tubos heparinizados y dicha muestra se diluyó 10 veces con medio RPMI 1640 suplementado con glutamina 2mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 μ g/ml

(Todo obtenido de GIBCO BRL). Se tomó 1 ml de sangre diluida y se incubó con 25 µg de las proteínas PE_PGRS33, PE, PGRS o GST mas 10 µg/ml de Polimixina B durante 6 días a 37°C en presencia de 5% de CO₂. La cantidad de IFN-γ en los sobrenadantes de cultivo fue cuantificada usando ensayo de ELISA que forma parte del kit QuantiFERON®-TB Gold, como se describió arriba.

5.4.5. Detección de anticuerpos antígenos específicos en individuos LTBI y no infectados.

Dado que se contaba con una muestra de suero de los 88 individuos participantes en el estudio, se evaluaron los títulos de anticuerpos IgG total contra la proteína PE_PGRS33 y sus dominios en el suero de 61 de ellos mediante un ensayo de ELISA. Los sueros analizados incluyeron 15 sueros provenientes de individuos que produjeron IFN-γ en respuesta a la proteína PE_PGRS33 total y 46 sueros de individuos con respuesta de IFN-γ negativa a la proteína PE_PGRS33. Para realizar el ELISA se adicionaron 5 µg/ml de PE_PGRS33, PGRS, PE o GST a cada pozo de placas de 96 pozos (Maxisorp Nunc Immunoplates) y las placas fueron mantenidas a 4°C durante toda la noche. Para prevenir la unión inespecífica, los pozos se bloquearon con PBS-BSA 2%-Tween 20 0.05% durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se incubaron con diferentes diluciones del suero de los humanos (1:100, 1:300 o 1:500) en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Después de que las placas fueron lavadas con PBS-BSA 2%-Tween 20 0.05% dos veces, éstas se incubaron con el anticuerpo secundario IgG anti/humano hecho en cabra y conjugado a peroxidasa (HRP) (ZYMED, San Francisco, CA) una hora a temperatura ambiente, se lavaron como se mencionó anteriormente y la reacción de color se evidenció con el uso de *o*-fenilendiamina tetrahidroclorido (SIGMA, St. Louis, MO).

Los valores de absorbancia se midieron a una densidad óptica de 492nm usando un lector de ELISA.

5.5. Análisis estadísticos

Los datos entre grupos se compararon usando el test t de Student. Los valores de p menores de 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

6. Resultados

6.1. Identificación de epítopes MHC-I en las PE_PGRS.

6.1.1. Predicción de epítopes de unión a moléculas del MHC-I.

Los programas computarizados empleados identificaron varios péptidos con probabilidad de unirse y ser presentados por moléculas MHC-I K^b y D^b en las PE_PGRS. Con base en la frecuencia de aparición en las PE_PGRS y en la mayor puntuación de afinidad por las MHC-I, se encontraron en el dominio PE dos epítopes. Uno de ellos exhibe elevada afinidad por la molécula K^b, su secuencia es HAQAYQAL y se localiza cercano o en la posición 45 del dominio PE. El otro péptido mostró en la predicción elevada afinidad por la molécula D^b, su secuencia es LDVINAPAL y generalmente se localiza en la posición 58 del dominio PE de las PE_PGRS.

En la región PGRS se detectó un péptido con afinidad de unión a moléculas D^b, su secuencia es GAGGNAGLL. Dada la naturaleza polimórfica de la región PGRS, la posición de este péptido en las proteínas miembros de la subfamilia es variable.

6.1.2. Ensayo de unión de péptidos a moléculas del MHC-I.

Los péptidos purificados se probaron en un ensayo de unión a moléculas MHC-I. En la **Figura 6.1 A** se observa el perfil de unión de las moléculas K^b sobre las células RMA-S cargadas con el péptido HAQAYQAL de la región PE.

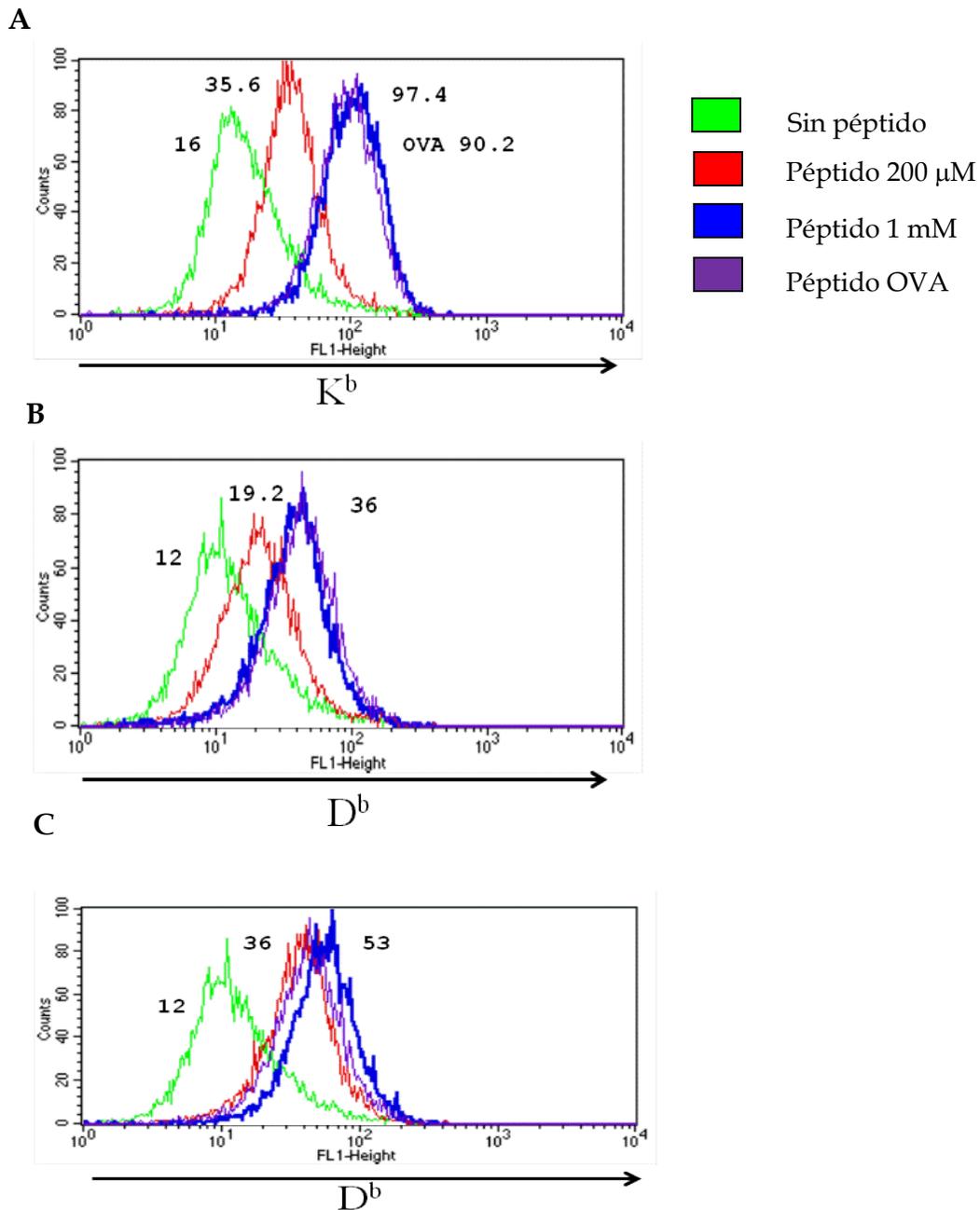


Figura 6.1 Ensayo de unión de péptidos de la proteína PE_PGRS33 a moléculas MHC-I. Células RMA-S fueron cultivadas con 200 μ M o 1 mM de los péptidos de la proteína PE_PGRS33 o con el péptido de OVA₂₅₇₋₂₆₄ durante 12 horas a 37°C. Luego las moléculas MHC-I fueron teñidas con un anticuerpo de superficie anti- K^b o anti- D^b y analizadas por citometría de flujo. En **A** se muestran los resultados para el péptido HAQAYQAL y en **B** para el péptido LDVINAPAL, ambos ubicados en el dominio PE. En **C** los resultados para el péptido GAGGNAGLL, del dominio PGRS.

