



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Identificación de los péptidos presentados en el MHC Clase II de células dendríticas estimuladas con *Mycobacterium avium*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Tania Dalet Varela Salinas

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Yolanda López Vidal.
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo. Centro Médico Nacional Siglo XXI
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes. Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Febrero, 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.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que sustentó el desarrollo de la tesis estuvo conformado por:

Dra. Yolanda López Vidal.	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo.	Centro Médico Nacional Siglo XXI
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.	Facultad de Química, UNAM

El proyecto se realizó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, SALUD-2010-C01-140998) y del proyecto DGAPA-IN214713-3.

Durante el desarrollo de la tesis la sustentante fue becario CONACYT y recibió el apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de bacterias en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

El Jurado de Examen estuvo conformado por:

PRESIDENTE	Dra. Gohar Gevorgyan Markosian.
VOCAL	Dr. Vianney Ortiz Navarrete.
VOCAL	Dr. Julio César Carrero Sánchez.
VOCAL	Dra. Patricia Gorocica Rosete.
SECRETARIO	Dra. Gladis del Carmen Fragoso González.

DEDICATORIAS

Agradezco infinitamente el apoyo de mis padres *Teresa Salinas* y *Quirino Varela*. Ambos me han enseñado la importancia de esforzarme para lograr mis metas y me brindaron su confianza para tomar las decisiones que me han formado personal y profesionalmente.

Para mis hermanos *Liliana*, *Rebeca* y *Daniel* que siempre formarán parte importante de cada uno de mis logros, contribuyendo para que no me desespere y siga adelante.

Para mis amigos fuera y dentro del laboratorio, quiénes tuvieron la paciencia de brindarme sus conocimientos sobre técnicas y temas que no manejaba, hacer que los días difíciles fueran menos pesados y sobretodo apoyarme para creer en mi capacidad para lograr este trabajo.

Cuando inicie con este proyecto pase por caídas y desafíos que no creí superar e implicó un esfuerzo de varias horas de estudio y trabajo dentro del laboratorio, poder concluir y obtener otro grado profesional me ha dado la confianza para saber que puedo realizar todo aquello que me proponga.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE GENERAL	iii
ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades del género <i>Mycobacterium</i>	1
1.2. Tuberculosis	3
1.3. Epidemiología	3
1.4. Micobacterias no tuberculosas	5
1.5. Vacunación con BCG	6
1.6. Respuesta inmune contra la tuberculosis	8
1.7. Células Presentadoras de Antígeno	9
1.8. Estructura molecular del MHC-I y MHC-II	10
1.9. El MHC clase II en el procesamiento y presentación de antígenos	13
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVO GENERAL	18
5.1. Objetivos Particulares	
6. METODOLOGÍA	19
6.1. Diferenciación de la línea celular JAWS II y estimulación con micobacterias.	19
6.1.1. Micobacterias	19
6.1.2. Línea celular	20
6.1.3. Estimulación de CD con micobacterias	21
6.2. Determinación de moléculas de superficie y secreción de citocinas en CD estimuladas.	22

6.2.1. Citometría de flujo	22
6.3. Lisis celular y separación del complejo MHC II-péptido	23
6.3.1. Lisis celular	23
6.3.2. Separación del complejo MHC II-péptido con anticuerpos unidos a perlas magnéticas	24
6.4. Purificación de péptidos unidos al MHC II	25
6.5. Geles en una dimensión	26
6.6. Separación y secuenciación de los péptidos por espectrometría de masas	27
6.6.1. Preparación de las muestras	28
7. RESULTADOS	30
7.1. Fenotipo de la línea celular JAWS II	30
7.2. Separación de los péptidos unidos al MHC Clase II	34
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	44
10. PERSPECTIVAS	45
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
12. ANEXOS	51
12.1. Preparación de reactivos	51
12.2. Tinción de Ziehl-Neelsen	56
12.3. Marcaje de moléculas de superficie en CD para citometría de flujo	56
12.4. Determinación de citocinas	57

ABREVIATURAS

ADC	Albúmina-dextrosa-catalasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Aloficocianina
APS	Persulfato de amonio
ATCC	American Type Culture Collection
BMDC	Bone Marrow-derived Dendritic Cells
BCG	Bacilo Calmette y Guérin
CD	Células dendríticas
CD4	Designación de grupo 4
CD8	Designación de grupo 8
CO₂	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígeno
Da	Daltones
DO	Densidad óptica
DS	Desviación estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Fc	Fracción cristalizante
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gravedad
G+C	Guanina + Citosina
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
h	Hora(s)
HCl	Ácido clorhídrico
Ig	Inmunoglobulina
INF-α	Interferón alfa
INF-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltones

li	Cadena invariable
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
MAA	<i>Mycobacterium avium ssp. avium</i>
MAH	<i>Mycobacterium avium ssp. hominissuis</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i>
MAS	<i>Mycobacterium avium ssp. silvaticum</i>
MAPc	Complejo constituido por ácidos micólicos, arabinogalactana y peptidoglicana
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
MNT	Micobacterias No Tuberculosas
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral beta
OADC	Ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PD-L1	Ligando 1 de PD-1
PD-L2	Ligando 2 de PD-1
PE	Ficoeritrina
pH	Potencial de hidrógeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

ssp.	Sub-especie
Tb	Tuberculosis
Th1	Respuesta T cooperadora tipo 1
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
v/v	Volumen/volumen
WHO	World Health Organization
°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetro (micra)

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfología microscópica de <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> por la tinción de Ziehl-Neelsen (100X).....	2
Figura 2. Morfología colonial de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG México en medio Middlebrook 7H10 después de 4 semanas de cultivo a 37°C.....	3
Figura 3. Incidencia mundial de la Tuberculosis en el 2014. Reporte OMS 2015.....	5
Figura 4. Estructura secundaria de la molécula MHC clase I.....	11
Figura 5. Estructura secundaria de la molécula MHC clase II.....	12
Figura 6. Representación esquemática del procesamiento y presentación de antígeno vía MHC clase II (10).....	14
Figura 7. Diagrama general de trabajo.....	19
Figura 8. Observación microscópica de células dendríticas diferenciadas de la línea celular JAWS II, ATCC CRL-11904. (40X).....	20
Figura 9. Selección positiva de los complejos MHC Clase II-péptido unidos a anticuerpos acoplados a esferas magnéticas.....	25
Figura 10. Representación esquemática en dot plot de tamaño contra granularidad celular y selección de población doble positiva CD11c+/CD11b+.....	30
Figura 11. Histogramas de la expresión de moléculas coestimuladoras, coinhibidoras y MHC Clase II en células JAWS estimuladas.....	31
Figura 12. Expresión de moléculas coestimuladoras, coinhibidoras y MHC Clase II en células JAWS II estimuladas.....	32
Figura 13. Expresión de citocinas secretadas por la línea celular JAWS II estimulada.....	33
Figura 14. Perfil proteico en las etapas del proceso de obtención de péptidos anclados al MHC Clase II de células JAWS II estimuladas con <i>M. avium</i>	35
Figura 15. Funciones y localización celular de las proteínas de <i>M. avium</i>	36

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Especies pertenecientes al Complejo <i>M. avium</i> (MAC).....	7
Tabla 2. Concentración calculada de micobacterias para estimular células JAWS II.....	22
Tabla 3. Reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida 12%.	26
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos de las secuencias peptídicas identificadas.....	35
Tabla 5. Proteínas relacionadas a las secuencias peptídicas identificadas.....	37
Tabla 6. Contenido del kit de inflamación de ratón (CBA).....	58

RESUMEN

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad crónica e infecto-contagiosa con una alta tasa de morbilidad y mortalidad principalmente en países en vías de desarrollo provocando 1.3 millones de muertes anuales. La única vacuna disponible contra la tuberculosis es la BCG (Bacilo de Calmette y Guérin) una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, sin embargo su eficacia se limita previniendo contra la tuberculosis miliar y meníngea en niños, mientras que en adultos se presenta una variabilidad del 0 al 80%; por lo que se buscan estrategias para optimizar la vacuna.

Se sugiere que la eficacia protectora de la vacuna se ve disminuida debido a diversos factores como son las diferencias genéticas entre las cepas vacunales de BCG, el fondo genético de la población y la exposición previa a micobacterias no tuberculosas (MNT) involucradas en modular la respuesta inmune. Las MNT incluyen a las especies del género *Mycobacterium* que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son aisladas de una amplia variedad de reservorios como suelo, plantas, animales y el humano; pero particularmente fuentes de agua natural y sistemas de distribución de agua.

Estudios recientes sobre el efecto de las MNT en la respuesta inmune innata, demuestran que *Mycobacterium avium* modula a células dendríticas expuestas a ella, con un fenotipo semi-maduro o tolerogénico que inhibe la activación de linfocitos T CD4+. Esto es muy importante, ya que se sabe que las células dendríticas son células presentadoras de antígeno profesionales que establecen el vínculo entre la inmunidad innata (célula dendrítica) y la adaptativa (linfocito T) mediante la presentación de péptidos específicos cargados en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, por lo que se propuso que son un punto medular para el desarrollo de una respuesta inmune eficaz de tipo Th1. En el presente trabajo se pretende identificar a los péptidos expresados en la superficie de células dendríticas diferenciadas de monocitos de la línea celular JAWS II después de ser estimuladas con *M. avium*, mismos que podrán relacionarse con un fenotipo inmune semi-maduro.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia Micobacteriaceae, orden Actinomycetales y clase Actinomycetes. En general se clasifican en tres grupos por su alto grado de similitud genética y por los síndromes clínicos que producen, las pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* entre las que figuran *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti* y *M. africanum*; las Micobacterias no tuberculosas (MNT) que son saprófitos o patógenos oportunistas de humanos y animales y *M. leprae* considerada como una MNT pero muy relacionada a *M. tuberculosis* (1,2).

Estos microorganismos son bacilos aerobios, inmóviles, que miden de 0.2 a 0.4 μm de ancho por 2 a 10 μm de largo. Presentan un alto contenido de guanina y citosina (G+C, entre el 61 y 71%) en su ADN. Su pared celular está formada por un complejo denominado MAPc constituido por ácidos micólicos, arabinogalactana y peptidoglicana además de una capa externa de polisacáridos en forma de cápsula. La peptidoglicana está formada por unidades alternadas de N-acetilglucosamina y residuos de ácido murámico, a esta se encuentra unida covalentemente la arabinogalactana que tiene esterificada una variedad de α -alquil, β -hidroxi ácidos micólicos con cadenas laterales largas de 60 a 90 átomos de carbono (1,2,3).

Las características bioquímicas de la pared que envuelve a las micobacterias hace difícil la tinción con colorantes básicos de anilina, pero es considerado Gram positivo; así mismo le permite resistir la decoloración con solventes orgánicos como el alcohol-ácido y se les denominan bacilos ácido-alcohol resistentes. Las técnicas de tinción comúnmente empleadas son la de Ziehl-Neelsen (tinción caliente) y Kinyoun (tinción fría) donde los bacilos aparecen color rojo en un fondo azul o verde dependiendo del colorante de contraste (Figura 1). También se emplea la tinción con fluorocromos con auramina O, sola o combinada con rodamina y las micobacterias se tiñen de amarillo-anaranjado contra un fondo oscuro (1,2).

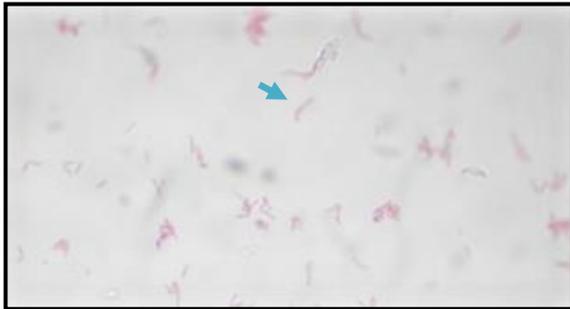


Figura 1. Morfología microscópica de *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis* por la tinción de Ziehl-Neelsen (100 x).

Para lograr su aislamiento se emplean medios de cultivos selectivos y no selectivos, el medio de Löwenstein-Jensen es muy utilizado en laboratorios de diagnóstico clínico principalmente en muestras estériles porque su composición permite el crecimiento de las micobacterias; por otro lado el medio de Middlebrook se utiliza ampliamente para el aislamiento y pruebas de sensibilidad (1,2).

Este género está representado por un gran número de especies que se diferencian por su velocidad de crecimiento, temperatura óptima de crecimiento, la producción de pigmentos y pruebas bioquímicas convencionales. Las micobacterias se subclasifican en bacterias de rápido y lento crecimiento, las primeras crecen en menos de 7 días mientras que las de crecimiento lento necesitan más de 7 días para formar colonias. La temperatura óptima de crecimiento varía en un intervalo de 28 a 42°C y crecen mejor en una atmósfera de CO₂ al 3-11%. La morfología colonial va desde colonias lisas hasta colonias con formación de cordones, se presentan con pigmentación en la oscuridad (escotocromógenas), pigmentación cuando se exponen a la luz (fotocromógenas) o colonias sin pigmentación (no fotocromógenas). Entre las pruebas bioquímicas comúnmente empleadas se encuentran la acumulación de niacina, reducción de nitratos a nitritos, hidrólisis con Tween 80®, captación de hierro, crecimiento de cloruro de sodio al 5%, actividad de catalasa, arilsulfatasa y ureasa (1,2).

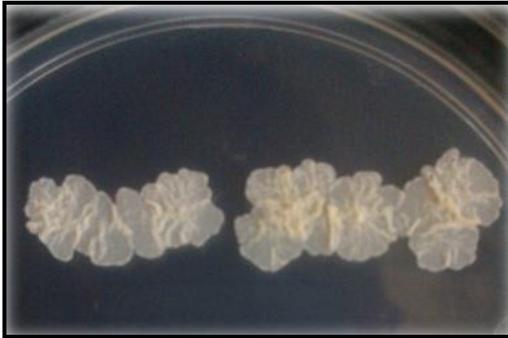


Figura 2. Morfología colonial de *Mycobacterium bovis* BCG México en medio Middlebrook 7H10 después de 4 semanas de cultivo a 37°C.

1.2. Tuberculosis

M. tuberculosis es el patógeno intracelular causante de la Tuberculosis (Tb) y fue descubierto por Robert Koch en el año de 1882. Se transmite de persona a persona mediante la inhalación de bacterias viables y del 15 al 20% de las personas infectadas desarrollan la enfermedad que por lo general aparece algunos años después de la infección inicial (4).

Las manifestaciones clínicas varían en función de la edad, estado inmunológico del paciente y la etapa en la que se encuentra la enfermedad. La enfermedad se puede desarrollar en el pulmón causando Tb pulmonar y los pacientes presentan tos que puede ir acompañada de sangre o esputo y dolor en el pecho. Otros síntomas que se presentan con las diferentes formas de Tb son debilidad o fatiga, falta de apetito con pérdida de peso, escalofríos, fiebre y sudoración por las noches (4,7).