Dicho péptido puede unirse a las moléculas K^b y estabilizar las cadenas α sobre la superficie de las células RMA-S en una forma dosis-dependiente (con un incremento de 2.2 en la fluorescencia media a 200 μ M y 6.08 a 1 mM comparado con la fluorescencia de las células RMA-S sin péptido). El péptido LDVINAPAL del dominio PE mostró un incremento en la fluorescencia media de 1.5 a 200 μ M y 3.0 a 1mM evidenciado por el anticuerpo anti-D^b (**Figura 6.1. B**). El péptido GAGGNAGLL de la región PGRS, con afinidad predicha por moléculas D^b también estabilizó dichas moléculas sobre la superficie de las células RMA-S en una forma dosis-dependiente (incremento en la fluorescencia media de 3.0 a 200 μ M y de 4.41 a 1mM) (**Figura 6.1. C**).

6.2. Respuesta inmune humoral y celular a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en ratones

6.2.1. Respuesta inmune humoral en ratones

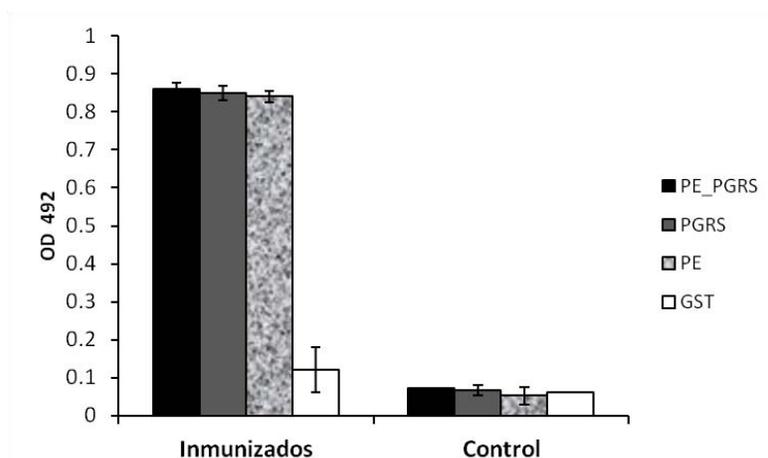


Figura 6.2. Respuesta de anticuerpos IgG contra la proteína PE_PGRS33 y sus dominios. Ratones BALB/c fueron inmunizados tres veces con la PE_PGRS33 en nitrocelulosa o con nitrocelulosa sin antígeno (Control). Los sueros fueron obtenidos después de la última inmunización y se determinaron los niveles de IgG total contra la proteína completa y sus dominios por ELISA.

En el suero de los ratones inmunizados se obtuvieron títulos similares de IgG total dirigidos contra la proteína PE_PGRS33 completa y sus dominios PE y PGRS. No se obtuvo respuesta significativa contra la proteína completa ni los dominios en los ratones control (**Figura 6.2**).

Con el fin de detectar posibles diferencias en las subclases de IgG, se midieron los títulos de IgG1 e IgG2a en el suero de los ratones. En el caso de IgG1, los títulos fueron similares en respuesta a la proteína completa y a sus dominios en cada una de las diluciones de suero probadas (**Figura 6.3. A**). En contraste, los niveles de la subclase IgG2a inducidos contra el dominio PE fueron más bajos que los niveles contra el dominio PGRS y la proteína PE_PGRS33 (**Figura 6.3. B**). Esto indica que los anticuerpos IgG1 en el suero de los ratones inmunizados están dirigidos contra la proteína PE_PGRS33 completa y sus dos dominios, mientras que los anticuerpos IgG2a reconocen epítopes localizados exclusivamente en el dominio PGRS.

Se observó también que los niveles de IgG1 contra la proteína completa y el dominio PGRS son mayores que los de IgG2 (**Figuras 6.3 A y B**).

No se obtuvo respuesta significativa para IgG o las subclases ensayadas contra la proteína completa ni los dominios en los ratones control (Datos no mostrados).

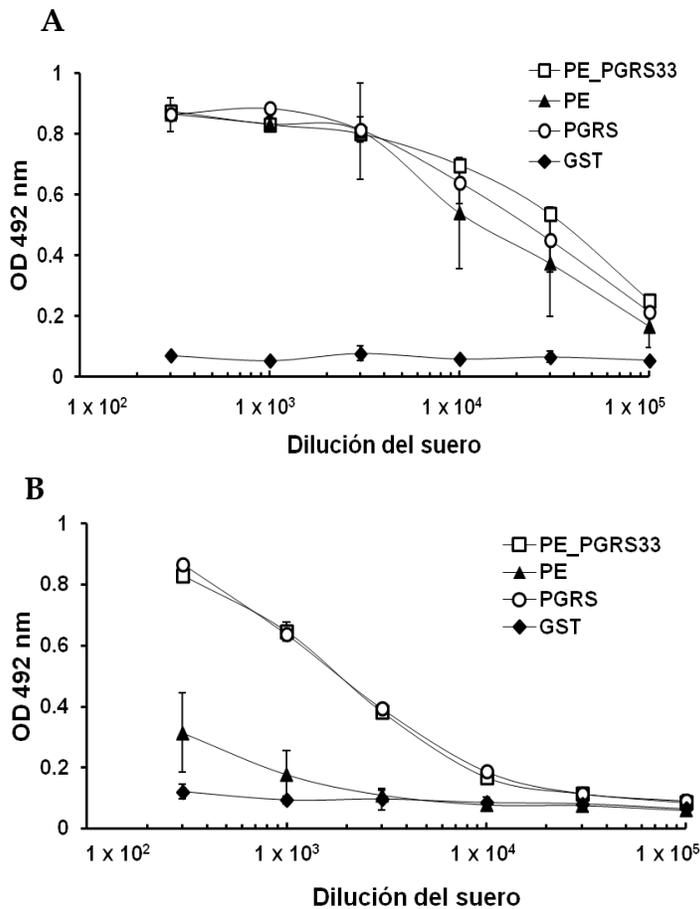


Figura 6.3. Respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG2a contra la proteína PE_PGRS33 y sus dominios. Ratones BALB/c fueron inmunizados tres veces con la PE_PGRS33 en nitrocelulosa. Los sueros se obtuvieron después de la última inmunización, diluidos según se muestra en la figura y los niveles de IgG1 e IgG2a contra la proteína completa y sus dominios se determinaron por ELISA.

6.2.2. Proliferación antígeno-específica de células T CD4⁺ y CD8⁺ en ratones.

Con el fin de evaluar la contribución de la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en la activación de las células T, se determinó la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ provenientes del bazo de los ratones inmunizados. Ambas subpoblaciones de células T proliferaron en respuesta a la estimulación con la PE_PGRS33 completa de manera similar (Figura 6.4. A y B).

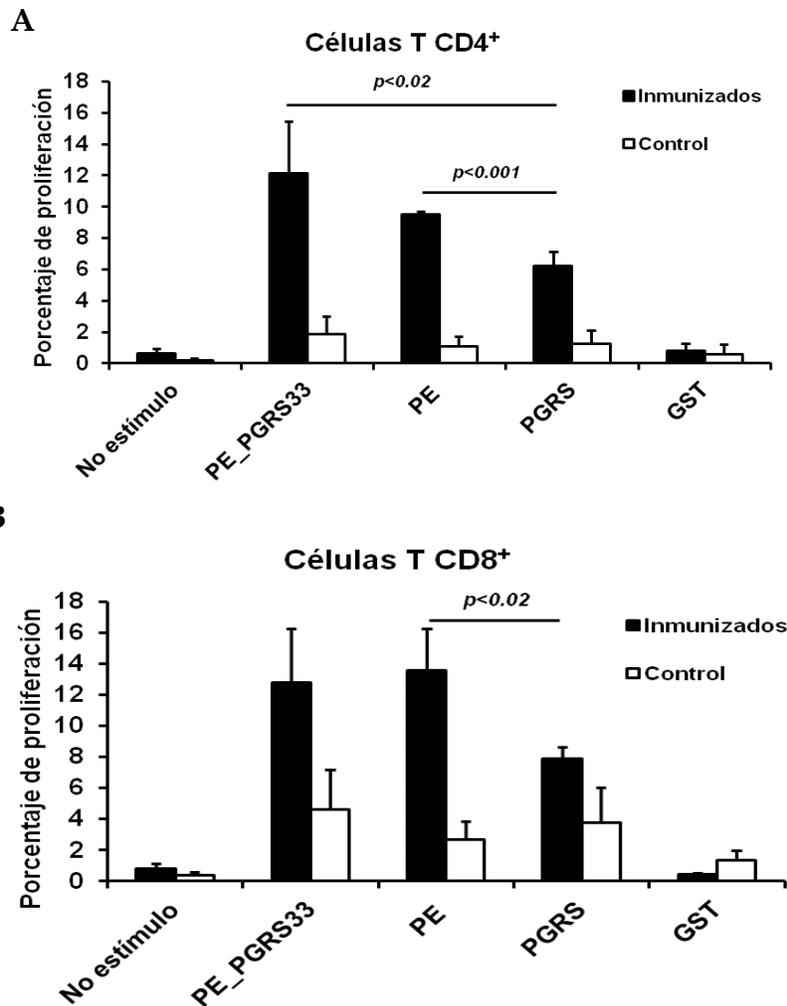


Figura 6.4. Proliferación antígeno-específica de células T CD4⁺ y CD8⁺ en ratones. Células del bazo de ratones inmunizados con la proteína PE_PGRS33 fueron teñidas con CFSE e incubadas con 25 µg de PE_PGRS33, PE, PGRS o GST más 10 µg de Polimixina B por 96 horas. Células del bazo de ratones inyectados con nitrocelulosa fueron también cultivadas con los antígenos (Control). Células sin antígeno fueron cultivadas durante el mismo tiempo (No estímulo). Las células fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales anti-CD4 conjugado a ficoeritrina (A) o con anti-CD8 conjugado a aloficocianina (B) y el porcentaje de células en proliferación se determinó por dilución del CFSE en un citómetro de flujo. Cada barra representa el promedio ± SD estándar de los datos obtenidos de 4 ratones por grupo y los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Ambos dominios estimularon la proliferación de las células T CD4⁺ y CD8⁺, sin embargo la respuesta de las dos subpoblaciones celulares contra el dominio PE fue significativamente más alta que la inducida por el dominio PGRS (Figura 6.4. A y B).

El porcentaje de proliferación de los linfocitos provenientes de los ratones inmunizados fue significativamente más alta que la de los ratones control en respuesta a los antígenos PE_PGRS33, PE y PGRS (**Figura 6.4**). Dado que el dominio PE se expresó como producto de fusión con la proteína GST, se evaluó la proliferación en respuesta a la proteína GST sola. Los resultados mostraron que dicha proteína no tuvo ningún impacto en la proliferación de las células procedentes de los ratones control ni de los ratones inmunizados (**Figura 6.4**).

6.2.3. Secreción de IFN- γ en respuesta al estímulo con PE_PGRS33, PE y PGRS en ratones.

Como se muestra en la **Figura 6.5**, las células del bazo de los ratones inmunizados secretaron cantidades significativamente mayores de IFN- γ después de la estimulación con la proteína PE_PGRS33 y los dominios PE y PGRS en comparación con las células de los ratones control.

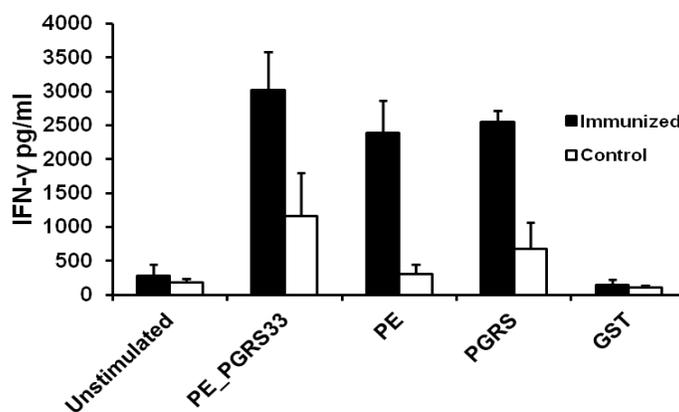


Figura 6.5. Secreción de IFN- γ en respuesta al estímulo con los antígenos en ratones. Células del bazo provenientes de ratones inmunizados con la PE_PGRS33 o de los ratones control fueron incubadas con 25 μ g de PE_PGRS33, PE, PGRS o GST mas 10 μ g de Polimixina B por 96 horas. Se detectó el IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo usando un ensayo de ELISA. Cada barra representa la media \pm SD de los datos de 4 ratones por grupo y los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Los niveles de IFN- γ en respuesta a estos tres antígenos también fueron mayores en las células estimuladas comparadas con las células no estimuladas (**Figura 6.5**).

Las células del bazo de los ratones inmunizados secretaron cantidades similares de IFN- γ en respuesta al estímulo con la proteína PE_PGRS33 y sus dominios (**Figura 6.5**).

Este resultado, así como la proliferación celular previamente mencionada, indican que la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS son inductores de la respuesta inmune celular en ratones.

6.3. Respuesta inmune humoral y celular a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios en humanos

6.3.1. Respuesta de IFN- γ a la proteína PE_PGRS33 completa en individuos LTBI y en individuos no infectados

De los 88 individuos que participaron en el estudio, 14 fueron identificados como LTBI y 74 como no infectados (**Tabla 6.1**).

Con el objetivo de determinar si la proteína PE_PGRS33 es inductora de la respuesta inmune celular en humanos infectados y no infectados con *M. tuberculosis*, se evaluó la secreción de IFN- γ en sangre total después de la estimulación con la PE_PGRS33 completa en los 88 individuos descritos (**Tabla 6.1**).