1.3. Epidemiología

La Tb es una enfermedad crónica e infecto-contagiosa con una alta tasa de mortalidad y morbilidad alrededor del mundo. Para el 2014 la OMS estimó que 9.6 millones de personas desarrollaron Tb, lo que equivale a 133 casos por 100,000 habitantes y 1.5 millones murieron a causa de la enfermedad (1.1 millones VIH negativo y 0.4 millones VIH positivas) (6). Es una enfermedad prevalente en países en vías de desarrollo, siendo la población más vulnerable los migrantes, los habitantes de zonas marginadas,

reclusos y personas con SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida); además de infectar principalmente a hombres. Se estima que el 58% de los casos se presentan en Asia y el 28% en África. Las cinco ciudades con mayor incidencia en el 2014 son India, Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica. Del total de nuevos casos a nivel mundial 1 millón fueron niños, 3.2 millones mujeres y 5.4 millones hombres (Figura 3) (6). En México es un problema de salud pública y de acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) cada año se presentan alrededor de 15,000 casos nuevos de tuberculosis pulmonar y cerca de 2,000 defunciones (5).

Gran parte del aumento en la incidencia de Tb desde 1980 se debe a la propagación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ya que estos pacientes presentan mayor susceptibilidad para el desarrollo de la tuberculosis activa por tener un sistema inmunológico comprometido. Se estima que de 1.1 a 1.3 millones de los casos nuevos de tuberculosis en el 2014 son personas que viven con VIH (12-14%) (6).

El uso inadecuado de la terapia antituberculosa ha agravado considerablemente el problema, debido a la aparición de cepas multirresistentes o cepas resistentes a 2 ó más de las 5 drogas anti-tuberculosas de primera línea (Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol y Estreptomocina) que conllevan al uso de tratamientos más costosos que son difíciles de implementar en los países donde se presenta la enfermedad, así como la falta de un programa de inmunización eficaz para controlar la transmisión (2,6,8). En la actualidad otros factores de riesgo asociados con Tb son el abuso de drogas intravenosas, alcoholismo, diabetes, desnutrición, prolongado uso de esteroides, falla renal, trasplantes de órganos y enfermedades respiratorias crónicas (7).

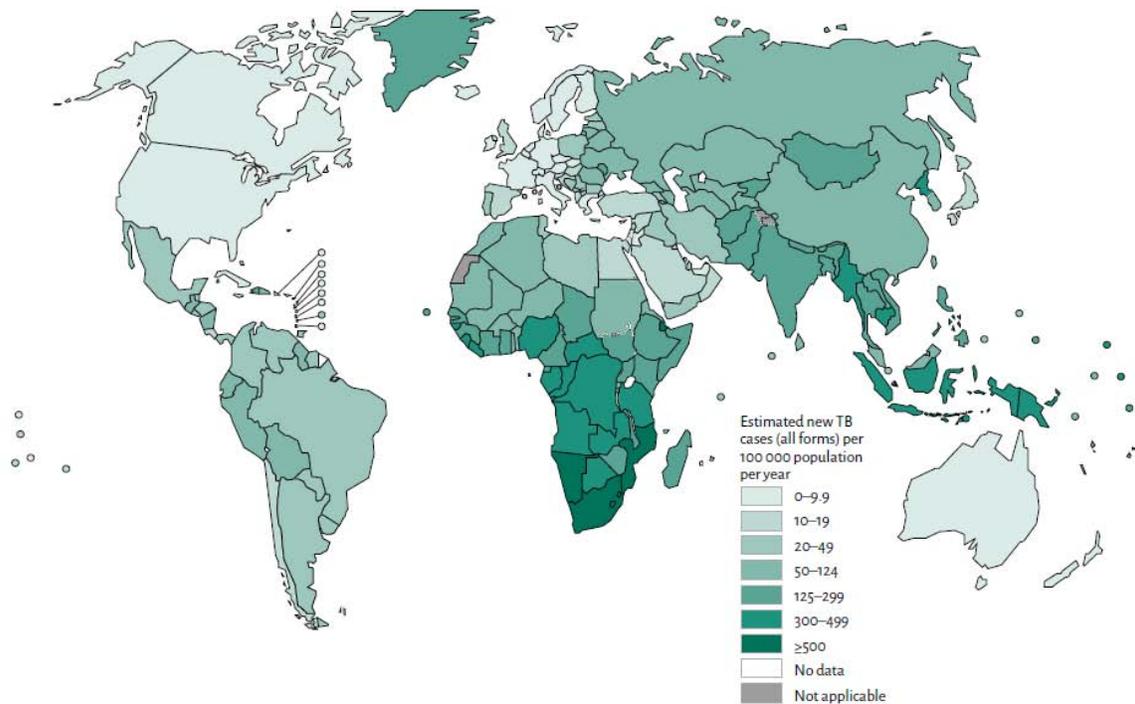


Figura 3. Incidencia mundial de la Tuberculosis en el 2014. Reporte OMS 2015. (6)

1.4. Micobacterias no Tuberculosas

Las MNT son saprofitas y patógenos oportunistas que se aíslan de una gran variedad de reservorios como agua, suelo, plantas, animales y humanos; diversos estudios muestran que son altamente resistentes a los métodos clásicos de desinfección. Se han identificado más de 140 diferentes especies de MNT con un amplio espectro de virulencia para causar enfermedades en los humanos (8).

Las infecciones causadas por MNT antes de la epidemia del SIDA estaban confinadas a enfermedades pulmonares relacionadas a *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium avium*, que por lo general afectaban hombres adultos alrededor de los 60 años y que presentaban una predisposición clínica o laboral en sitios de alto riesgo. Sin embargo, después de la diseminación del virus cambió radicalmente la presentación de la enfermedad involucrando principalmente a *M. tuberculosis* y al complejo MAC (*M. avium* complex). Tan solo en Estados Unidos y Europa entre el 25 y 50% de pacientes con SIDA presentan también una infección por

MNT, sin embargo el uso de la terapia retroviral en etapas tempranas puede disminuir considerablemente estas infecciones. Los microorganismos se aislan comúnmente de sangre y materia fecal, además de que los paciente presentan problemas digestivos, anemia, leucopenia y predisposición a infecciones por citomegalovirus. El aumento de estas infecciones estimuló el inicio de estudios de epidemiología, ecología, genética, biología molecular y fisiología de las MNT, además del desarrollo de métodos para el aislamiento y purificación más eficientes (8).

En la actualidad y después del análisis de varias pruebas fenotípicas y genotípicas por varios grupos de trabajo se han descrito varios organismos pertenecientes al complejo MAC que se han asociado tanto al ambiente como animales y que presentan diferentes grados de patogenicidad. Dicho complejo comprende 9 especies de micobacterias de crecimiento lento y un grupo denominado otras MAC que corresponden a aislados de clasificación indeterminada (Tabla 1) (48).

Mycobacterium avium ssp. *hominissuis* (MAH) es un patógeno oportunista de humanos y porcinos, pero también ha sido aislado de otros animales como vacas, perros, caballos, aves y venados. Su reservorio natural es el suelo y el agua, sobreviviendo en este último por más de 2 años. La forma de transmisión de la bacteria es mediante la ingestión de agua contaminada y aerosoles. A nivel clínico este patógeno intracelular facultativo es capaz de provocar infecciones pulmonares, linfadenitis cervical, infecciones diseminadas y en tejidos suaves, atacando principalmente a personas con ineficiente respuesta de células T (36, 48).

1.5. Vacunación con BCG

La vacuna de Calmette y Guérin (BCG) es un liofilizado de una cepa atenuada de *M. bovis* que se utiliza para vacunar a personas susceptibles de adquirir la enfermedad y en lactantes y niños proporciona una protección contra las formas meníngea y diseminada de la tuberculosis; sin embargo, en adultos la protección varía del 0 hasta el 80%. Esta vacuna forma parte del programa ampliado de inmunización (EPI por sus

Tabla 1. Especies pertenecientes al Complejo *M. avium* (MAC).

Micobacteria	Sub-especie	Patogenicidad	Principal hospedero
<i>M. avium</i> (MA)	<i>ssp. avium</i> (MAA)	Tb aviar	Aves
	<i>ssp. hominissuis</i> (MAH)	Infecciones pulmonares, linfadenitis cervical, infección de tejidos suaves e infecciones diseminadas	Humanos, porcinos
	<i>ssp. paratuberculosis</i> (MAP)	Enfermedad de Johne's	Rumiantes
	<i>ssp. silvaticum</i> (MAS)	Enfermedad similar a la Tb	Palomas
<i>M. intracellulare</i>		Infecciones pulmonares	Humano
<i>M. colombiense</i>		Infecciones diseminadas, linfadenopatias	Humano
<i>M. chimaera</i>		Infecciones pulmonares	Humano
<i>M. marseillense</i>		Infecciones pulmonares	Humano
<i>M. timonense</i>		Infecciones pulmonares	Humano
<i>M. boucherdurhonense</i>		Infecciones pulmonares	Humano
<i>M. vulneris</i>		Linfadenopatias, heridas	Humano
<i>M. arosiense</i>		Osteomelitis	Humano
Otras-MAC		Infecciones pulmonares y diseminadas	Humano

Rindi L, 2014.

siglas en inglés, Expanded Program on Immunization) desde 1970 y la organización mundial de la salud (OMS) recomienda que la aplicación de la vacuna sea durante el primer año de vida y principalmente en países en vías de desarrollo. (9,11).

En los últimos años se ha observado que la incidencia de la tuberculosis a pesar de la vacunación es todavía considerable y que la BCG presenta variabilidad en su eficacia, sugiriéndose diversas teorías que avalan este hecho como lo son la susceptibilidad genética del huésped, la pérdida paulatina de la protección, la prevalencia de la enfermedad en zonas geográficas específicas, cepas más virulentas, diferente inmunogenicidad de las cepas vacunales o heterogeneidad genética de las cepas individuales y la exposición previa a MNT. Se ha demostrado en algunos estudios que la exposición previa con micobacterias ambientales afecta negativamente la protección conferida por la BCG en respuesta a una infección por *M. tuberculosis*. (9, 10, 18, 32, 33, 34, 35, 37).

Por lo tanto es de suma importancia el desarrollo de nuevas vacunas que confieran completa protección y con los recientes adelantos en los campos de genómica, proteómica y con el conocimiento más profundo de la inmunología de las infecciones contribuirá en la preparación de nuevas generaciones de vacunas que ayuden a prevenir y tratar la tuberculosis.

1.6. Respuesta inmune contra la Tuberculosis

La respuesta inmunitaria es un mecanismo de defensa que presenta un organismo después de que entra en contacto con un microorganismo o macromolécula ajena, para lo cual emplea un conjunto de células y moléculas pertenecientes al sistema inmunitario. *M. tuberculosis* estimula una respuesta inmunitaria de tipo celular y humoral, constituyendo las células T tipo 1 (Th1) la respuesta inmune de protección (8,12).

La forma de transmisión es respiratoria y se da de persona a persona. Después de la inhalación de los microorganismos estos viajan a bronquiolos terminales y alvéolos donde serán fagocitados por macrófagos alveolares y se multiplican lentamente presentándose una inflamación leve; después de 6 u 8 semanas la infección llega a ganglios linfáticos regionales con la activación de linfocitos T CD4+ y posteriormente linfocitos T CD8+ que producen INF- γ para la activación de más macrófagos que se encargaran de destruir al microorganismo; sin embargo, *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir intracelularmente porque inhibe la fusión del fagosoma con el lisosoma. La activación continua de los linfocitos T conduce a la formación de granulomas con necrosis caseosa debido a la secreción de enzimas lisosómicas e intermediarios reactivos de oxígeno producidos por los agregados de macrófagos que aunado a la inflamación granulomatosa promueven la lesión hística característica de la tuberculosis clínica. La bacteria puede permanecer en estado latente durante varios años y reactivarse en cualquier momento, sobre todo cuando el paciente no es capaz inmunológicamente de controlar la infección (4,12).

1.7. Células Presentadoras de Antígeno

Las células presentadoras de antígeno (CPA) constituyen una población celular especializada que presenta diferentes características como son la captura de antígenos proteicos propios o extraños, maquinaria proteolítica eficiente que permita la degradación del antígeno en péptidos capaces de ser presentados en la superficie celular por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I ó clase II (Major Histocompatibility Complex, MHC I ó MHC II) y así presentarlos a los linfocitos T para desencadenar señales que estimulen su proliferación y diferenciación, además de expresar moléculas coestimuladoras y de adhesión. Se conocen tres células profesionales capaces de llevar a cabo dichas funciones: los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas (CD). Los macrófagos presentan antígenos a los linfocitos T efectores durante la respuesta inmune celular, los linfocitos B presentan antígenos a los linfocitos T cooperadores en la inmunidad humoral y las CD presentan antígenos a células T vírgenes generando la expansión clonal y diferenciación de células T.

Las CD fueron descubiertas a finales de 1970 por Ralph Steinman y Zanvil Cohn y varias décadas después se sabe que tienen la habilidad de montar una respuesta inmune adaptativa contra antígenos extraños e inducir tolerancia contra antígenos propios. (20)

En estado inmaduro presentan gran capacidad de capturar antígenos y una maquinaria proteolítica eficiente, aumentan la expresión de receptores de manosa y complemento implicados en la captación de antígeno vía endocitosis o fagocitosis, expresan altos niveles de quimiocinas como CCR1 y CCR5, expresan bajos niveles de moléculas coestimuladoras como CD40, CD54, CD80, CD83, CD86, CD58 y MHC II. Una vez que el antígeno es fagocitado las CD migran rápidamente a órganos linfoides secundarios en donde macrófagos y células B generalmente son excluidos; pasan a un estado “maduro” que se caracteriza por la elevada expresión de moléculas coestimuladoras y proinflamatorias, las moléculas de MHC II cargadas con los péptidos salen de los compartimentos lisosomales y son transportados a la membrana celular; dichos complejos son de 10 a 100 veces más expresados en CD que en otras CPA (12, 13, 14, 15, 20, 26).

1.8. Estructura molecular del MHC I y MHC II

Las CD expresan en su superficie celular dos tipos de proteínas pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad, denominados MHC clase I y MHC clase II, las primeras inician una respuesta de linfocitos T CD8+ citotóxicos y las segundas provocan una respuesta de linfocitos T CD4+ cooperadores. Todas las moléculas del MHC comparten determinadas características estructurales las cuales son fundamentales para la presentación y reconocimiento de los péptidos (31).

Los genes que codifican el MHC se localiza en el cromosoma 17 en ratones y recibe el nombre de H-2; el locus de la clase I está formado por los genes K, D y L mientras que el locus de la clase II por los genes I-A, I-E y H-2M; además se localizan genes codificantes para proteasoma, proteínas del complemento y citocinas (12).

El MHC clase I está formado por dos cadenas polipeptídicas unidas covalentemente, una cadena α o cadena pesada de 44 a 47 kDa codificada por los genes del MHC y una cadena β -2 microglobulina o cadena ligera de 12 kDa no codificada por estos genes. Los segmentos amino terminal de la cadena α interactúan formando una plataforma de 8 hebras antiparalelas tipo beta que soportan dos hebras paralelas tipo alfa-hélice, formándose una hendidura con los extremos cerrados para la unión de péptidos de entre 8 y 11 aminoácidos (Figura 4). Los aminoácidos polimorfos se encargan de la unión de los péptidos y el reconocimiento de los linfocitos T, localizados en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Un segmento más denominado $\alpha 3$ es el punto de unión de linfocitos CD8 e interactúa no covalentemente con la cadena β -microglobulina (12, 13).