Los resultados mostraron que las células de sólo 4 de los 14 individuos latentemente infectados (28.5%) secretaron IFN- γ en respuesta a la proteína PE_PGRS33 mientras que 16 de los 74 individuos no infectados (21.6%) también mostraron respuesta a esta proteína

(Tabla 6.1). Estos resultados sugieren que una respuesta de IFN- γ a la proteína PE _PGRS33 no se encuentra asociada con infección latente por *M. tuberculosis*.

Tabla 6. 1. Respondedores a la proteína PE_PGRS33 completa en individuos LTBI y no infectados.

Estatus de los individuos ^a	No. individuos	Respuesta de IFN- γ a la PE_PGRS33 ^b	
		Positivos ^c	Negativos ^c
LTBI	14	4/14 (28.5)	10/14 (71.4)
No infectados	74	16/74 (21.6)	58/74 (78.3)

^a Los 88 individuos fueron clasificados como LTBI o no infectados de acuerdo a la secreción de IFN- γ en respuesta a la ESAT-6 y CFP-10 como se describió en materiales y métodos.

^b Los 88 individuos fueron identificados como positivos o negativos a la PE_PGRS33 de acuerdo a la secreción de de IFN- γ en respuesta a dicha proteína como se describió en materiales y métodos

^c Se muestra el número de individuos seguido por el porcentaje en paréntesis.

6.3.2. Respuesta de IFN- γ a la proteína PE_PGRS33, y sus dominios PE y PGRS en individuos con LTBI y en individuos no infectados

A los individuos que mostraron respuesta positiva de IFN- γ a la proteína PE _PGRS33 (Tabla 6.1) se les convocó para llevar a cabo una segunda determinación en sangre total, esta vez con el fin de evaluar la respuesta celular a los dominios PE y PGRS. De los 20 voluntarios, 7 aceptaron continuar con el estudio; este grupo estuvo conformado por 3 individuos con LTBI y 4 no infectados.

Los niveles de IFN- γ en respuesta a la proteína PE _PGRS33 y sus dominios PE y PGRS se determinaron en la sangre total de dichos individuos. Los resultados mostraron una mayor secreción de IFN- γ en respuesta a la proteína PE _PGRS33 en individuos no infectados que en individuos latentemente infectados (Figura 6.6). Se observó también que la producción de IFN- γ tiende a ser mayor en respuesta al dominio PE que al dominio PGRS (Figura 6.6).

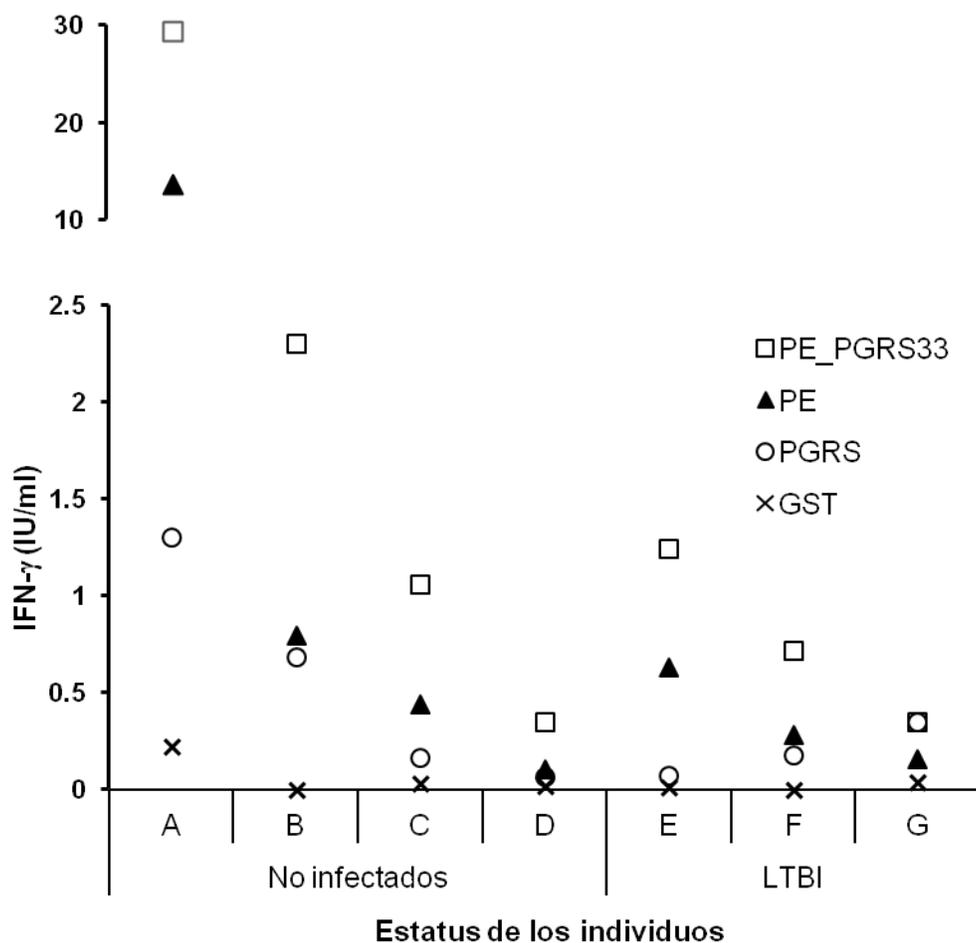


Figura 6.6. Respuesta de IFN- γ a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en LTBI y en individuos no infectados. La sangre total diluida se estimuló con 25 μ g de PE_PGRS33, PE, PGRS o GST más 10 μ g de Polimixina B. Las letras representan cada individuo y los símbolos corresponden a la cantidad de IFN- γ producida.

6.3.3. Respuesta inmune humoral a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en humanos

Con el fin de determinar la respuesta humoral, se evaluó la respuesta IgG total contra la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en el suero de 61 de los voluntarios que participaron en el estudio. El ensayo se realizó con 10 muestras provenientes de individuos LTBI y 51 muestras de individuos no infectados. Esto fue posible dado que en

la primera parte del estudio se obtuvo una muestra de sangre total a partir de todos los individuos.

Los niveles de IgG contra el dominio PE fueron significativamente más bajos que contra el dominio PGRS, tanto en individuos no infectados como en individuos latentemente infectados (**Figura 6.7**).

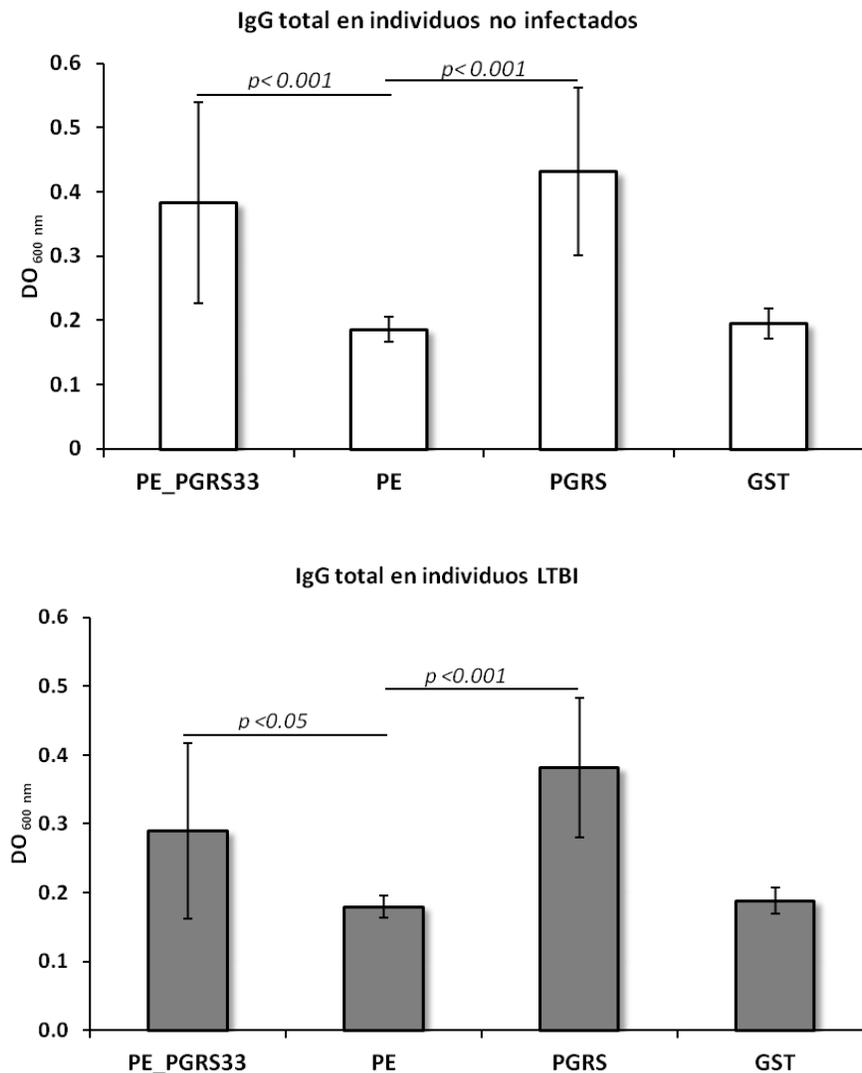


Figura 6.7. Respuesta inmune humoral a la proteína PE_PGRS33 y sus dominios PE y PGRS en humanos. Los sueros obtenidos de individuos LTBI y no infectados se diluyeron 1:300 y fueron incubados en placas que contenían los antígenos PE_PGRS33, PE, PGRS o GST. Los anticuerpos IgG totales específicos para tales antígenos se detectaron por un ensayo de ELISA.

La respuesta IgG contra la proteína completa es significativamente más alta que contra el dominio PE, sin embargo no hay diferencias entre la proteína completa y el dominio PGRS. Lo anterior es evidente también tanto en individuos no infectados como en los LTBI (**Figura 6.7**). Los niveles de IgG detectados hacia el dominio PE fueron tan bajos como los del control negativo, la proteína GST (**Figura 6.7**).

La comparación de los niveles de IgG total contra la proteína completa y sus dominios también se llevó a cabo analizando por separado el grupo de individuos cuyas células secretan IFN- γ en respuesta a la PE_PGRS33 completa y el grupo que no responde de tal manera. En ambos grupos los títulos fueron significativamente mayores contra la PE_PGRS33 y el dominio PGRS comparados con el dominio PE (Datos no mostrados).

Todos estos resultados indicaron que en humanos latentemente infectados con tuberculosis o no infectados, la respuesta inmune humoral en contra de la proteína PE_PGRS33 es dirigida hacia epítopes principalmente localizados en el dominio PGRS.

7. DISCUSION

La proteína PE _PGRS33 ha sido involucrada en la patogenicidad de *M. tuberculosis* (Talarico S et al., 2007; Dheenadhayalan V et al., 2006) y se conoce que cada uno de sus dominios juega diferentes roles en las propiedades atribuidas a la proteína completa. El dominio PE es requerido para la translocación de la PE _PGRS33 a través de la pared celular micobacteriana y la inducción de necrosis primaria (Cascioferro A., et al 2007; Cadieux N et al., 2011). El dominio PGRS interactúa con el TLR-2 induciendo apoptosis, dirige a la proteína completa hacia la mitocondria desencadenando necrosis y variaciones en este dominio afectan la secreción de TNF- α inducida por la proteína PE_PGRS33 (Cadieux N., 2011; Basu S et al., 2007). Aunque las características mencionadas de los dominios PE y PGRS han sido dilucidadas, aun no se ha evaluado la contribución de cada uno de ellos a la inmunogenicidad de la proteína PE _PGRS33 completa.

En el presente estudio, la inmunización de ratones con la proteína PE _PGRS33 estimuló la proliferación de las células T CD4⁺ y CD8⁺, así como la secreción de IFN- γ . Lo anterior indicó que la PE _PGRS33 es altamente inmunogénica. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ son cruciales en la respuesta protectora del hospedero contra *M. tuberculosis*. Estas subpoblaciones celulares migran al sitio de infección y producen citocinas involucradas en el control de la enfermedad (Flynn JL & Chan J, 2001; Zúñiga J et al., 2012). Los resultados presentados en este trabajo en respuesta a la proteína PE _PGRS33, apoyan el uso potencial de dicha proteína en el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis, tal como ha sido propuesto previamente (Chaitra MG et al., 2007).

En un trabajo anterior, fue reportada la ausencia de secreción de IFN- γ cuando ratones C57BL/6 fueron inmunizados con el gen codificante para la proteína PE_PGRS33 y las células del bazo re-estimuladas con la proteína PE_PGRS33 completa (Delogu G & Brennan MJ, 2001). En contraste, en nuestro trabajo se obtuvieron altas concentraciones de IFN- γ usando ratones BALB/c. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los publicados por Chaitra y cols, quienes emplearon también ratones BALB/c en sus experimentos (Chaitra MG et al., 2007). Los ratones BALB/c fueron inmunizados con proteína en nuestro estudio y con DNA o DNA/proteína en el trabajo de Chaitra y cols (Chaitra MG et al., 2007). Por lo tanto, el que la inmunización sea realizada con DNA, con una combinación DNA/proteína o sólo con proteína no explicaría los resultados contrastantes inicialmente mencionados. La discrepancia se debería probablemente a la cepa de ratón usada en cada estudio. Esto sugiere que las diferencias en el MHC tienen un gran impacto en el reconocimiento inmune de la proteína PE_PGRS33.

Con el objetivo de determinar la presencia y localización de epítopes que pudiesen unirse a moléculas MHC-I, en nuestro estudio se llevó a cabo una predicción de epítopes en las PE_PGRS. Se predijeron tres péptidos con alta afinidad de unión a moléculas MHC-I, pero luego se probó experimentalmente que dos de los péptidos predichos, uno del dominio PE (HAQAYQAL) y uno del dominio PGRS (GAGGNAGLL) se unen con alta afinidad y estabilizan moléculas MHC-I Kb y Db respectivamente. Posteriormente se observó que los dos dominios PE y PGRS desencadenaron la proliferación de las células T CD8⁺. Los datos anteriores sugieren que ambos dominios juegan un papel importante en la respuesta de las células T CD8⁺ a la PE_PGRS33 completa. En apoyo a nuestros resultados, ha sido reportada la presencia de epítopes en los dominios PE y PGRS capaces de ser presentados

por componentes del MHC-I e inducir funciones efectoras en células T CD8⁺ (Chaitra MG et al., 2007).