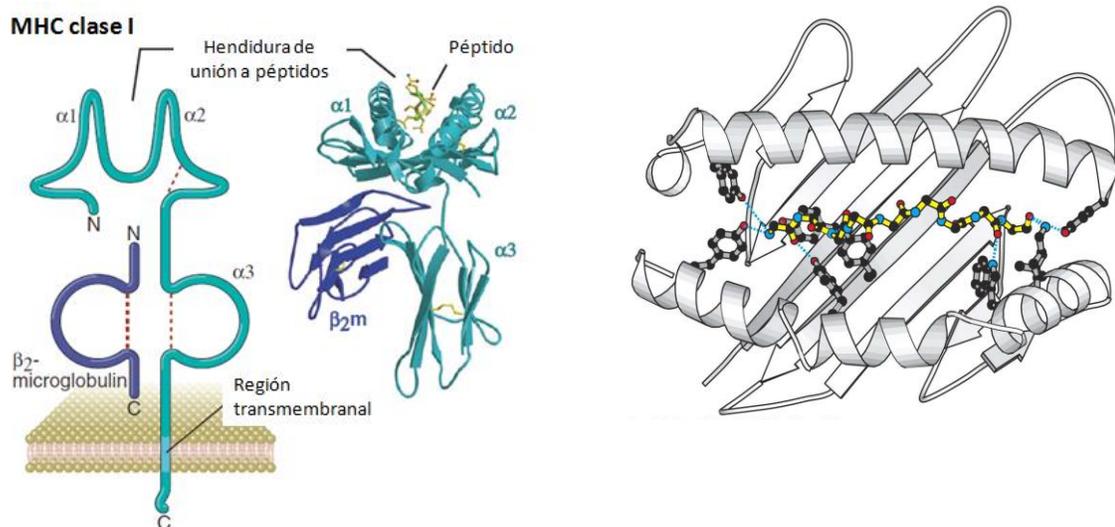


Figura 4. Estructura secundaria de la molécula MHC clase I (12).

Las moléculas del MHC clase II están compuestas por dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente, una cadena α de 32 a 34 kDa y una cadena β de 29 a 32 kDa, ambas codificadas por genes polimorfos del MHC y se sintetizan en el retículo endoplásmico, a las que posteriormente se une una cadena invariable (Ii) no polimórfica. Los segmentos amino terminales $\alpha 1$ y $\beta 1$ interactúan para formar una hendidura que une los péptidos. Tanto $\alpha 1$ como $\beta 1$ están formadas por cuatro hebras del suelo de la hendidura y una hélice, además en estos segmentos se localizan los aminoácidos polimorfos. En la hendidura se asocian péptidos heterogéneos que miden de 12 a 26 aminoácidos que son seleccionados como familias con un núcleo de unión común de aproximadamente 9 aminoácidos y con extremos variables (30) (Figura 5). Los extremos carboxílicos terminales de los segmentos $\alpha 2$ y $\beta 2$ presentan extensiones de unos 25 aminoácidos hidrofóbicos transmembranales y finalizan con grupos de aminoácidos básicos seguidos de colas cortas citoplásmicas hidrofílicas. Un segmento en $\beta 2$ es el punto de unión para linfocitos T CD4+ (12, 13, 38).

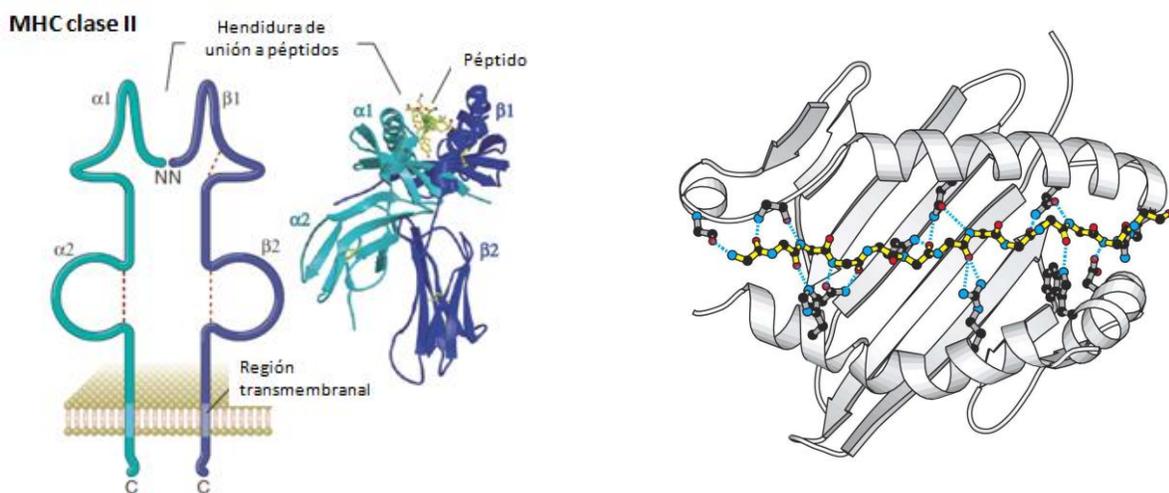


Figura 5. Estructura secundaria de la molécula MHC clase II (12).

1.9. El MHC clase II en el procesamiento y presentación de antígenos

La generación de péptidos unidos a moléculas del MHC clase II inicia con la captación de las proteínas típicamente exógenas por las CD mediante receptores en la superficie que reconocen estructuras para posteriormente interiorizarlos en vesículas denominadas lisosomas o endosomas tardíos, donde los antígenos proteicos son degradados por acción enzimática a péptidos; principalmente las proteasas son las encargadas de la degradación de estas proteínas como las catepsinas con alta especificidad de sustrato, como S, L, B, D y la endopeptidasa específica de asparagina. Algunos antígenos cargados en el MHC Clase II pueden provenir de proteínas endógenas residentes en el sistema endosomal, citosol o núcleo. La regulación de la acidificación lisosomal aparentemente es un elemento importante en el control de la presentación de antígeno durante la maduración de la CD, el pH de 4.5 se encuentra durante procesos de proteólisis y carga de péptidos mientras que a pH 1 se induce la formación del complejo MHCII-péptido, disociación de Ii y edición de péptidos por HLA-DM (13,14).

Las cadenas α y β se sintetizan y asocian de manera coordinada en el retículo endoplásmico, al igual que la cadena invariable (Ii) que se une a un heterodímero $\alpha\beta$ recién sintetizado, bloqueando la unión de péptidos en los sitios correspondientes. La cadena Ii también favorece el plegamiento y ensamblaje del MHC II y las dirige a las vesículas que contienen los antígenos proteicos degradados, formándose un compartimento del MHC de la clase II ó MIIC donde se inicia la proteólisis parcial de la cadena Ii de las moléculas del MHC II mediante la acción de proteasas residentes, especialmente la catepsina S y L formando un residuo de 24 aminoácidos unido al complejo $\alpha\beta$, denominado péptido de la cadena invariable asociada a la clase II ó CLIP, el cual se encuentra unido a los sitios de unión de los péptidos que se fijan al MHC II y es necesario eliminarlo. Mediante la molécula H-2M (o HLA-DM) como péptido editor es reemplazado el CLIP por el péptido antigénico que se une a los extremos abiertos de las moléculas del MHC-II y posteriormente son recortadas por otras enzimas proteolíticas hasta tener el tamaño adecuado para ser reconocidos por los linfocitos T

(Figura 6). H-2M es un heterodímero similar a MHC-II que se localiza en el compartimento MIIC promoviendo la liberación y unión de péptidos determinando la cantidad y calidad de péptidos seleccionados; sin embargo, se diferencian del MHC II porque es una molécula no polimórfica, no se asocia a la cadena li y no se expresa en la superficie celular. Los complejos del MHC II-péptidos son altamente estables y tienen una vida media prolongada regulada por la proteína transmembranal E3 ubiquitin-ligasa MARCH-1, lo que aumenta la probabilidad de ser encontrados y reconocidos por un linfocito T específico. Las moléculas de MHC Clase II son transportadas hacia la membrana plasmática ya sea vía túbulos desde el MIIC o por fusión directa de la membrana con el MIIC (13, 14, 31, 32, 52, 53).

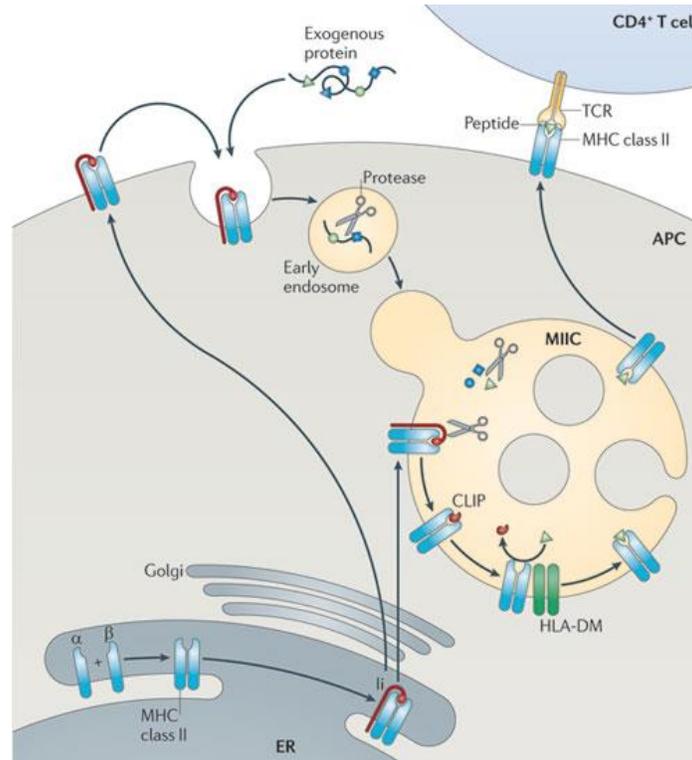


Figura 6. Representación esquemática del procesamiento y presentación de antígeno vía MHC clase II (51).

Una variedad de factores afectan la bioquímica en el procesamiento de antígeno lo que contribuye en la diversidad de complejos MHCII-péptido lo que conlleva a la dificultad en la predicción de los péptidos presentados. Entre algunos de estos factores se

encuentran las modificaciones post-traduccionales, células tumorales y alteraciones bioquímicas como acetilaciones, fosforilaciones y glicosilaciones (13).

2. ANTECEDENTES

Dentro del grupo de trabajo, Mendoza y cols. en el 2011 estudiaron la interacción de MNT como *M. avium* con CD diferenciadas de monocitos de médula ósea de ratón y encontraron que estas inducen la secreción de IL-10 así como altos niveles en la expresión de la molécula coinhibidora PD-L2, ambas a través de la vía de señalización TLR2-p38 MAPK, además al comparar con células estimuladas con LPS o con *M. bovis* BCG Phipps como controles positivos observaron la disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras, lo que interfirió en la activación de células T. Aún más interesante el fenotipo inducido en estas células por *M. avium* es dominante incluso en presencia de BCG (18). Como Flaherty y cols también demostraron en un modelo *in vivo* de ratones vacunados con BCG Pasteur y después de 6 semanas retados con *M. avium* 104, esta interfirió en el establecimiento de una respuesta inmune de protección (10).

Se sabe que la respuesta inmune celular contra antígenos propios y extraños depende del reconocimiento de péptidos presentados en la superficie de células presentadoras de antígeno profesionales como las CD a linfocitos T CD4+; dichos péptidos son derivados del procesamiento de proteínas exógenas y anclados a la moléculas de MHC Clase I ó II (54).

Por lo tanto, el conocimiento de los péptidos presentados en el MHC Clase II cuando la CD es estimulada con *M. avium*, nos ayudará a complementar las investigaciones previamente realizadas y sobre todo conocer cuales proteínas presentes en la micobacteria son las responsables de la tolerancia.

3. JUSTIFICACIÓN

Las células dendríticas estimuladas con *Mycobacterium avium* desarrollan un fenotipo semi-maduro y la expresión de la molécula de MHC Clase II se asocia con péptidos de la micobacteria internalizada vía endocitosis. Por lo tanto, la expresión de péptidos de *M. avium* podría estar asociada a la tolerancia inmunológica.

4. HIPÓTESIS

Si el fenotipo semi-maduro de las células dendríticas es inducido por *Mycobacterium avium*, entonces algunos de los péptidos presentados en el contexto de MHC Clase II pertenecerán a dicha micobacteria.

5. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar los péptidos presentados en el MHC clase II de CD post-estimulación con *M. avium* ssp. *hominissuis*.

5.1. Objetivos Particulares

- Diferenciación de monocitos de la línea celular JAWSII a CD.
- Estimulación de CD con *M. avium* ssp. *hominissuis* y *M. bovis* BCG México en fase exponencial.
- Determinación del fenotipo de las CD post-estimulación.
- Separación del complejo MHC-II-péptido de CD.
- Purificación y secuenciación de los péptidos.

6. METODOLOGÍA

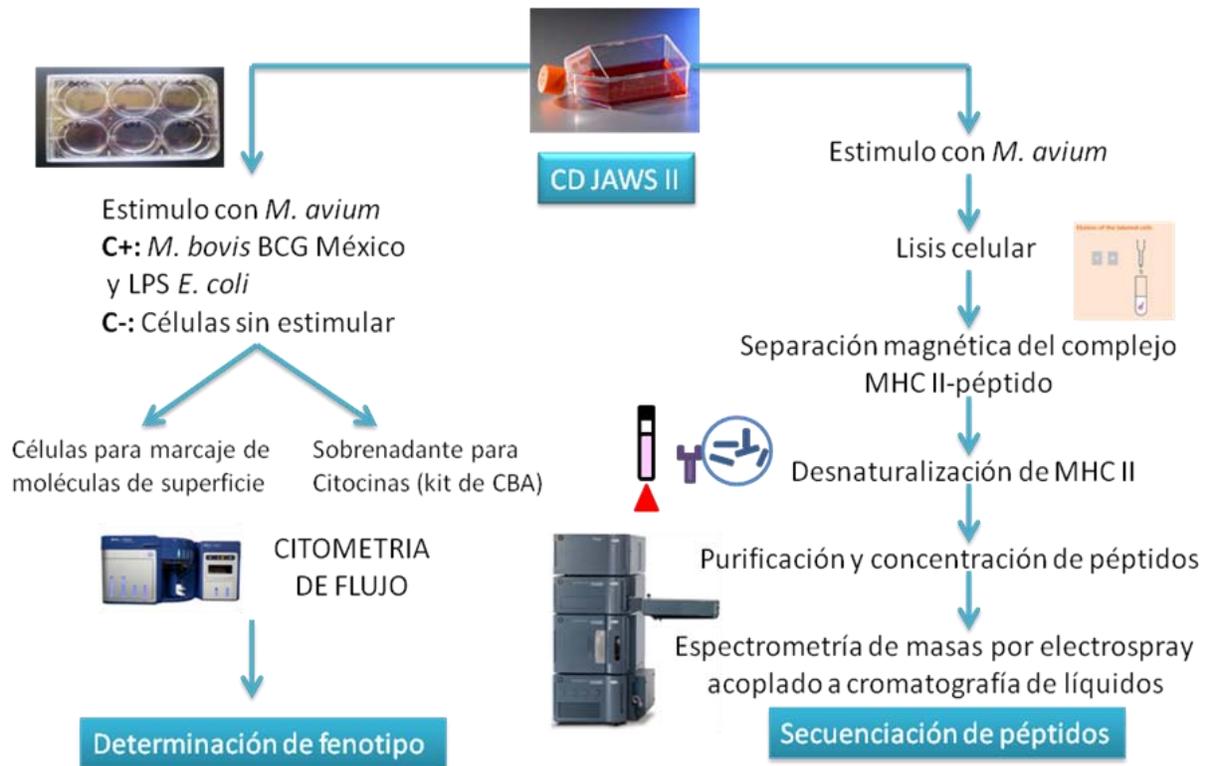


Figura 7. Diagrama general de trabajo.