M. tuberculosis reside principalmente en la vacuola fagocítica del macrófago infectado, por lo que ciertos antígenos de la bacteria son presentados a las células T CD4⁺ por moléculas MHC-II (Russell DG, 2011). De hecho, las células T CD4⁺ se encuentran entre las más importantes en la respuesta protectora contra *M. tuberculosis* (Flynn JL & Chan J, 2001). En cuanto a la activación de células T CD4⁺ en las PE_PGRS, se encontró un epítipo en la proteína PE_PGRS53 capaz de unirse a moléculas MHC-II y estimular respuestas dependientes de células T CD4⁺ en humanos reactivos al PPD (Wang M et al., 2011). Hasta el momento no se ha llevado a cabo un estudio detallado de la presencia de epítopos restringidos a MHC-II en la PE_PGRS33. Sin embargo la activación de células T CD4⁺ observada en la Figura 6.4 sugiere que los dos dominios PE y PGRS portan péptidos inductores de respuestas dependientes de moléculas MHC-II.

Los resultados obtenidos también muestran que ambos dominios provocaron la secreción de cantidades similares de IFN- γ , pero el dominio PE fue el principal inductor de la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺. Esto sugirió que el dominio PE podría estar estimulando una mayor tasa de proliferación en tales subpoblaciones para llevar a cabo otras funciones además de la producción de IFN- γ . Entre tales funciones han sido descritas la secreción de IL-2 y linfoxina alfa por las células T CD4⁺ y la producción de granzimas y perforinas por las células T CD8⁺ (Zúñiga J et al., 2012).

En la prueba de ELISA, el suero de los ratones inmunizados con la proteína PE_PGRS33 mostró niveles similares de IgG en respuesta a la proteína completa y a sus dominios PE y PGRS. Una posible explicación para esta observación podría ser que cuando los dominios

se encuentran separados pierden su conformación original y exponen epítopes crípticos que son reconocidos por los anticuerpos generados en el animal inmunizado. Por otra parte, en la proteína completa dichos determinantes antigénicos permanecen ocultos.

Los niveles en las subclases de IgG fueron posteriormente determinados en el suero de los ratones con el fin de detectar posibles diferencias en respuesta a los dominios estudiados. Los resultados mostraron que los anticuerpos IgG2a detectados tuvieron como blanco a la proteína completa y al dominio PGRS mientras que los anticuerpos IgG1 estaban dirigidos hacia los tres antígenos. Aunque no se llevó a cabo una cuantificación de tales subclases de IgG, la determinación en los sueros de los ratones a diferentes diluciones reveló niveles más altos de IgG1 que de IgG2a. Esto sugiere que la respuesta IgG2a podría estar enmascarada por los altos títulos de IgG1 y las diferencias observadas a nivel de subclases no estarían siendo reflejadas en la determinación de IgG total. Los resultados indican que los dominios PE y PGRS son antigénicos en ratones BALB/c con diferencias en el reconocimiento por parte de las subclases IgG.

La identificación de antígenos que interactúan con el sistema inmune durante la infección latente será esencial en el desarrollo de marcadores inmunológicos para esta condición particular (Schuck SD et al., 2009; Walzl G et al., 2011). Previos reportes han descrito el papel de algunas PE_PGRS en la persistencia micobacteriana (Ramakrishnan L et al., 2000; Talarico S et al., 2007; Campuzano J et al., 2007), así que una de las hipótesis para el presente estudio fue que la PE_PGRS33 podría ser un antígeno importante en la latencia de *M. tuberculosis* en seres humanos infectados.

Los resultados obtenidos en humanos indicaron que la mayoría de individuos LTBI no mostraron secreción de IFN- γ en respuesta a la proteína PE_PGRS33 (28.5%). También se

detectó que algunos individuos no infectados exhibieron una respuesta positiva a la proteína PE_PGRS33 (21.3%). Recientemente se han identificado varios antígenos relacionados con la infección latente. Dichos antígenos inducen respuestas de células T en el rango de 45 al 72% de individuos LTBI y respuestas muy bajas o ausentes en individuos no infectados (Schuck SD et al., 2009). Los resultados obtenidos en el presente trabajo en comparación con la literatura revisada sugieren que la secreción de IFN- γ en respuesta a la PE_PGRS33 podría no estar asociada con la infección latente por *M. tuberculosis*.

La explicación al alto número de individuos LTBI que no mostraron respuesta a la PE_PGRS33 (71.4%) podría ser que las cepas infectantes en tales casos no expresan el gen *rv1818c*. Otra razón sería que las cepas causantes de la infección porten genes *rv1818c* con grandes variaciones en su secuencia. Esta variación genética se vería reflejada en cambios significativos en la proteína PE_PGRS33 lo que a su vez llevaría a la ausencia de reconocimiento por el sistema inmune. Ambos mecanismos han sido descritos como fuente de polimorfismo entre miembros de la subfamilia PE_PGRS en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (Talarico S et al., 2005; Gao Q et al., 2005; Flores J & Espitia C, 2003; McEvoy CR et al., 2012; Talarico S et al., 2008). Los resultados obtenidos en humanos reforzarían la hipótesis de que la alta variación antigénica en miembros de las PE_PGRS podría ser una fuente de variación antigénica en *M. tuberculosis* (Cole ST et al., 1998).

Tanto la vacunación con *M. bovis* BCG como la infección latente por *M. tuberculosis* inducen células T CD4⁺ de memoria específica para antígenos micobacterianos, las cuales son fenotípica y funcionalmente distintas (Adekambi T et al., 2012). Los individuos no infectados con *M. tuberculosis* en nuestro grupo de estudio habían sido vacunados con *M.*

bovis BCG en su niñez, por lo que el 21.3% de individuos que muestra respuesta positiva a la proteína PE_PGRS33 podría ser atribuido a la respuesta inducida por la vacunación.

Durante la infección por *M. tuberculosis* las células B ejercen cierta influencia sobre las células T, son constituyentes importantes de la arquitectura del granuloma y los anticuerpos específicos que producen tienen un gran impacto en modular la respuesta tisular inflamatoria (Abebe F & Bjune G, 2009). Conocer la respuesta de anticuerpos a los miembros de la subfamilia PE_PGRS contribuiría al entendimiento de la inmunopatología de la infección micobacteriana (Sampson SL, 2011). Los resultados obtenidos en humanos latentemente infectados con tuberculosis o no infectados indicaron que la respuesta inmune humoral en contra de la proteína PE_PGRS33 es dirigida hacia epítopes principalmente localizados en el dominio PGRS. El dominio PGRS de la PE_PGRS33 es rico en repeticiones Gli-Gli-Ala-Gli-Gli. Estas secuencias podrían ser el blanco del reconocimiento de los anticuerpos observado en este estudio, dado que proteínas con secuencias repetitivas de aminoácidos han sido identificadas como inmunodominantes en seres humanos y en conejos (Singh KK et al., 2011).

En un estudio llevado a cabo en humanos LTBI y no infectados, la proteína PE_PGRS62 indujo una fuerte respuesta de anticuerpos contra la proteína total y una débil respuesta contra el dominio PE de dicha proteína (Koh KW et al., 2009). Los resultados con la PE_PGRS62 concuerdan con el patrón de reconocimiento de anticuerpos observado en el presente estudio para la PE_PGRS33.

La respuesta humoral hacia la PE_PGRS33 en individuos no infectados puede ser atribuida a la vacunación con *M. bovis* BCG. Esto indica que el reconocimiento de esta

proteína por parte del suero de individuos sanos es independiente de la infección con *M. tuberculosis*.