6.1. Diferenciación de la línea celular JAWS II y estimulación con micobacterias

6.1.1. Micobacterias

La cepa de *M. avium* ssp. *hominissuis* pertenece al Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM y fue aislada del agua de los canales de Xochimilco, México (17). La identificación se realizó por análisis del polimorfismo de los genes *hsp65*, *rpoB2* y *16S RNAr* (17) (Datos no mostrados).

M. avium ssp. *hominissuis* y *M. bovis* BCG México se recuperaron en caldo Middelbrook7H9 enriquecido con Albúmina-Dextrosa-Catalasa (ADC, Becton Dickinson). Los cultivos se mantuvieron en agitación constante (150 rpm) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.6. La cosecha se realizó centrifugando a 400 xg durante 15 min y el paquete bacteriano se almacenó en alícuotas con PBS 1X y Glicerol al 10% a -70° C hasta su uso.

6.1.2. Línea Celular

Se utilizó la línea celular de monocitos de medula ósea de ratón JAWS II (ATCC, CRL-11904) (29) proporcionada por el Dr. Luis Ignacio Terrazas de la FES Iztacala, Unidad de Biomedicina del Laboratorio de Inmunoparasitología.

Las células se cultivaron en botellas de cultivo celular con medio RPMI 1640 suplementado con 1 mM de Piruvato de Sodio (GIBCO, Invitrogen Corporation), 1.5 gr de Bicarbonato de Sodio (Sigma Aldrich), 10% de Suero Fetal Bovino [SFB (GIBCO, Invitrogen Corporation)] y 5 ng/mL de GM-CSF Recombinante [Factor de crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos (Peprotech México)]. Con el cultivo mencionado anteriormente las células se diferenciaron a células dendríticas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ (Figura 8).

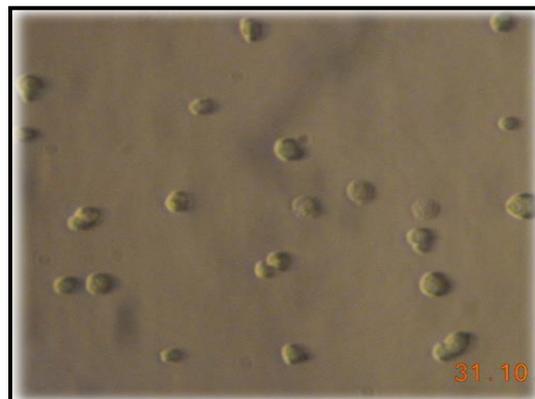


Figura 8. Observación microscópica de células dendríticas diferenciadas de la línea celular JAWS II, ATCC CRL-11904. (40X).

La línea celular se almacenó en nitrógeno líquido como método de conservación a largo plazo, para lo cual, células crecidas en botellas de cultivo celular de 175 cm² (Nunc™ sin tratamiento, Thermo Scientific) se lavaron 2 veces con una solución de PBS 1X y EDTA 0.5 mM para posteriormente despegar con Tripsina 0.25% (GIBCO, Invitrogen Corporation). Las células despegadas se transfirieron a un tubo falcón y se centrifugaron a 400 xg durante 5 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió en 2 mL de medio RPMI 1640.

En cada criotubo se guardan como máximo 1x10⁶ células, por lo tanto se realizó el conteo celular empleando una dilución 1:10 de la suspensión celular con el colorante azul de tripano (GIBCO, Invitrogen Corporation). Un volumen de dicha dilución se deposita entre la cámara de Neubauer y el cubrecámara para realizar el conteo de células en los 4 cuadrantes superiores e inferiores. El número total de células contadas en los 4 cuadrantes se divide entre 4, se multiplica dicho número por el factor de dilución (10), el área y volumen de la cámara (1x10⁴) y por el volumen de la suspensión celular total (2 mL) y se determina el número de células por mililitro.

Dependiendo del número de células contadas se realizó una dilución de la suspensión celular con Dimetilsulfóxido estéril (DMSO) al 10 % utilizando SFB filtrado y finalmente se dispensó 1 mL de la suspensión a cada criotubo para almacenar.

6.1.3. Estimulación de CD con micobacterias

Células JAWS II crecidas en botellas de cultivo celular multinivel de 500 cm² (Nunc™ sin tratamiento, Thermo Scientific) con 150 mL de medio RPMI 1640 suplementado se despegaron y contaron 1x10⁷ células. Se utilizaron 600,000 células por pozo y se depositaron en microplacas de 6 pozos (Nunc™ sin tratamiento 128x86, Thermo Scientific) con 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado, bajo las siguientes condiciones por triplicado: células sin estímulo o estímulo con *M. bovis* BCG México o *M. avium* ssp. *hominissuis* o lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 2 µg/mL.

También se determinó la densidad óptica a 600 nm de las micobacterias y se realizaron los cálculos para determinar el volumen de cultivo bacteriano necesario en cada pozo para obtener una MOI 1:2 (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración calculada de micobacterias para estimular células JAWS II.

	DO 600nm	Bacterias/mL	Volumen de cultivo
<i>M. avium</i>	0.793	1.2×10^8	10 μ L
BCG México	0.682	3.5×10^8	3.5 μ L

Los estímulos se realizaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación las células y el sobrenadante de cada estímulo se depositaron en tubos falcón estériles de 15 mL y se centrifugaron a 400 xg durante 5 min a temperatura ambiente; el sobrenadante se separó y almacenó en tubos eppendorf de 1.5 mL a -20°C para la determinación de citocinas, por otra parte a las células se les realizó la determinación de moléculas de superficie (Ver Anexo 12.3).

6.2. Determinación de moléculas de superficie en CD y secreción de citocinas en sobrenadante

6.2.1. Citometría de flujo

Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de diferentes marcadores de superficie utilizando anticuerpos unidos a Ficoeritrina (PE), Aloficocianina (APC) o Isotiocianato de fluoresceína (FITC): antiCD40-PE [BD Pharmingen], antiCD80-PE [BD Pharmingen], antiCD86-PE [BD Pharmingen], antiPD-L2-PE CD273 [BD Pharmingen], anti PD-L1-P CD274 [BD Pharmingen] y antiMHC Clase II-PE (Miltenyi Biotec). Las células también fueron marcadas con el anticuerpo antiCD11b-FITC [BD Pharmingen] y antiCD11c-APC [BD Pharmingen] para la identificación de CD (Ver Anexo 12.3). Las células JAWS II se resuspendieron en Focusing Fluid 1X (applied biosystems, Attune) para su análisis por citometría de flujo (applied biosystems, Attune).

Las citocinas fueron determinadas en el sobrenadante de las células estimuladas empleando el Kit de Inflamación de ratón, BD Cytometric Bead Array (CBA) (Becton Dickinson) para medir cuantitativamente IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70. El ensayo fue diseñado siguiendo las instrucciones de manufactura y los datos analizados en el citómetro FACSCanto II (BD Biosciences). La concentración de cada citocina en los sobrenadantes fue extrapolada en una curva estándar con concentraciones conocidas de citocinas recombinantes (20 a 5000 pg/mL).

6.3. Lisis celular y separación del complejo MHC II-péptido

6.3.1. Lisis celular

Células JAWS II se cultivaron en 5 botellas de cultivo celular multinivel de 500 cm², se despegaron y contaron 5.8×10^8 células, las cuales fueron estimuladas con *M. avium* ssp. *hominissuis* (MOI 1:2) durante 24 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Al finalizar la incubación, las células se despegaron de las 5 cajas multinivel y concentraron en tubos Falcón estériles de 50 mL para después resuspender el paquete celular en 5 mL de solución para lisis.

Para la lisis celular se empleó una solución de CHAPS 1% (3-[(3-Cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato) [Sigma-Aldrich Inc.], Iodoacetamida 0.1 mM, EDTA 5 mM (Etilendiaminatetracetato) [Sigma-Aldrich Inc.], PMSF 1mM (Fluoruro de fenilmetil sulfonilo) [Sigma-Aldrich Inc.], Cocktail Inhibidor de Proteasas *complete* 1:50 [Roche] en Tris-HCl 50 mM pH 8 [Sigma-Aldrich Inc.] a 4°C durante 45 minutos en rotación.

La suspensión celular lisada se centrifugó a 6500 xg durante 30 min. Las proteínas del sobrenadante ó suspensión celular lisada (5 mL) se concentraron en tubos Amicon® Ultra Centrifugal Filters con filtros de 3 kDa. Los filtros se acondicionaron y humedecieron con 3 lavados de etanol al 10% durante 30 min cada uno a 2000 xg a 4°C, se retiró el etanol remanente del tubo y el filtro, se depositó la suspensión celular lisada y centrifugó a 2000 xg a 4°C durante 2 horas hasta obtener un volumen final de 600 μ L y realizar la separación de los complejos MHC II-péptido.

6.3.2. Separación de los complejos MHC II-péptido con anticuerpos unidos a perlas magnéticas

Los complejos MHC Clase II-péptido se separaron empleando anticuerpos anti MHC Clase II unidos a perlas magnéticas (Figura 9), siguiendo la metodología descrita a continuación:

1. El marcaje con anticuerpos se realizó empleando 540 μ L de la suspensión celular lisada concentrada más 60 μ L del anticuerpo anti-MHC II (MicroBeads, Miltenyi Biotec). Se incubó a 4°C durante 15 min.
2. Previamente el separador magnético autoMACS, la columna LS y el buffer (PBS 1X + 2 mM EDTA) se refrigeraron a 4°C para realizar todo el procedimiento bajo estas condiciones.
3. La columna se colocó dentro del campo magnético y se realizó un lavado de 3 mL con buffer, impidiendo que la columna se seque.
4. La suspensión celular lisada concentrada y marcada se pasó a través de la columna. Las proteínas no unidas a la columna o fracción negativa se recolectaron y fueron recibidas sobre una cama de hielo.
5. Se realizaron 3 lavados con 3 mL de buffer y también se recolectaron los lavados.
6. Finalmente se depositaron 5 mL del buffer en la columna y se retiró del campo magnético, colocando el émbolo, presionando fuerte y de un solo golpe para recolectar los complejos MHC II-péptido que se unieron al anticuerpo anti-MHC II ó fracción positiva.

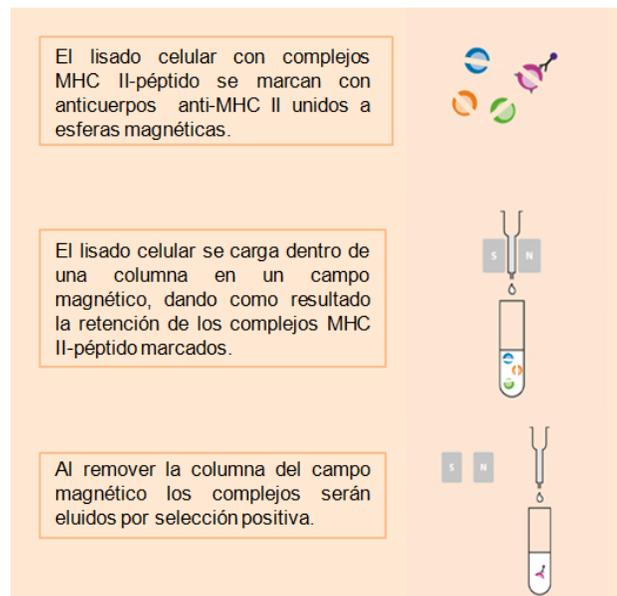


Figura 9. Selección positiva de los complejos MHC Clase II-péptido unidos a anticuerpos acoplados a esferas magnéticas.

Se recolectaron alícuotas correspondientes a la fracción negativa y una alícuota de 5 mL correspondiente a la fracción positiva durante el proceso y se determinó la concentración de proteína en el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) a la absorbancia de 280 nm.

6.4. Purificación de péptidos unidos al MHC II

Los complejos MHC II-péptido-anticuerpo (5 mL) se calentaron a 70°C durante 10 min para separar los péptidos del MHC Clase II e inmediatamente después se almacenaron a 4°C.

La solución desnaturalizada se paso a través de tubos Amicon® Ultra Centrifugal Filters con filtros de 10 kDa y se centrifugaron a 2000 xg durante 30 min. Se realizaron 3 lavados con 2 mL de agua para lavar y purificar la mayor cantidad de péptidos. El volumen final obtenido fue de 10 mL. Después de la separación de los péptidos, también se determinó la concentración de proteína en el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) a la absorbancia de 280 nm.

6.5. Geles en una dimensión

Durante la purificación de los péptidos unidos al MHC II se almacenaron diferentes alícuotas que correspondieron a las etapas llevadas a cabo en dicho proceso. Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (Tabla 3).

Tabla 3. Reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida 12%.

	Gel compactador al 12% (mL)	Gel separador al 12% (mL)
H₂O Desgasificada	3.5	5.8
Acrilamida y bis-acrilamida 30%	7.5	1.65
Tris 1.5 M pH 8.8	3.8	0
Tris 0.5 M pH 6.8	0	2.5
Persulfato de amonio (APS 10%)	0.15	0.1
Docecilsulfato de sodio (SDS 10%)	0.15	0.94
Tetrametiletiléndiamina (TEMED)	0.006	0.0065

1. Para preparar el gel separador (inferior) se mezclaron todos los reactivos mencionados en la tabla y al final se adicionó el TEMED para iniciar la polimerización e inmediatamente después verter la solución en el molde para gel hasta 1.5 cm antes del borde. Se adicionó isopropanol al 70% para evitar la formación de burbujas y el gel tuviera un frente horizontal. Después de que el gel polimerizó, se retiró el exceso de isopropanol utilizado.
2. Se mezclaron los reactivos del gel compactador (superior) y una vez agregado el TEMED, la mezcla se vertió en el molde para gel con el gel separador polimerizado y se niveló el peine a su posición horizontal sin atrapar burbujas. Se dejó polimerizar y quitó el peine deslizándolo suavemente.

3. Los geles se colocaron en la cámara de electroforesis y se llenaron con buffer de corrida 1X (cámara inferior y superior).
 4. Las muestras se prepararon con 20 μ L de Buffer de Laemmli + β -mercaptoetanol y 20 μ L de la muestra a una concentración de 25 μ g. Se colocaron en baño de agua durante 5 min y en los pocillos se cargaron los 40 μ L de la mezcla. También se incluyeron marcadores de Masa Molecular (MM) Precision Plus Protein Standards de 10 a 250 kD (Dual Color, Bio Rad) en uno de los carriles, como referencia.
 5. Las muestras se mantuvieron por 2 h a 100 V.
 6. El gel se retiró de la cámara para electroforesis y se sumergió en solución de fijación durante 1 h.
 7. El gel se dejó teñiendo durante 4 h con solución Silver Blue. El exceso de colorante se eliminó empleando solución para desteñir durante toda la noche y en agitación.
 8. Las imágenes de los geles teñidos se capturaron en un formato digital empleando un densitómetro (Molecular Imager GS-800TM Calibrated Densitometer, Bio Rad Laboratories) mediante el programa Quantity OneTM 1-D Analysis Software (Bio Rad Laboratories).
- 6.6. Separación y secuenciación de los péptidos mediante espectrometría de masas.**

El volumen final obtenido de péptidos (10 mL) fue liofilizado y enviado a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química para la separación y secuenciación de péptidos.

6.6.1. Preparación de la muestra

La muestra liofilizada se disolvió en agua grado LC-MS [J.T. Baker], Acetonitrilo 97.3% grado LC-MS [J.T. Baker] + Ácido fórmico 0.1% grado reactivo analítico [J.T. Baker]. Se determinó la cantidad de proteína y se procesaron 4 µL (mínimo 200 ng por cada µL) de muestra que se evaporó hasta sequedad y se reconstituyó en un buffer 6M de Urea en 100 mM Tris-HCl pH 8.5 e incubó durante 15 min para proceder con la reducción y alquilación durante 1 h. Posteriormente la muestra fue purificada y digerida con tripsina porcina durante 18 h. Los péptidos se resuspendieron en 30 µL de ácido fórmico al 1% (v/v); posteriormente fueron desalados y concentrados por Ziplip C18 y eluidos con 12 µL de la fase móvil (3% Acetonitrilo + 0.1% Ácido fórmico).

La mezcla de péptidos fue separada mediante cromatografía de líquidos en el equipo nanoACQUITY [Waters] empleando una columna nanoACQUITY UPLC de 1.7 µm BEH130 C18 100 µm x 100 mm a 35°C y una pre columna 2G nanoACQUITY UPLC 5 µm 180µm x 20 mm. Se utilizó como **fase A** (acuosa): agua con 0.1% de ácido fórmico y como **fase B** (orgánica): acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico con una velocidad de flujo de 0.45 nL/min bajo el gradiente cromatográfico siguiente: 0 min, 97% **A**, 3% **B**; 45 min, 60% **A**, 40% **B**; 47 min, 60% **A**, 40% **B**; 50 min, 20% **A**, 80% **B**; 52 min, 20% **A**, 80% **B**; 55 min, 97% **A**, 3% **B**.

También se analizaron en un espectrómetro de masas [Synapt G2S, Waters] empleando como modo de ionización electrospray a 100°C, con un voltaje en el capilar de 3.00 kV, voltaje de cono 30 V, intervalo de masas de 50 a 2000 Da, un lock mass de [Glu1]-Fibrinopéptido B, energía de colisión en la trampa de 15 a 45 V, velocidad de escaneo 1 seg con detección de iones positivos, resolución de 20,000 y como muestra control Digest Estándar *E. coli* 100 fmol/µL (Waters MASSPREP).

Las secuencias de péptidos se obtuvieron mediante la herramienta Byolinx del software MassL.ynx versión 4.1 SCN 851 de Waters Laboratory Informatics.

Se reportan todas aquellas secuencias con probabilidad mayor al 30%, con iones que presentaron evidencias de múltiples cargas y que a su vez se calcularon entre 2 y 3 kDa.

Únicamente se analizaron las secuencias con probabilidad del 100% y se realizó un análisis de alineamiento empleando la herramienta ProteinBLAST y se comparo cada secuencia contra la base de datos conocida del género *Mycobacterium*. A las secuencias encontradas también se les realizó un análisis con la herramienta bioinformática ExPASy (Expert Protein Analysis System) con el fin de encontrar características fisicoquímicas de los péptidos.

7. RESULTADOS

7.1. Fenotipo de la línea celular JAWS II

A partir de la línea celular JAWS II proveniente del ATCC CLR-11904 se diferenciaron monocitos de médula ósea de ratón a CD mediante el cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y 5 ng/mL GM-CSF recombinante.

Mediante citometría de flujo se realizó el análisis de células estimuladas y sin estimular marcadas con los distintos anticuerpos que reconocen moléculas en la superficie celular. Los datos fueron analizados mediante el programa FlowJo versión X10.0.7 (Tree Star, Inc. 1997-2014 Leland Stanford Jr. University). En un dot plot se representaron los parámetros de tamaño contra granularidad celular y está correspondió al 85.7% de la población celular total. De la población seleccionada el doble marcaje positivo para CD11c y CD11b fue de 99.6% (Figura 10).

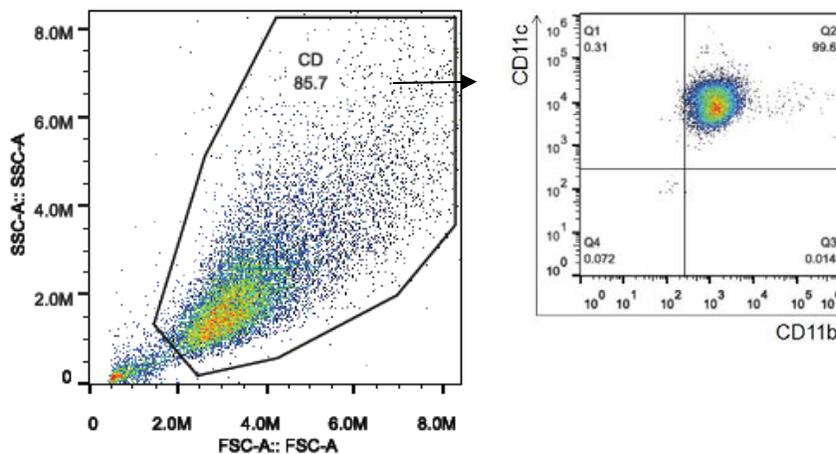


Figura 10. Representación esquemática en dot plot de tamaño contra granularidad celular y selección de población doble positiva CD11c+/CD11b+.

De la población doble positiva que corresponde a la población de CD, fueron estimuladas con *M. avium* ssp. *hominissuis* en una relación 1:2 (CD:Microbacteria) se evaluó la capacidad de la micobacteria para inducir la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibidoras; únicamente se observó mayor expresión de CD40 y MHC Clase II con respecto al control negativo de células sin estimular ($p < 0.05$). Se emplearon a su vez dos controles positivos para cada experimento el LPS de *E. coli* (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la cepa de *M. bovis* BCG México (MOI 1:2), ambos mostraron la elevada expresión de CD40, CD80, CD86 y MHC Clase II en comparación con el control de células sin estimular ($p < 0.05$) (Figura 11 y 12).

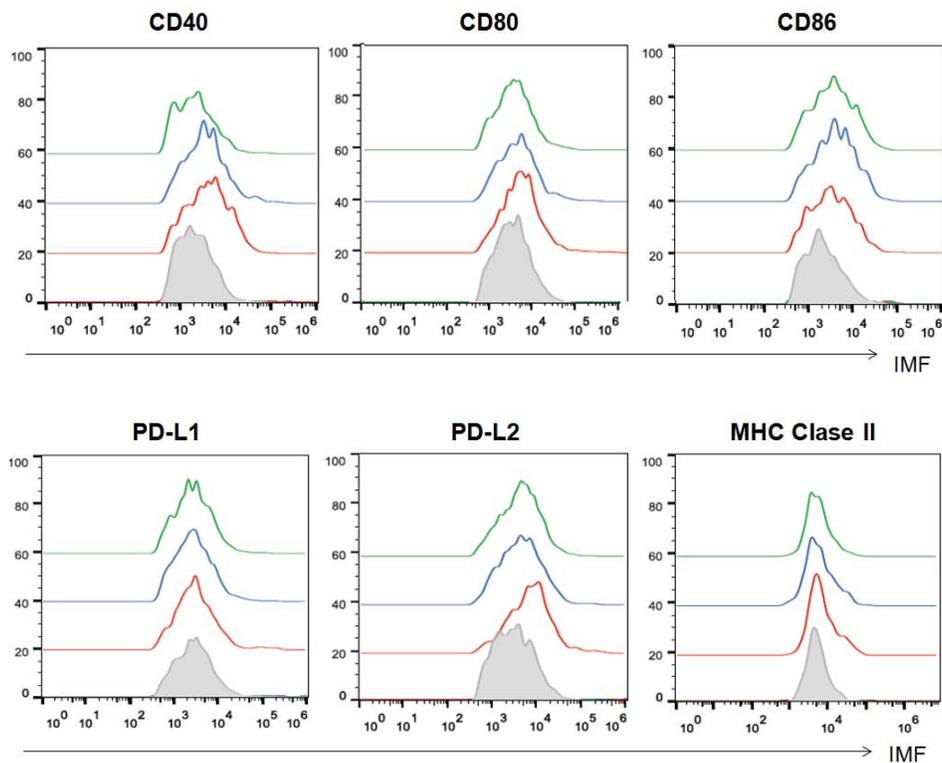


Figura 11. Histogramas de la expresión de moléculas coestimuladoras, coinhibidoras y MHC Clase II en células JAWS II estimuladas. Histogramas representativos de tres experimentos independientes de CD diferenciadas de la línea celular JAWS II estimuladas durante 24 h con *M. avium* ssp. *hominissuis* a una MOI 1:2 (CD:Microbacteria) (línea verde), *Mycobacterium bovis* BCG México MOI 1:2 (línea azul), LPS 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (línea roja) y sin estímulo (línea gris). La intensidad media de fluorescencia (IMF) es indicada por el desplazamiento del histograma sobre el eje X.

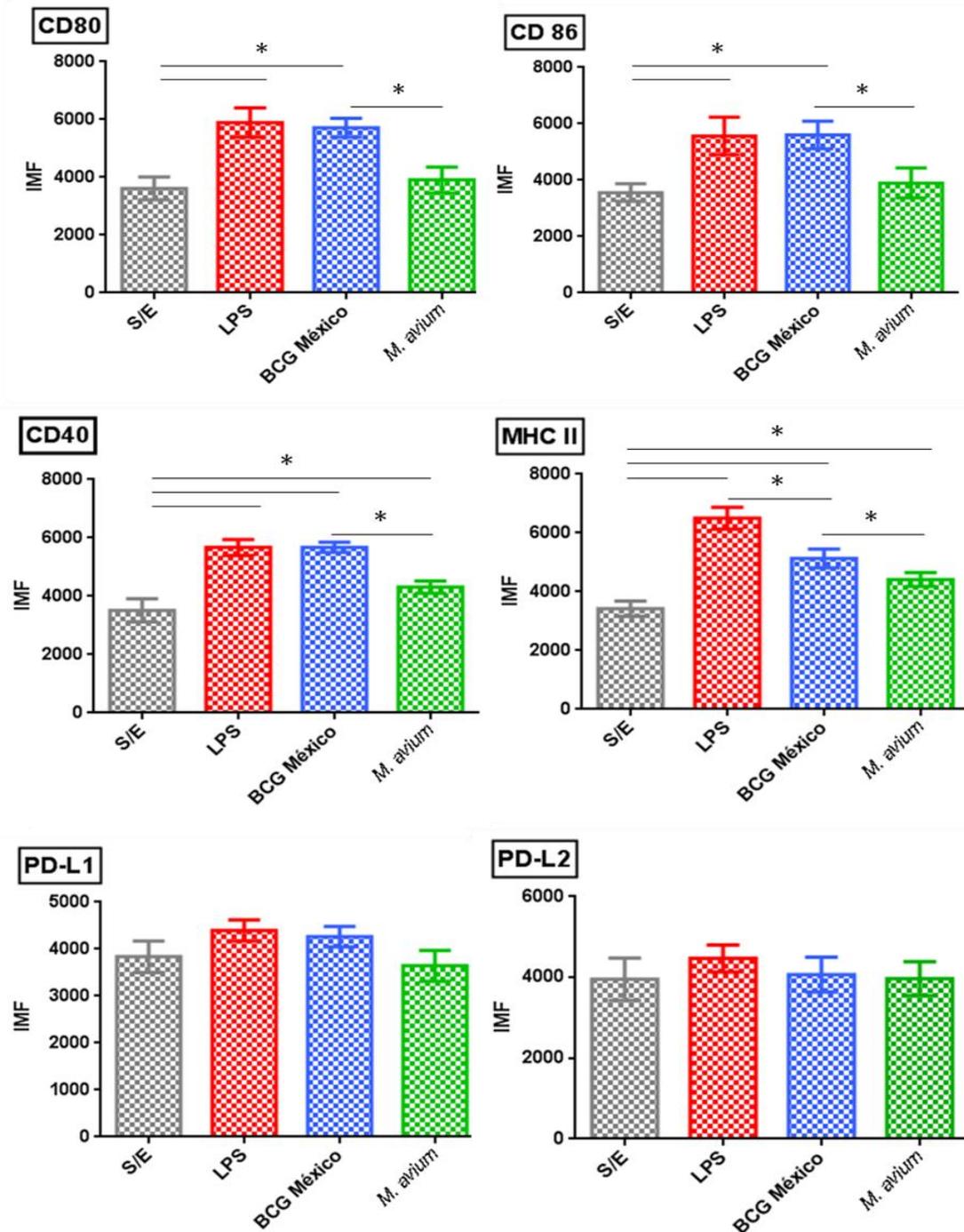


Figura 12. Expresión de moléculas coestimuladoras, coinhibidoras y MHC Clase II en células JAWS II estimuladas. CD diferenciadas de la línea celular JAWS II fueron estimuladas durante 24 h con *M. avium* ssp. *hominissuis* a una MOI 1:2 (CD:Microbacteria) (línea verde), *Mycobacterium bovis* BCG México MOI 1:2 (línea azul), LPS 2 µg/mL (línea roja) y sin estímulo (línea gris). Los datos son presentados como la media de tres experimentos independientes y analizados con la prueba estadística U de Mann Whitney $p < 0.05$.