El llevar a cabo la identificación de los individuos como respondedores a la PE_PGRS33, permitió planear una segunda determinación para evaluar la secreción de IFN- γ en respuesta a los dominios PE y PGRS. En los individuos respondedores a la PE_PGRS33 quienes participaron en la segunda parte del estudio, el reconocimiento inmune celular de la proteína completa mostró una tendencia a ser más alto en individuos no infectados que en los LTBI. En cuanto a los dominios, no se observó una tendencia clara, que podrá ser dilucidada con la participación de un número mayor de humanos voluntarios. Esto permitirá determinar si la respuesta inmune celular se encuentra preferencialmente dirigida hacia uno de los dominios de la proteína PE_PGRS33, como se hizo evidente para la respuesta humoral.

8. CONCLUSIONES

La inmunización de ratones BALB/c con la proteína PE_PGRS33 indujo una respuesta inmune celular y humoral contra sus dos dominios constituyentes, PE y PGRS.

El estudio en ratones sugirió que la principal diferencia en la inmunogenicidad de los dominios PE y PGRS radica en la mayor inducción a la proliferación de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ por parte del dominio PE.

La PE_PGRS33 completa indujo la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺, así como la secreción de IFN- γ . Esto confirmó el uso potencial de la PE_PGRS33 como un candidato a vacuna para la tuberculosis e incrementó el conocimiento existente sobre la inmunogenicidad de esta proteína.

En un porcentaje bajo de humanos latentemente infectados con tuberculosis se detectó la secreción de IFN- γ en sangre total después de la estimulación con la proteína PE_PGRS33; sin embargo una respuesta similar fue encontrada en individuos no infectados. Lo anterior sugiere que la respuesta de IFN- γ en humanos a la proteína PE_PGRS33 no está asociada a la infección latente por *M. tuberculosis*. En este contexto, la PE_PGRS33 no sería un antígeno apropiado como un marcador inmunológico para la LTBI.

La respuesta de IFN- γ y la reactividad serológica a la proteína PE_PGRS33 en humanos sanos es independiente de la infección con *M. tuberculosis*. Estas observaciones sugieren que las respuestas de células T y B contra la PE_PGRS33 podrían ser inducidas por la vacunación y mantenidas por muchos años en individuos no infectados.

La respuesta inmune humoral contra la PE_PGRS33 en humanos se encuentra dirigida hacia epítopes localizados en el dominio PGRS.

9. BIBLIOGRAFIA

- ◆ Abebe F and Bjune G. (2009). The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp Immunol.* 157: 235-243.
- ◆ Abu-Raddad LJ, Sabatelli L, Achterberg JT, Sugimoto JD, Longini IM Jr, Dye C, Halloran ME. (2009). Epidemiological benefits of more-effective tuberculosis vaccines, drugs, and diagnostics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 13980-13985.
- ◆ Adekambi T, Ibegbu CC, Kalokhe AS, Yu T, Ray SM, Rengarajan J. (2012). Distinct effector memory CD4+ T cell signatures in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection, BCG vaccination and clinically resolved tuberculosis. *PLoS One.* 7 (4): e36046.
- ◆ Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook GA, Hernandez-Pando R. (2002). Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 128: 229-237.
- ◆ Balaji KN, Goyal G, Narayana Y, Srinivas M, Chaturvedi R, Mohammad S. (2007). Apoptosis triggered by Rv1818c, a PE family gene from *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by mitochondrial intermediates in T cells. *Microb Infect.* 9:271-81.
- ◆ Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prevost MC, Cole ST. (2002). Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol Microbiol.* 44: 9-19.

- ◆ Basu S, Pathak SK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Yang Z, Talarico S, Kundu M, Basu J. (2007). Execution of macrophage apoptosis by PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of Tumor necrosis factor- alpha. *J Biol Chem.* 282: 1039-1050.
- ◆ Black GF, Weir RE, Floyd s, Bliss L, Warndorff DK, Crampin AC, Ngwira B, Sichali L, Nazareth B, Blackwell JM, Branson K, Chaguluka SD, Donovan L, Jarman E, King E, Fine PE, Dockrell HM. (2002). BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomized controlled studies. *Lancet.* 359: 1393-1401.
- ◆ Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen, Chilima A, Hirsch P, Appleberg R, Andersen P. (2002). Failure of the *Mycobacterium Bovis* BCG vaccine: Some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun.*70: 672-678.
- ◆ Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, Bardarov S, Kriakov J, Alavi M, Jacobs WR Jr. (2001). Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun.* 69: 7326-7333.
- ◆ Brennan, MJ., Delogu, G. (2002). The PE multigene family: a « molecular mantra » for mycobacteria. . *Trends Microbiol.* 10: 246-249.
- ◆ Cadieux N, Parra M, Cohen H, Maric D, Morris SL, Brennan MJ. (2011). Induction of cell death after localization to the host cell mitochondria by the *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 protein. *Microbiology.* 157:793-804.
- ◆ Campuzano J, Aguilar D, Arriaga K, Leon JC, Salas-Rangel LP, González-y-Merchand J, Hernandez-Pando R, Espitia C. (2007). The PGRS domain of

Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS Rv1759c antigen is an efficient subunit vaccine to prevent reactivation in a murine model of chronic tuberculosis. *Vaccine*. 25: 3722-3729

- ◆ Cascioferro A, Delogu G, Colone M, Sali M, Stringaro A, Arancia G, Fadda G, Palú G, Manganelli R. (2007). PE is a functional domain responsible for protein translocation and localization on mycobacterial cell wall. *Mol Microbiol*. 66: 1536-1547
- ◆ Chaitra MG, Shaila R, Nayak R. (2007). Evaluation of T-cell responses to peptides with MHC class I-binding motifs derived from PE_PGRS33 protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol*. 56: 466-474.
- ◆ Chaitra MG, Shaila R, Nayak R. (2008). Detection of interferon gamma-secreting CD8⁺ T lymphocytes in humans specific for three PE/PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 10: 858-867.
- ◆ Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry III CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, and Barrell BG. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393: 537-544.
- ◆ Corbett, E. L. *et al.* (2003). The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med*. 163: 1009-1021.
- ◆ Delogu G, Brennan MJ. (2001). Comparative immune response to PE and PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 69: 5606-5611

- ◆ Delogu G, Pusceddu C, Bua A, Fadda G, Brennan MJ, Zanetti S. (2004). *Rv1818c*-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Mol Microbiol.* 52: 725–733.
- ◆ Dheenadhayalan V, Delogu G, Brennan MJ. (2006). Expression of the PE_PGRS33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microb Infect.* 8: 262-272.
- ◆ Espitia C, Lacleste JP, Mondragon-Palomino M, Amador A, Campuzano J, Martens A, Singh M, Cicero R, Zhang Y, Moreno C. (1999). The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins? *Microbiology.* 145: 3487–3495.
- ◆ Ferrara G, Losi M, Fabbri LM, Miglioru GB, Richeldi L, Casaldi L. (2009). Exploring the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* for a better diagnosis of the infection. *Arch Immunol Ther Exp* 57: 425–433
- ◆ Filley E, Abou-Zeid C, Waters M, Rook G. (1989). The use of antigen-bearing nitrocellulose particles derived from Western blots to study proliferative responses to 27 antigenic fractions from *Mycobacterium leprae* in patients and controls. *Immunology.* 67: 75-80.
- ◆ Flores J, Espitia C. (2003). Differential expression of PE and PE_PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Gene.* 318: 75-81.
- ◆ Flynn JL, Chan J, Lin PL. (2011). Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol.* 4: 271-278.
- ◆ Flynn JL, Scanga CA, Tanaka KE, Chan J. (1998). Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J Immunol.* 160: 1796-1803.