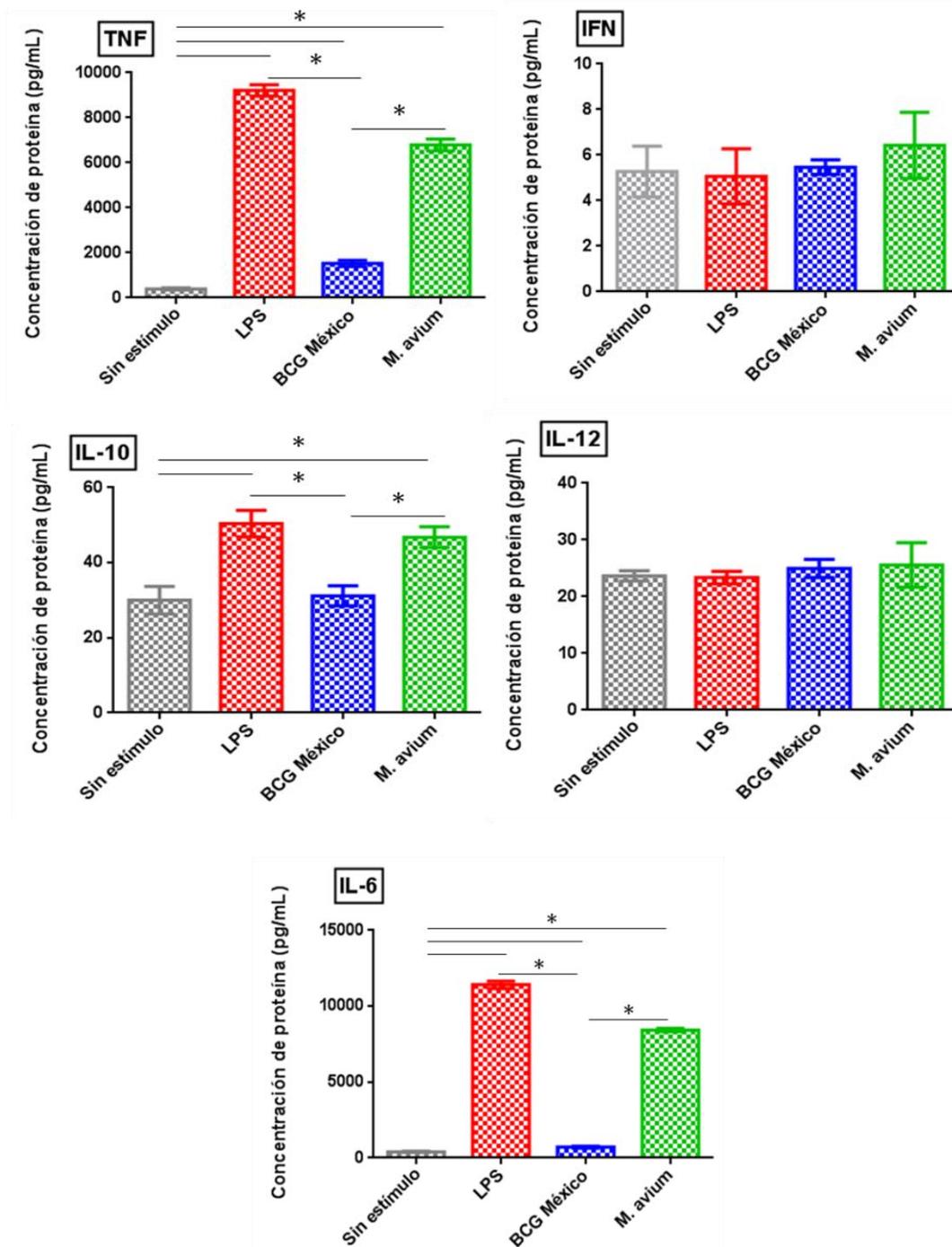


Figura 13. Expresión de citocinas secretadas por la línea celular JAWS II estimulada. Sobrenadante de CD diferenciadas de la línea celular JAWS II y estimuladas durante 24 h con *M. avium* ssp. *hominissuis* a una MOI 1:2 (CD:Microbacteria) (barra verde), *Mycobacterium bovis* BCG México MOI 1:2 (barra azul), LPS 2 µg/mL (barra roja) y sin estímulo (barra gris). Los datos son presentados como la media de tres experimentos independientes y analizados con la prueba estadística U de Mann Whitney $p < 0.05$.

A los sobrenadantes obtenidos al término de cada uno de los estímulos, se realizó la determinación de citocinas con el kit de inflamación de ratón CBA y los resultados se analizaron con el programa FlowJo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la secreción de INF- γ e IL-12p70 bajo ningún estímulo. Se detectó una elevada secreción de IL-10 en células estimuladas con LPS y *M. avium* ssp. *hominissuis*, así como elevada presencia de TNF e IL-6 para los estímulos con LPS, BCG México y *M. avium* ssp. *hominissuis*; en todos los casos comparando con el control del sobrenadante de células sin estimular ($p < 0.05$) (Figura 13).

7.2. Separación de péptidos unidos al MHC Clase II

Una vez establecido el fenotipo de las células JAWS II estimuladas con *M. avium* ssp. *hominissuis*, se procedió a la obtención de los complejos MHC clase II unido al péptido. Se realizó una lisis celular y separación con anticuerpos anti-MHC II acoplados a esferas magnéticas y se obtuvo el eluido correspondiente a la fracción proteica de MHC II-péptido cuya concentración fue de 1.07 mg/mL en un volumen de 5 mL. Con los complejos se realizó una desnaturalización por calor de las cadenas α y β que conforman el MHC II, logrando que los péptidos fueran separados y posteriormente concentrados, determinando a la absorbancia de 280 nm un valor de 200 μ g de péptidos.

Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% para observar la purificación de los péptidos con la correspondiente pérdida gradual de proteína en cada etapa del proceso. (Figura 14).

La mezcla de péptidos se analizó mediante espectrometría de masas por electrospray acoplado a cromatografía de líquidos y después del análisis se determinaron 4 secuencias de péptidos denominados A, B, C y D con 100% de probabilidad después de la digestión con tripsina; presentaron un tamaño de entre 19 y 29 aminoácidos, en tres de ellos (A, C, D) un punto isoeléctrico similar (12.01, 11.88, 11.52 respectivamente), con una masa molecular esperada para péptidos unidos al MHC

Clase II y en todos se observó la predominancia del aminoácido Leucina en la secuencia de aminoácidos (Tabla 4).

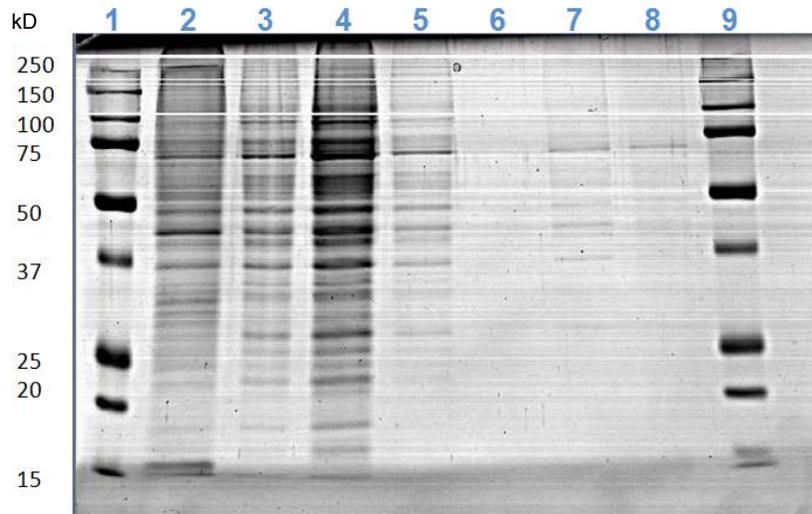


Figura 14. Perfil proteico en las etapas del proceso de obtención de péptidos anclados al MHC Clase II de células JAWS II estimuladas con *M. avium*. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con Silver blue. Carriles 1 y 9: Marcadores de MM, Carril 2: paquete celular de la lisis celular, Carril 3: Sobrenadante de la lisis celular, Carril 4: Eluido de la fracción negativa, Carril 5: Lavado de la columna 1, Carril 6: Lavado de la columna 2, Carril 7: MHC-II-Péptidos después de la desnaturalización, Carril 8: Purificación y concentración de los péptidos.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos de las secuencias peptídicas identificadas.

Péptido	Número de aminoácidos	Punto Isoeléctrico teórico	Masa Molecular teórica (Da)	Aminoácido Predominante
A*	19	12.01	2252.7	Leu (31.6%)
B*	20	5.84	2121.5	Leu (45%)
C*	24	11.88	2950.4	Leu, Arg (29.2%)
D*	29	11.52	3302.0	Leu (37.9%)

*Las secuencias peptídicas se están patentando actualmente.

Un análisis comparativo se realizó para cada secuencia identificada contra la base de datos existente de *Mycobacterium* en Protein BLAST e identificamos que las proteínas presentes en *M. avium* se relacionaron con las 4 secuencias de péptidos.

Se encontraron 12 proteínas diferentes relacionadas a cada secuencia de péptidos, las cuales presentan funciones distintas dentro de *M. avium* y que se podrían resumir en tres principalmente: proteínas involucradas en el transporte de moléculas, reguladoras de la transcripción y de metabolismo de lípidos. También presentaron una localización específica en la micobacteria, en la membrana bacteriana (59%, 7/12), seguido del núcleo (33%, 4/12) y finalmente en el citoplasma (8%, 1/12) (Tabla 5).

Figura 15. Funciones y localización celular de las proteínas de *M. avium*.

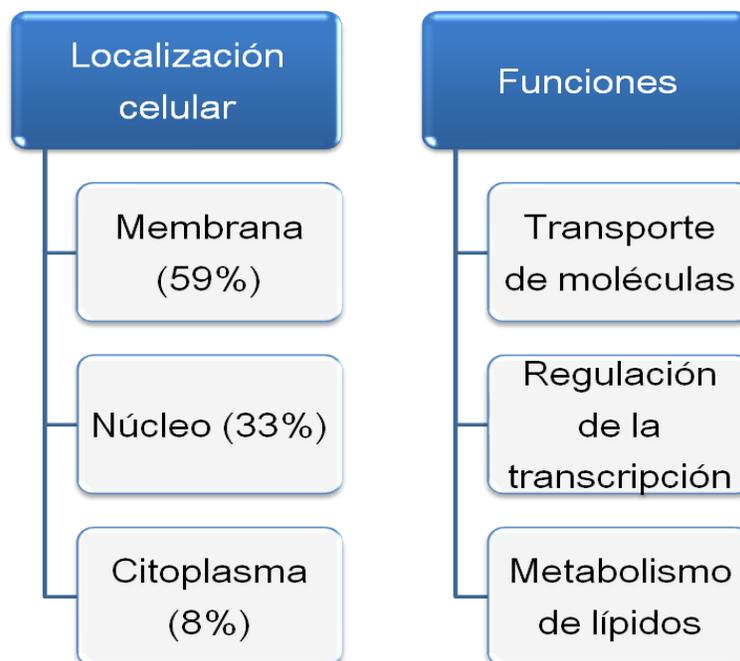


Tabla 5. Proteínas relacionadas a las secuencias peptídicas identificadas.

Péptidos	Función	Localización
A.		
Proteína IrtA	Transporte de hierro (44)	Membrana
Factor sigma SigF RNA Polimerasa	Promueve y regula la transcripción (42)	Núcleo
B.		
Transportador de manganeso	Transporte de manganeso	Membrana
Proteína de macrófago asociada a resistencia natural (Nramp)	Transporte de macro y micro moléculas (43)	Membrana
Hidroxilasa de ácido graso	Unión a hierro y biosíntesis de ácidos grasos	Membrana
C.		
Proteína del dominio HAMP	Cinasa (39)	Núcleo
Proteína de unión al ATP	Transportador ABC (40)	Membrana
Glutamil t-RNA Sintetasa y Ligasa	Aminoacilación de tRNA	Citoplasma
D.		
Arabinofuranosil transferasa	Transferasa de grupos metilos y glicosilados	Membrana
Proteína TetR	Regulador de la transcripción	Núcleo
Nucleótido hidrolasa	Actividad de hidrolasa	Núcleo
CDP-diacilglicerol-fosfatidil transferasa	Biosíntesis y metabolismo de fosfolípidos	Membrana

8. DISCUSIÓN

La tuberculosis es una enfermedad que afecta a un tercio de la población mundial; es un problema de salud pública que afecta principalmente a países en vías de desarrollo. En la actualidad la única vacuna aprobada con la que se cuenta para prevenir contra las formas miliar y meníngea de la enfermedad es la BCG [47]. Sin embargo, presenta una eficacia protectora menor al 80% en tuberculosis pulmonar en adultos y una de las causas que provoca variabilidad en su eficacia es la exposición previa a MNT como *M. avium*. Es por ello que en este estudio se empleó a *M. avium* que es considerada patógeno oportunista del humano y que tiene como reservorio natural el suelo y agua [47].

Las CD juegan un papel determinante entre la inmunidad innata y adaptativa, ya que son las encargadas de procesar y presentar antígenos anclados a la molécula del MHC Clase II y posteriormente presentarlos a linfocitos T CD4 para su diferenciación y proliferación, para lo cual la CD presenta un fenotipo maduro con la elevada expresión de moléculas coestimuladoras, la secreción de citocinas pro-inflamatorias y moléculas de tipo MHC II [14, 23, 25, 27]. Algunos reportes describen un fenotipo denominado semi-maduro o tolerogénico con disminuida expresión de moléculas en su superficie como MHC II y moléculas coestimuladoras, sin embargo la elevada secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 no se asocia con una respuesta inmune de protección dada por linfocitos Th1 efectores [27, 49].

Nosotros utilizamos para este proyecto una línea de monocitos capaces de diferenciarse a CD inmaduras mediante el crecimiento con GM-CSF y pertenecientes a una línea celular inmortalizada depositada en el ATCC como células JAWS II [29], con la ventaja de que al ser cultivadas proveen en gran número poblaciones celulares uniformes [19, 28]. En la actualidad diversos estudios basados en estas células utilizan CD derivadas de médula ósea de ratón no inmortalizadas (BMDC's, Bone Marrow-derived Dendritic Cells); sin embargo, las poblaciones son heterogéneas y llegan a diferenciarse también a macrófagos, además de que en estos experimentos la cantidad

de animales requeridos para lograr generar los cultivos primarios es elevada [24]. Hay estudios que soportan el hecho de que las células JAWS II muestran características y funciones inmunobiológicas similares a BMDC's en respuesta al estímulo con *Chlamydia muridarum* y hasta un fenotipo más homogéneo que los BMDC's, siendo una mejor opción para experimentos *in vitro* de inmunogenicidad y descubrimiento de antígenos [24]. En un estudio realizado por Jörgensen y cols. en el 2002 describen que las células JAWS II no expresan en su superficie CD40, pero esta carencia no compromete hacia una eficaz activación de linfocitos T vírgenes cuando las células son estimuladas con LPS y citocinas. Otros autores determinan la expresión de CD80, CD86 y MHC II en células JAWS II estimuladas con LPS y Poly I:C por 24 h pero no afecto en la expresión de CD40 [21].

En el presente trabajo las células JAWS II fueron estimuladas durante 24 h bajo diferentes condiciones. Observamos que aquellas células estimuladas con los controles positivos (LPS de *E.coli* y BCG México) presentaron un fenotipo maduro, dado por la elevada expresión de CD40, CD80, CD86 y MHC II; no así para las CD estimuladas con *M. avium* las cuales expresaron en mayor proporción únicamente CD40 y MHC Clase II. En cuanto a la expresión de moléculas coinhibidoras no se presentaron diferencias significativas en ninguno de los casos. La expresión de estas moléculas fue en parte diferente a lo reportado por Mendoza y cols. quienes estudiaron la interacción de *M. avium* con BMDC's de ratón y observaron que disminuía la expresión de moléculas como CD40, CD80 y CD86 e inducían la secreción de IL-10 así como altos niveles en la expresión de la molécula coinhibidora PD-L2 lo que interfería con la proliferación de células T; mientras que al ser estimuladas con LPS o BCG Phipps se comportaban como células maduras. Aún más interesante el fenotipo inducido en estas células por *M. avium* es dominante incluso en presencia de BCG [18]. Flaherty y cols también demostraron en un modelo *in vivo* de ratones vacunados con BCG Pasteur y después de 6 semanas retados con *M. avium* 104, esta última interfirió en el establecimiento de una respuesta inmune de protección [10]. Sin embargo, el modelo empleado corresponde a una línea celular inmortalizada la cual se trabajó totalmente *in vitro* y los resultados mostrados no se pueden comparar con estudios en BMDC's.

Por otro lado la determinación de citocinas secretadas también es de suma importancia para la identificación del fenotipo en la CD, encontrando que las células estimuladas con LPS y *M. avium* presentaron elevada producción de IL-6 y TNF, lo que concuerda con estudios realizados con la misma línea celular estimulada con 10 µg/ml de LPS durante 24 h, siendo capaces de secretar TNF-α e IL-6, además de IL-1a e IL-1b [28]; condiciones de trabajo similares en otro reporte revelan la producción en grandes cantidades de las mismas citocinas [22]. Durante un proceso infeccioso es común encontrar la presencia de IL-1β, TNF-α e IL-6, esta última con un rol crucial en la diferenciación de células T y B [50]. Para IL-12 e IFN-γ no se observaron diferencias significativas en la secreción de dichas citocinas con ningún estímulo, por otra parte IL-10 se detectó en células estimuladas con *M. avium* y LPS, hecho que esperábamos en el primer caso pero no en células estimuladas con LPS. Los resultados encontrados en la determinación de citocinas pudieran ser consecuencia de los largos tiempos de cultivo a los que se someten las células JAWS II para proliferar y diferenciarse lo que puede provocar la pérdida de las funciones normales de las células in vitro, además de que el TGF-β se expresa constitutivamente en estas células lo que pudiera inhibir la producción de IL-12 e inclusive la expresión de CD 40 de manera autocrina [22].

La mayor expresión de MHC II-péptido en células estimuladas con *M. avium* favoreció la separación del complejo para su posterior purificación. La metodología para la obtención de dicho complejo fue reportada por Bozzacco y cols en el 2011, quienes implementaron un análisis por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida para identificar péptidos unidos a las moléculas del MHC II, los cuales fueron derivados de proteínas endógenas expresadas en CD de bazo empleando un modelo murino [16].

El procedimiento que empleamos se basó en el uso de CD JAWS II estimuladas durante 24 h con *M. avium*, para posteriormente con una solución de lisis e inhibidores de proteasas provocar la lisis de las células y después de centrifugar obtener un sobrenadante que se sometió a una separación magnética con anticuerpos dirigidos

contra la fracción beta del MHC II, los complejos separados fueron eluidos y expuestos a 70°C para permitir la separación de los péptidos por desnaturalización de las cadenas que conforman el MHC. Finalmente los péptidos obtenidos y liofilizados. Algunas modificaciones de la metodología reportada por Bozzacco fueron implementadas como fue el empleo de la línea celular inmortalizada JAWS II de la cual anteriormente se mencionaron las ventajas de su uso, además de que nos permitió la proliferación celular a un número elevado. También para el aislamiento de los complejos MHC II-péptido sustituimos la técnica de inmunoafinidad en columnas con sepharosa acopladas a un anticuerpo monoclonal contra el MHC-II por la inmunoseparación magnética.

Con la mezcla de péptidos liofilizada se procedió a realizar la espectrometría de masas mediante ionización por electrospray acoplado a cromatografía de líquidos y mediante la herramienta Byolinx se obtuvieron las secuencias de péptidos. De las cuatro secuencias correspondientes a iones con evidencia de múltiples cargas, nosotros utilizamos las proteínas que tuvieron una probabilidad del 100% y que a su vez se encontraron dentro de un intervalo de 2 a 3 KDa, ya las moléculas de tipo MHC clase II se unen péptidos de 18 a 30 aminoácidos aproximadamente. Con las secuencias se realizó un análisis de alineamiento con la herramienta Protein BLAST y se comparó cada secuencia contra la base de datos conocida del género *Mycobacterium* para identificar a las proteínas de nuestro interés.

De dicho análisis las secuencias se relacionaron con 12 proteínas, las cuales se encontraron presentes en el género *Mycobacterium* en el citoplasma (8%, 1/12), núcleo (33%, 4/12) y principalmente en membrana (59%, 7/12); de estas últimas la mayoría con función de moléculas transportadoras (Tabla 10). Se conoce que el transporte de cationes divalentes en micobacterias como el hierro es de fundamental importancia para su crecimiento ya que es un cofactor involucrado en por lo menos 40 reacciones enzimáticas codificadas en el genoma de *M. tuberculosis*, por lo que comúnmente pacientes diagnosticados con tuberculosis pulmonar sufren de anemia por el secuestro del hierro al hospedero [45]. Por lo tanto, un mecanismo de defensa importante contra patógenos intracelulares es el secuestro del ion hierro por parte del hospedero, sin

embargo algunas micobacterias presentan un mecanismo de virulencia con la capacidad de activar genes que codifican proteínas como IrtA e IrtB-RV2895c que interactúan entre sí permitiendo el transporte de hierro y por lo tanto la sobrevivencia del patógeno [44]. También se estudió que la progresión de la infección por *M. avium* es dependiente de la expresión del gen *Nramp1* en ratón que involucra el transporte de hierro [43]. Otro tipo de transportadores importantes en *M. tuberculosis* son los de tipo ABC o de unión a ATP, encargados de transportar iones como hierro, aminoácidos, péptidos, carbohidratos y antibióticos; lo que puede reflejar su capacidad para sintetizar moléculas esenciales para sobrevivir en condiciones adversas, como por ejemplo cuando se encuentra dentro del ciclo de infección formando granulomas [40]. Sin duda todos los transportadores tienen una función esencial en la sobrevivencia de la micobacterias, y es de resaltar que éstos se encuentran sobre la superficie lo que hace que sean altamente reconocidos a nivel de receptores, en este caso MHC-II.

Durante la infección con el bacilo una gran variedad de genes que están involucrados en su adaptación ante cambios ambientales como escases de nutrientes, hipoxia o estrés. Gran parte de esos genes son reguladores de la transcripción como los factores sigma que interactúan con la RNA polimerasa que permite la unión a secuencias promotoras específicas e iniciar la transcripción. En *M. tuberculosis* están identificados 13 factores sigma, entre ellos SigF que permite la adaptación a diferentes estímulos que se relacionan como un determinante de virulencia y en *M. smegmatis* está involucrado en defensa contra estrés oxidativo, estrés por calor y estrés osmótico (42). Por lo que no es de sorprender su reconocimiento por MHC-II.

En cuanto a las proteínas que se encontraron en membrana, se sabe que la membrana celular de procariones es necesaria en respuesta ante cambios externos y mediante señalización intracelular dependiente de metilaciones y fosforilaciones; como por ejemplo las proteínas aceptoras de grupos metilo, histidin cinasas, adenilato ciclasas y fosfatasas que presentan dominios HAMP. Dichas proteínas están involucrados en sistemas de regulación, caracterizados por un sensor en la membrana celular que se fosforila en respuesta a una señal y transfiere dicho grupo, comúnmente mediante

proteínas de unión a DNA que regulan la transcripción y que involucran una gran variedad de procesos como quimiotaxis, osmorregulación o transporte de iones [39]. Todos estos procesos se dan continuamente y permite al sistema inmunológico su fácil detección.

También proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos se encontraron; estas moléculas en las micobacterias constituyen una parte esencial ya que forman parte de su envoltura celular y se asocian con su patogenicidad, siendo los ácidos micólicos los principales constituyentes de esta capa la cual protege al bacilo de químicos nocivos y de la respuesta inmune generada por el hospedero. Avances en el estudio sobre la síntesis y procesamiento de ácidos grasos han aparecido, ya que son blancos viables para el descubrimiento de nuevas drogas anti tuberculosas [41].

En un artículo publicado en el 2005 por Rodrigues y cols, reportan los cambios que sufren las CD durante su diferenciación y maduración a nivel proteómico e identifican 36 proteínas asociadas con el metabolismo, crecimiento y comunicación celular que se expresan del estado de maduración en las células; en CD inmaduras el 30% de las proteínas se relacionan con su metabolismo mientras que en CD maduras con LPS corresponden al 50%. Las proteínas también se clasificaron con base en su localización celular siendo las proteínas de citoesqueleto (38%) las mayormente encontradas. Sin embargo, mencionan que el perfil de expresión de proteínas dependerá del estímulo usado para diferenciar de monocitos a CD y del estímulo empleado para maduración [46].

Sin lugar a dudas las perspectivas de esta información será estudiar individualmente a cada péptido que determine un fenotipo inmaduro en la CD para determinar su función a futuro en distintas enfermedades como lo son las infecciosas, autoinmunes y cáncer ya que se podrá favorecer ambientes anti-inflamatorios.

9. CONCLUSIONES

- A partir de la línea celular JAWS II de monocitos de médula ósea de ratón se diferenciaron CD.
- CD estimuladas con *M. avium* presentaron un fenotipo semi-maduro.
- CD estimuladas con *M. bovis* BCG México y LPS presentaron un fenotipo maduro.
- Se obtuvieron péptidos anclados al MHC Clase II de CD estimuladas con *M. avium* empleando la separación con anticuerpos anti-MHC II acoplados a perlas magnéticas.
- Las secuencias de péptidos corresponden principalmente a moléculas de superficie de *M. avium*.

10. PERSPECTIVAS

- Sintetizar las 4 secuencias de péptidos encontradas y estimular CD obtenidas de la línea celular JAWS II para reproducir fenotipo y posteriormente realizar ensayos de proliferación y diferenciación con linfocitos T.
- Obtener los péptidos que se presentan en el MHC II de CD obtenidas de la línea celular JAWS II estimuladas con BCG México para realizar un análisis comparativo de las secuencias.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koneman. 2006. Diagnóstico microbiológico. Capítulo 19. Editorial Médica Panamericana. 6ª Edición.
2. Saviola B, Bishai W. 2006. The Genus *Mycobacterium*—Medical. *Prokaryotes*. **3**: 919-933.
3. Crick D, Mahapatra S, Brennan P. 2001. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology*. **11(9)**: 107R-118R.
4. Philips J, Ernst J. 2012. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **7**: 353-384.
5. SINAVE/DGE/SALUD/Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México. 2012. Secretaría de Salud.
6. WHO Report 2015. Global Tuberculosis Control.
7. Dye C. 2006. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*. **367**: 938-940.
8. Falkinham J. 1996. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. **9 (2)**:177-215.
9. Ottenhoff T, Kaufmann S. 2012. Vaccines against Tuberculosis: Where Are We and Where Do We Need to Go? *PLoS Pathogens, Review*. **8 (5)**: e1002607.
10. Flaherty D, Vesosky B, Beamer G, Stromberg P, Turner J. 2006. Exposure to *Mycobacterium avium* can modulate established immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection generated by *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Journal of Leukocyte Biology*. **80**: 1262-1271.
11. Andersen P, Doherty T. 2005. The success and failure of BCG-implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature Reviews, Microbiology*. **3**: 656-662.
12. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. 2012. Cellular and Molecular Immunology. Capítulo 6. Elsevier Saunders. 7ª Edición.
13. Trombetta E, Mellman I. 2005. Cell Biology of Antigen Processing in vitro and in vivo. *Rev. Immunol.* **23**:975-1028.
14. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of Dendritic Cells. *Rev. Immunol.* **18**:767-811.

15. Mihret A, Mamo G, Tafesse M, Hailu A, Parida S. 2011. Dendritic Cells Activate and Mature after Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *BioMed Central*. **4**:247.
16. Bozzacco L, Yu H, Zebroski H, Dengjel J, Deng H, Mojsov S, Steinman R. 2011. Mass Spectrometry Analysis and Quantitation of Peptides Presented on the MHC II Molecules of Mouse Spleen Dendritic Cells. *J Proteome Res*. **10**: 5016-5030.
17. Castillo-Rodal A, Mazari-Hiriart M, Lloret-Sánchez L, Sachman-Ruiz B, Vinuesa P, López-Vidal Y. 2011. Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *J Clin Microbiol*.
18. Mendoza-Coronel E, Camacho-Sandoval R, Bonifaz L, López-Vidal Y. 2011. PD-L2 induction on dendritic cells exposed to *Mycobacterium avium* downregulates BCG-specific T cell response. *Tuberculosis* **91**: 36-46.
19. Zapala L, Drela N, Bil J, Nowis D, Basak G, Lasek W. 2011. Optimization of activation requirements of immature mouse dendritic JAWSII cells *in vivo* application. *Oncology Reports* **25**: 831-840.
20. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. 2013. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**:563–604.
21. Pinchuk L, Lee S, Filipov N. 2007. *In vitro* Atrazine Exposure Affects the Phenotypic and Functional Maturation of Dendritic Cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* **223(3)**: 206–217.
22. Jorgensen T, Haase C, Michelsen B. 2002. Treatment of an Immortalized APC Cell Line with Both Cytokines and LPS Ensures Effective T-Cell Activation *In vitro*. *Scand J. Immunol.* **56**: 492-503.
23. Haase C, Michelsen B, Jorgensen T. 2004. CD40 is Necessary for Activation of Naive T Cells by a Dendritic Cell Line *In Vivo* but not *In Vitro*. *Scand J. Immunol.* **59**: 237–245.
24. Jiang X, Shen C, Rey-Ladino J, Yu H, Brunham R. 2008. Characterization of Murine Dendritic Cell and Induction of Protective Immunity *Chlamydia muridarum* Antigen Presentation Marrow-Derived Dendritic Cells in Line JAWS II and Primary Bone. *Infect. Immun.* **76(6)**: 2392.
25. Kondo Y, Tachikawa E, Ohtake S, Kudo K, Mizuma K, Kashimoto T, Irie Y, Taira E. 2010. Inflammatory cytokines decrease the expression of nicotinic acetylcholine receptor during the cell maturation. *Mol Cell Biochem.* **333**: 57–64.

26. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Henk A, Jonuleit H. 2002. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunology and Cell Biology*. **80**: 477–483.
27. Lutz M, Schuler G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *TRENDS in Immunology*. **23(9)**: 445.
28. MacKay VL, Moore EE. 1997. Immortalized dendritic cells. US Patent 5,648,219.
29. Moore EE. 1998. Preparation of immortalized cells. US Patent 5,830,682.
30. Suri A, Lovitch S, Unanue E. 2006. The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. *Current Opinion in Immunology*. **18**: 70–77.
31. Vyas J, Van der Veen A, Ploegh H. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature Reviews*. **8**: 607-618.
32. Castillo-Rodal A, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva JJ, Sada-Díaz E, López-Vidal Y. 2006. *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Levels of Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in a BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. *Infection and Immunity*. **74(3)**: 1718-1724.
33. Thom M, Howard C, Villarreal-Ramos B, Mead E, Vordermeier M, Hope J. 2008. Consequence of prior exposure to environmental mycobacteria on BCG vaccination and diagnosis of tuberculosis infection. *Tuberculosis*. **88**: 324–334.}
34. Hope J, Kwong S, Sopp P, Collins R, Howard C. 2000. Dendritic Cells Induce CD4+ and CD8+ T-Cell Responses to *Mycobacterium bovis* and *M. avium* Antigens in Bacille Calmette Guérin Vaccinated and Nonvaccinated Cattle. *Scand J. Immunol*. **52**: 285-291.
35. Young S, Slobbe L, Wilson R, Buddle B, Lisle G, Buchan G. 2007. Environmental Strains of *Mycobacterium avium* Interfere with Immune Responses Associated with *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination. *Infection and Immunity*. **75(6)**: 2833-2840.
36. Griffith D. 2010. Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Opin Infect Dis* **23**: 185–190.
37. Pitt J, Stavropoulos E, Redford P, Beebe A, Bancroft G, Young D, O'Garra A. 2012. Blockade of IL-10 Signaling during Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Enhances and Sustains Th1, Th17, and Innate Lymphoid IFN- γ and IL-17

- Responses and Increases Protection to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol.* **189**: 4079-4087.
38. Potolicchio I, Chitta S, Xu X, Fonseca D, Crisi G, Horejsi V, Strominger J, Stern L, Raposo G, Santambrogio L. 2005. Conformational Variation of Surface Class II MHC Proteins during Myeloid Dendritic Cell Differentiation Accompanies Structural Changes in Lysosomal MIIC. *J Immunol.* **175**: 4935-4947.
39. Aravind L, Ponting C. 1999. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiology Letters.* **176**: 111-116.
40. Braibant M, Gilot P, Content J. 2000. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters.* **24**: 449-467.
41. Takayama K, Wang C, Besra G. 2005. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **18(1)**: 81-101.
42. Hümpel A, Gebhard S, Cook G, Berney M. 2010. The SigF Regulon in *Mycobacterium smegmatis* Reveals Roles in Adaptation to Stationary Phase, Heat, and Oxidative Stress. *J. Bacteriol.* **192(10)**: 2491-2502.
43. Gomes M, Appelberg R. 1998. Evidence for a link between iron metabolism and Nrampl gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. *Immunology.* **95**: 165-168.
44. Farhana A, Kumar S, Rathore S, Ghosh P, Ehtesham N, Tyagi A, Hasnain S. 2008. Mechanistic Insights into a Novel Exporter-Importer System of *Mycobacterium tuberculosis* Unravel Its Role in Trafficking of Iron. *Plos One.* **3(5)**: 1-16.
45. De Voss J, Rutter K, Schroeder B, Barry C. 1999. Iron Acquisition and Metabolism by *Mycobacteria*. *J Bacteriol.* **181(15)**: 4443-4451.
46. Rodrigues S, Marcel V, Gaspar G, Chammas R, Fontes A, Tadeu D, Green L. 2005. Changes in the proteomic profile during differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells stimulated with granulocyte macrophage colony stimulating factor/interleukin-4 and lipopolysaccharide. *Proteomics.* **5**: 1186-1198.
47. Ritz N, Hanekom W, Robins-Browne R, Britton W, Curtis N. 2008. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and Protection against tuberculosis. *FEMS Microbiol Rev.* **32**: 821-841.

48. Rindi L, Garzelli C. 2014. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infection, Genetics and Evolution*. **21**: 375-383.
49. Steinman R, Hawiger D, Nussenzweig M. 2003. Tolerogenic Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 685–711.
50. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1813**: 878–888.
51. Neefjes J, Jongasma M, Paul P, Bakke O. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Rev Immunology*. **11**: 823-836.
52. Kasteren S, Overkleef H, Ovaas H, Neefjes J. 2014. Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules. *Current Opinion in Immunology*. **26**: 21-31.
53. Bachereau J, Steinman R. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. **392**: 245-252.
54. Bozzacco L, Yu H, Dengjel J, Trumpfheller C, Zebroski H, Zhang N, Kuttner V, Ueberheide B, Deng H, Chait B, Steinman R, Mojsov S, Fenyo D. 2012. Strategy for Identifying Dendritic Cell-Processed CD4+T Cell Epitopes from the HIV Gag p24 Protein. *PLoS One*. 7(7).

12. ANEXOS

12.1. Preparación de reactivos

Medio RPMI 1640

RPMI 1640	10.4 g
Bicarbonato de sodio	1.5 g
Piruvato de sodio 100 Mm	10 mL
H ₂ O destilada	cbp 1000 mL

Ajustar el pH entre 7.2 y 7.4. Filtrar en unidad de filtración estéril con papel de 0.22 µm de diámetro y almacenar a 4°C.

Buffer de FACS

SFB	0.5 mL
PBS 1X	49.5 mL

Almacenar a 4°C.

Agar Middlebrook 7H10

Agar Middlebrook 7H10	19 g
Glicerol	5 mL
H ₂ O destilada	cbp 900 mL
Enriquecimiento OADC	100 mL

Disolver el medio 7H10 y el glicerol en H₂O destilada, calentando durante 1 min y agitando frecuentemente. Esterilizar a 110°C durante 10 min. Una vez que el medio se

haya enfriado a una temperatura de 50-55°C adicionar asepticamente la solución de enriquecimiento OADC y verter en placas hasta que solidifique. Almacenar a 4°C.

Medio Middlebrook 7H9

Medio Middlebrook 7H9 deshidratado	4.7 g
Glicerol	5 mL
H ₂ O destilada	cbp 900 mL
Enriquecimiento ADC	100 mL

Disolver el medio 7H9 y el glicerol en H₂O destilada. Esterilizar a 110°C durante 10 min. Una vez que el medio se haya enfriado a una temperatura de 45°C, adicionar asepticamente la solución de enriquecimiento ADC. Almacenar a 4°C.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X)

KH ₂ PO ₄ anhídrido	0.24 g
Na ₂ HPO ₄ anhídrido	1.44 g
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
H ₂ O destilada	cbp 1000 mL

Ajustar el ph a 7.4. Esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 0.5M)

EDTA	186.1 g
H ₂ O destilada	cbp 1000 mL

Ajustar el pH a 8, empleando perlas de NaOH. Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

Acrilamida y bis-Acrilamida 30%

Acrilamida para electroforesis	29.1 g
Bis-acrilamida	0.9 g
H ₂ O destilada	cbp 100 mL

Desgasificar durante 30 min al vacío. Filtrar con papel Whatman N°1. Almacenar en frasco ámbar a 4°C.

Tris 1.5 M, pH 8.8

Tris base para electroforesis	25 g
H ₂ O destilada	cbp 150 mL

Ajustar a pH de 8.8. Filtrar con papel Whatman N°1. Almacenar en frasco ámbar a 4°C.

Tris 0.5 M, pH 6.8

Tris base para electroforesis	9 g
H ₂ O destilada	cbp 150 mL

Ajustar a pH de 6.8. Filtrar con papel Whatman N°1. Almacenar en frasco ámbar a 4°C.

Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%

SDS	10 g
H ₂ O destilada	cbp 100 mL

Filtrar con papel Whatman N°1. Almacenar a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio (APS) 10%

APS	7.5 g
H ₂ O destilada	7.5 mL

Alícuotas de 300 µL se almacenan a -70°C.

Buffer de corrida 5X

Glicina	192 mM
Tris base	25 mM
SDS	0.1%
H ₂ O destilada	cbp 1000 mL

Filtrar con papel Whatman N°1. Almacenar a 4°C.

Solución de fijación

Etanol	40%
Ácido acético	10%
H ₂ O destilada	50%

Almacenar a 4°C.

Solución para teñir: Silver Blue

Ácido fosfórico	14.8 mL
Sulfato de amonio	25 g
Azul de Coomassie G-250	0.3 g
Metanol	50 mL
H ₂ O destilada	cbp 250 mL

Almacenar en frasco ámbar a 4°C. Solución coloide, no se debe filtrar.

Solución para desteñir

Metanol	20%
Etanol	10%
Ácido acético	5%
H ₂ O destilada	cbp 1000 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de Laemmli (2X)

SDS 10%	4 mL
Glicerol	2 mL
Tris-HCl 1 M, pH 6.8	1.25 mL
Azul de bromofenol	2 mg
H ₂ O destilada	2.75 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

Mezcla mágica

H ₂ O destilada	3.8 mL
Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10%	1.6 mL
β-mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol 1%	0.4 mL

Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

12.2. Tinción de Ziehl-Neelsen

Tinción diferencial para la identificación de micobacterias. Estos microorganismos tienen características de ácido alcohol resistencia y se tiñen de color rojo por la fucsina.

1. Realizar un frotis del cultivo en un portaobjetos y fijar con calor.
2. Cubrir la preparación con Fucsina fenicada y calentar hasta observar emisiones de vapor pero evitando la ebullición (10-15 min).
3. Eliminar el exceso de colorante con agua.
4. Decolorar con alcohol-ácido durante 1 min o bien hasta que no aparezca color rojo y lavar con agua.
5. Realizar la tinción de contraste con azul de metileno fenicado durante 3 min.
6. Lavar con agua, dejar secar y observar al microscopio con el objetivo de 100X.

12.3. Marcaje de moléculas de superficie en CD para citometría de flujo

1. Resuspender las pastillas celulares correspondientes a cada estímulo con 600 µL de Buffer de FACS (SFB 2% + PBS 1X) e incubar durante 20 min a 4°C.

2. Transferir a una microplaca de 96 pozos la suspensión celular referente a cada condición dividiendo los 600 μL en 6 pozos (aprox 100,000 células por pozo) y centrifugar a 400 xg durante 5 min. Eliminar el sobrenadante.
3. Diluir 1:100 el anticuerpo anti-ratón CD11c unido a biotina, tomando en cuenta que el volumen final de cada reacción es de 25 μL . Incubar durante 40 min a temperatura ambiente y en obscuridad, centrifugar a 400 xg durante 5 min. Eliminar el sobrenadante.
4. Diluir los anticuerpos: APC Estreptavidina (1:100), anti-CD11b FITC (1:100), anti-CD40 PE (1:100), anti-CD80 PE (1:100), anti-CD86 PE (1:100), anti-PD L1 PE (1:100), anti-PD L2 PE (1:100) y anti-MHC II PE (1:100). Adicionar la dilución a los pocillos correspondientes e incubar durante 40 min a temperatura ambiente y en obscuridad, centrifugar a 400 xg durante 5 min. Eliminar el sobrenadante.
5. Resuspender en 200 μL con paraformaldehído al 1% para fijar las células y almacenar en obscuridad a 4°C hasta su uso.

12.4. Determinación de citocinas

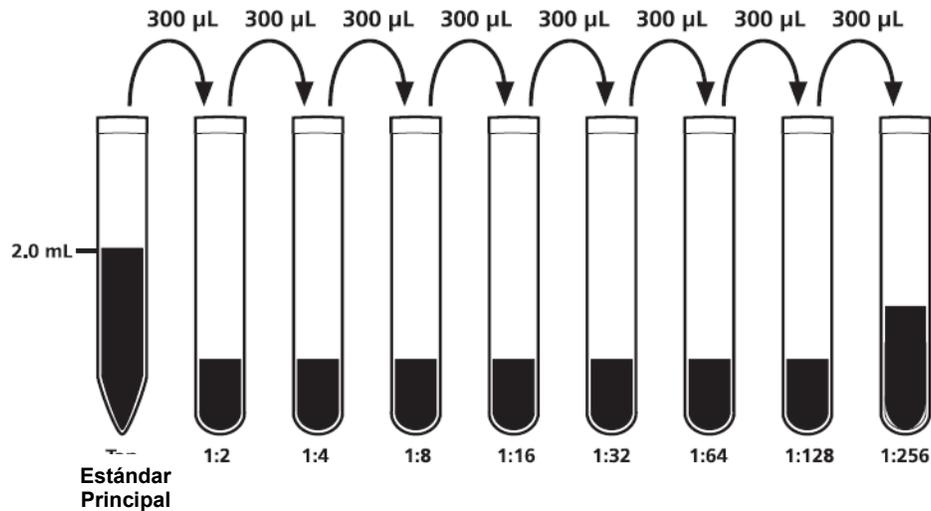
El kit de inflamación de ratón (CBA) se utiliza para la medición cuantitativa de IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF e IL-12p70. Con dicho ensayo se capturan analitos solubles empleando esferas de tamaño conocido conjugadas a un anticuerpo en específico; haciendo posible la detección de los analitos empleando una mezcla de anticuerpos acoplados a PE, los cuales proveen una señal de fluorescencia en proporción a la cantidad de analito unido y que será detectado mediante citometría de flujo.

Tabla 5. Contenido del kit de inflamación de ratón (CBA).

	Reactivo	Cantidad
A1	Perlas de captura IL-6 ratón	1 vial, 0.8 mL
A2	Perlas de captura IL-10 ratón	1 vial, 0.8 mL
A3	Perlas de captura MCP-1 ratón	1 vial, 0.8 mL
A4	Perlas de captura IFN- γ ratón	1 vial, 0.8 mL
A5	Perlas de captura TNF ratón	1 vial, 0.8 mL
A6	Perlas de captura IL-12p70 ratón	1 vial, 0.8 mL
B	Reactivo para detección PE inflamación ratón	1 vial, 4 mL
C	Estándar de inflamación para ratón	1 vial, 0.8 mL
D	Perlas para configuración del citómetro	2 viales, 0.2 mL liofilizado
E1	Control positivo PE	1 vial, 1.5 mL
E2	Control positivo FITC	1 vial, 0.5 mL
F	Buffer de lavado	1 botella, 130 mL
G	Diluyente	1 botella, 30 mL

Preparación de los estándares de inflamación para ratón

1. Abrir el vial liofilizado que contiene el estándar de inflamación para ratón (C) y reconstituir con 2 mL de diluyente (G), transferir a un tubo falcón de 15 ml y marcarlo como “Estándar Principal”.
2. Marcar 8 tubos con las diluciones a realizar: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256, pipetear 300 μ L de diluyente (G) en cada tubo.
3. Transferir 300 μ L del “Estándar Principal” al tubo marcado como dilución 1:2 y mezclar por pipeteo.
4. Continuar con las diluciones seriadas por transferencia de 300 μ L entre cada tubo.
5. Depositar en un tubo Diluyente (G), correspondiente al control negativo (0 pg/mL).



Concentración de proteína por cada dilución (pg/mL)

5000	2500	1250	625	312	156	80	40	20	0
St	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	C-

(St) Estándar principal, (C-) Control negativo.

Preparación de las perlas de captura de inflamación para ratón

1. Determinar el número de ensayos a realizar e incluir estándares y control.
2. Mezclar vigorosamente en un vórtex cada vial con perlas de captura (A1-A6) y adicionar en un tubo 10 µL de cada uno por cada ensayo a realizar.

Ensayo de inflamación para ratón

1. Mezclar en un vórtex las perlas de captura preparadas y adicionar 50 µL a tubos vacíos marcados con las diluciones del estándar, control y muestras por analizar.
2. Adicionar 50 µL de cada dilución estándar y control negativo a los tubos marcados con dichas leyendas.
3. Adicionar 50 µL de cada muestra desconocida a los tubos marcados con dichas leyendas. En algunos casos será necesario diluir las muestras que contengan alta concentración de proteína, empleando diluyente (G) y como factor de dilución 1:2, 1:10 ó 1:100.

4. Adicionar 50 μ L de reactivo para detección de PE inflamación ratón (B) a todos los tubos.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente y proteger de la luz.
6. Adicionar 1 mL de buffer de lavado (F) a cada tubo y centrifugar a 200 xg durante 5 min.
7. Descartar el sobrenadante de cada tubo y adicionar 300 μ L de buffer de lavado a cada tubo y resuspender.
8. Adquirir las muestra en un citómetro de flujo con láser dual, capaz de distinguir fluorescencias de 576 nm, 660 nm y >680 nm.