- ◆ Flynn, J. L., Ernst, J. D. (2000). Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin Immunol.* 12: 432-436.
- ◆ Flynn, J. L., Chan, J. (2001). Immunology of tuberculosis. *Ann Rev Immunol.* 19: 93-129.
- ◆ Gao Q, Kripke KE, Saldanha AJ, Yan W, Holmes S, Small PM. (2005). Gene expression diversity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiology.* 151: 5-14.
- ◆ Gehring, A. J., Rojas R. E., Canaday D. H., Lakey D. L., Harding C. V., Boom W. H. (2003). The *Mycobacterium tuberculosis* 19- Kilodalton Lipoprotein Inhibits Gamma Interferon- Regulated HLA-DR and FcγR1 on Human Macrophages through Toll-Like Receptor 2. *Infect Immun.* 71: 4487-4497.
- ◆ Guía de práctica clínica, Diagnóstico y tratamiento de casos nuevos de tuberculosis pulmonar. México: Secretaría de Salud; 2009.
- ◆ Koh KW, Soh SE, Seah GT. (2009). Strong antibody responses to *Mycobacterium tuberculosis* PE-PGRS62 protein are associated with latent and active tuberculosis. *Infect Immun.* 77: 3337-3343.
- ◆ Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685
- ◆ Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwad-Mullen, P., Klein, G., Kurilla, M. G., Masucci, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein- Barr virus nuclear antigen-1. *Nature.* 375: 685-688.

- ◆ MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. (1997). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci.* 94: 5243-5248.
- ◆ McEvoy CR, Cloete R, Müller B, Schürch AC, van Helden PD, Cagneux S, Warren RM, Gey van Pittius NC. (2012). Comparative analysis of *Mycobacterium tuberculosis* *pe* and *ppe* genes reveals high sequence variation and an apparent absence of selective constraints. *PLoS One*, 7(4): e30593.
- ◆ McMurray DN. *Mycobacteria and Nocardia*. (1996). In: *Medical Microbiology*. 4th Edition. Ed: Baron S. Galveston TX: University of Texas Medical branch.
- ◆ Ozato K., Sachs DH. (1981). Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens.III. Hybridoma anyibodies reacting to antigens of the H-2b haplotype reveal genetic control of isotype expression. *J Immunol.* 126:317-321.
- ◆ Pacheco Gallego MC, Awad C, Arias G, Ojeda P, Garay MA, Lara A, Arias L. (2013). Tuberculosis extrapulmonar. Una perspectiva desde un hospital de tercer nivel. *Rev Colomb Neumol.* 25:16-26.
- ◆ Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol.* 152: 163-175.
- ◆ Parrish NM, Dick JD, Bishiai WR. (1998). Mechanism of Latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 6: 107-112.
- ◆ Pieters, J. (2001). Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. *Curr Opin Immunol.* 13: 37-44.

- ◆ Poulet S, Cole ST. (1995). Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Microbiol.* 163: 87-95.
- ◆ Rachman H, Strong M, Ulrichs T, Grode L, Schuchhardt J, Mollenkopf H, Kosmiadi GA, Eisenberg D, Kaufmann SH. (2006). Unique transcriptome signature of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 74: 1233-1242.
- ◆ Ramakrishnan L, Federspiel NA, Falkow S. (2000). Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE_PGRS family. *Science.* 288: 1436-1438.
- ◆ Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics.* 50: 213-219.
- ◆ Russell DG, Barry 3rd CE, Flynn JL. (2010). Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us. *Science.* 328: 852-856.
- ◆ Russell DG. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunol Rev.* 240: 252-268.
- ◆ Sampson SL. Mycobacterial PE/PPE Proteins at the Host-Pathogen Interface. (2011). *Clin Dev Immunol.* Vol 2011. ID 497203, 11 pages. Doi: 10.1155/2011/497203.
- ◆ Sharipo, A., Imreh, M., Leonchiks, A., Brändén, C., Masucci, M. (2001). *cis*-Inhibition of proteasomal degradation by viral repeats: impact of length and aminoacid composition. *FEBS Letters.* 499: 137-142.
- ◆ Shuck SD, Mueller H, Kunitz F, Neher A, Hoffmann H, Franken KL, Repsilber D, Ottenoff TH, Kaufmann SH, Jacobsen M. (2009). Identification of T-cell antigens

specific for latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One*. 5: e5590. doi: 10.1371/journal.pone.0005590

- ◆ Singh KK, Zhang X, Patibandla AS, Chien P Jr, Laal S. (2001). Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* expressed during preclinical tuberculosis: serological immunodominance of proteins with repetitive amino acid sequences. *Infect Immun*. 69: 4185–4191.
- ◆ Singh S, Saraav I, Sharma S. (2014). Immunogenic potential of latency associated antigens against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*. 32: 712-716.
- ◆ Talarico S, Cave MD, Marrs CF, Foxman B, Zhang L, Yang Z. (2005). Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 gene among clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 43: 4954-4960.
- ◆ Talarico S, Cave MD, Foxman B, Marrs CF, Zhang L, Bates JH, Yang Z. (2007). Association of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 polymorphism with clinical and epidemiological characteristics. *Tuberculosis*. 87: 338-346.
- ◆ Talarico S, Zhang L, Marrs CF, Foxman B, Cave MD, Brennan MJ, Yang Z. (2008). *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS16 and PE_PGRS26 genetic polymorphism among clinical isolates. *Tuberculosis*. 88: 283-294.
- ◆ Tiemersma EW, van der Werf MJ, Borgdorff MW, Williams BG, Nagelkerke NJ. (2011). Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. *PLoS One*. 6:e17601.
- ◆ Verma I, Grover A. (2009). Antituberculous vaccine development: a perspective for the endemic world. *Expert Rev Vaccines*. 8: 1547-1553.

- ◆ Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba T.J, Zumla A. (2011). Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nature reviews*. 11: 343-354.
- ◆ Wang J, Huang Y, Zhang A, Zhu C, Yang Z, Xu H. (2011). DNA polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 gene among clinical isolates of pediatric TB patients and its associations with clinical presentation. *Tuberculosis*. 91:287-292.
- ◆ Wang M, Tang ST, Justesen S, Larsen MV, Dziegel MH, et al. (2011). Identification of MHC class II restricted T-cell-mediated reactivity against MHC class I binding *Mycobacterium tuberculosis* peptides. *Immunology*. 132: 482-491.
- ◆ Winau, F., Kaufmann, H. E., Schaible, U. E. (2004). Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria. *Cell Microbiol*. 6: 599-607.
- ◆ World Health Organization. (2014). Global tuberculosis report 2014. World Health Organization, Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2014.08.
- ◆ Zumbo A, Palucci I, Cascioferro A, Sali M, Ventura M, D'Alfonso P, Iantomasi R, Di Sante G, Ria F, Sanguinetti M, Fadda G, Manganelli R, Delogu G. (2013). Functional dissection of protein domains involved in the immunomodulatory properties of PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathog and Dis*. 69, 232-239.
- ◆ Zúñiga J, Torres-García D, Santos-Mendoza T, Rodríguez-Reyna TS, Granados J, Yunis EJ. (2012). Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol*. 2012: ID193923.

