

APOPTOSIS DE NEUTRÓFILOS MEDIADA POR ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Estudiante

Angie Paola Alfonso Alfonso

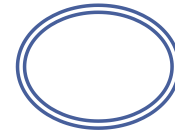
Susan Lorena Castro Molina MSc.

Asesora interna

Mary Lilián Carabalí Isajar MSc.

Asesora externa

CONTENIDO



1. INTRODUCCIÓN

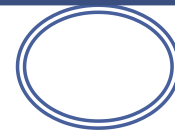
2. METODOLOGÍA

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

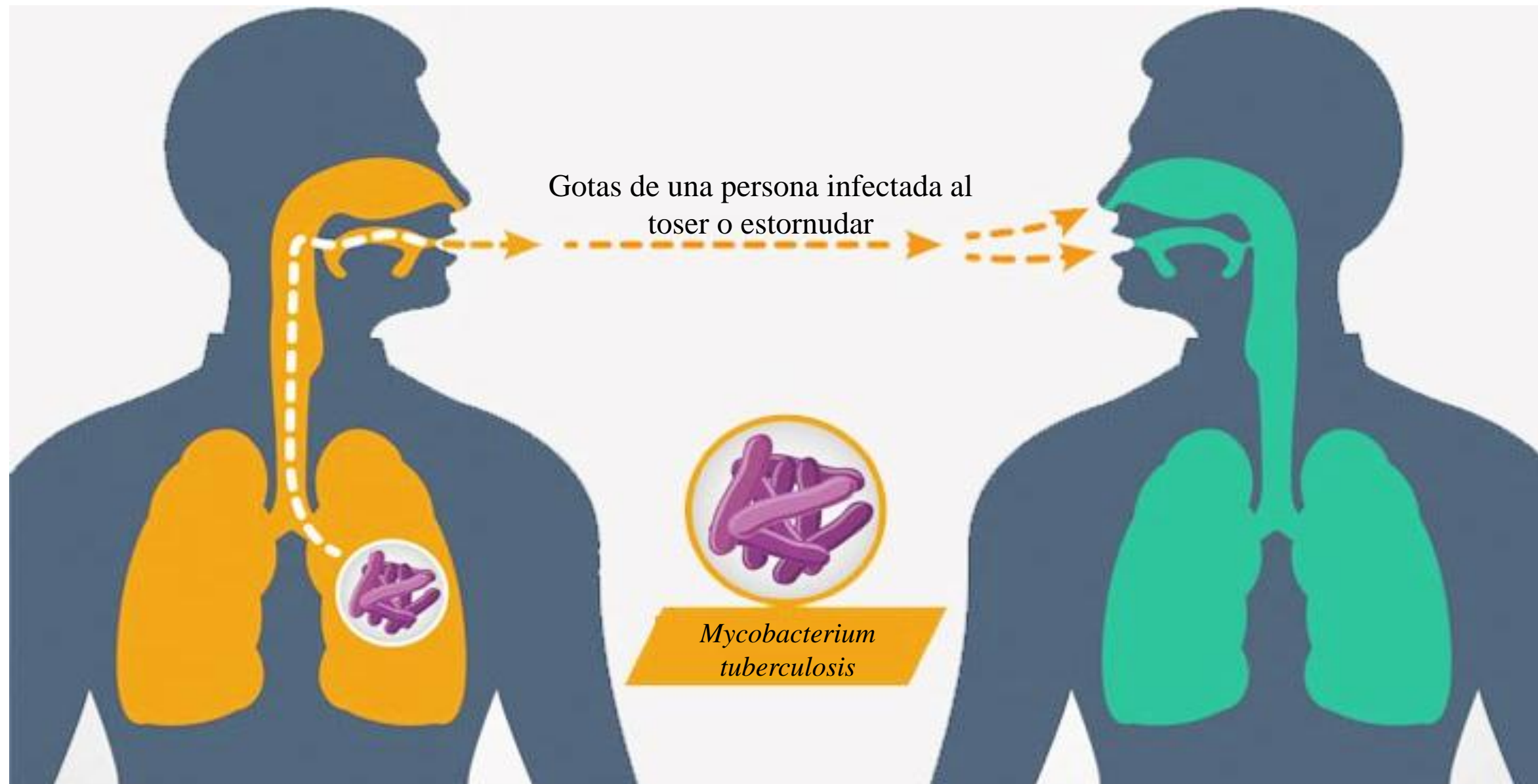
4. CONCLUSIONES

5. RECOMENDACIONES

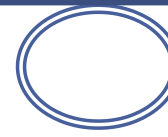
INTRODUCCIÓN



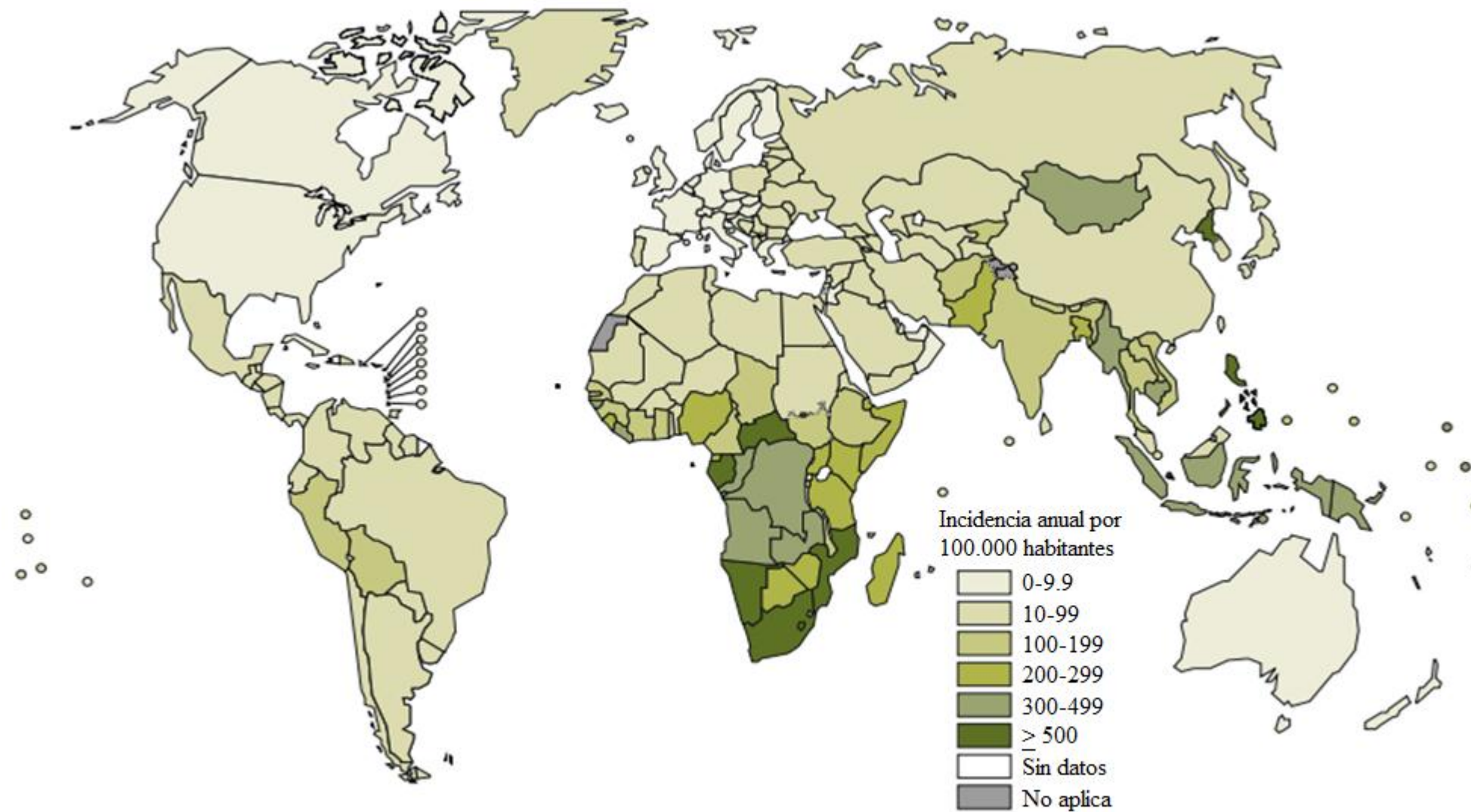
LA TUBERCULOSIS



INTRODUCCIÓN

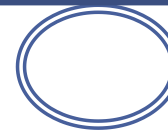


LA TUBERCULOSIS



10 millones de personas

INTRODUCCIÓN



LA TUBERCULOSIS

Tasa de incidencia de tuberculosis en Colombia 2018



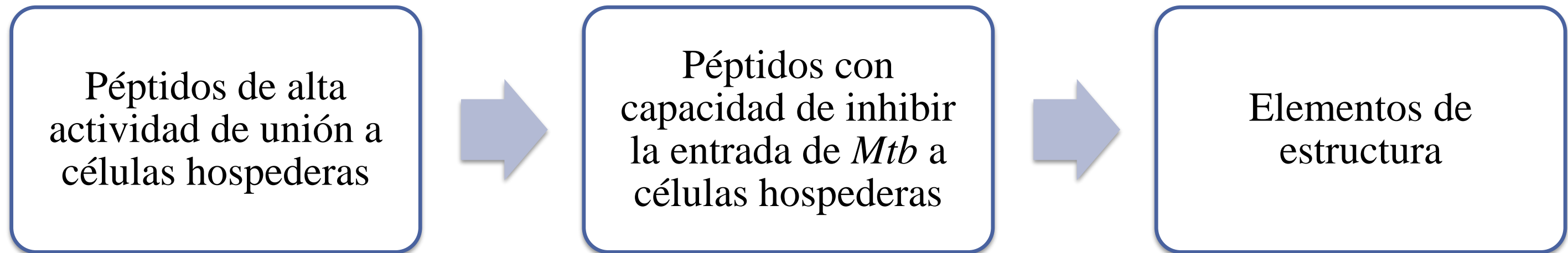
INTRODUCCIÓN



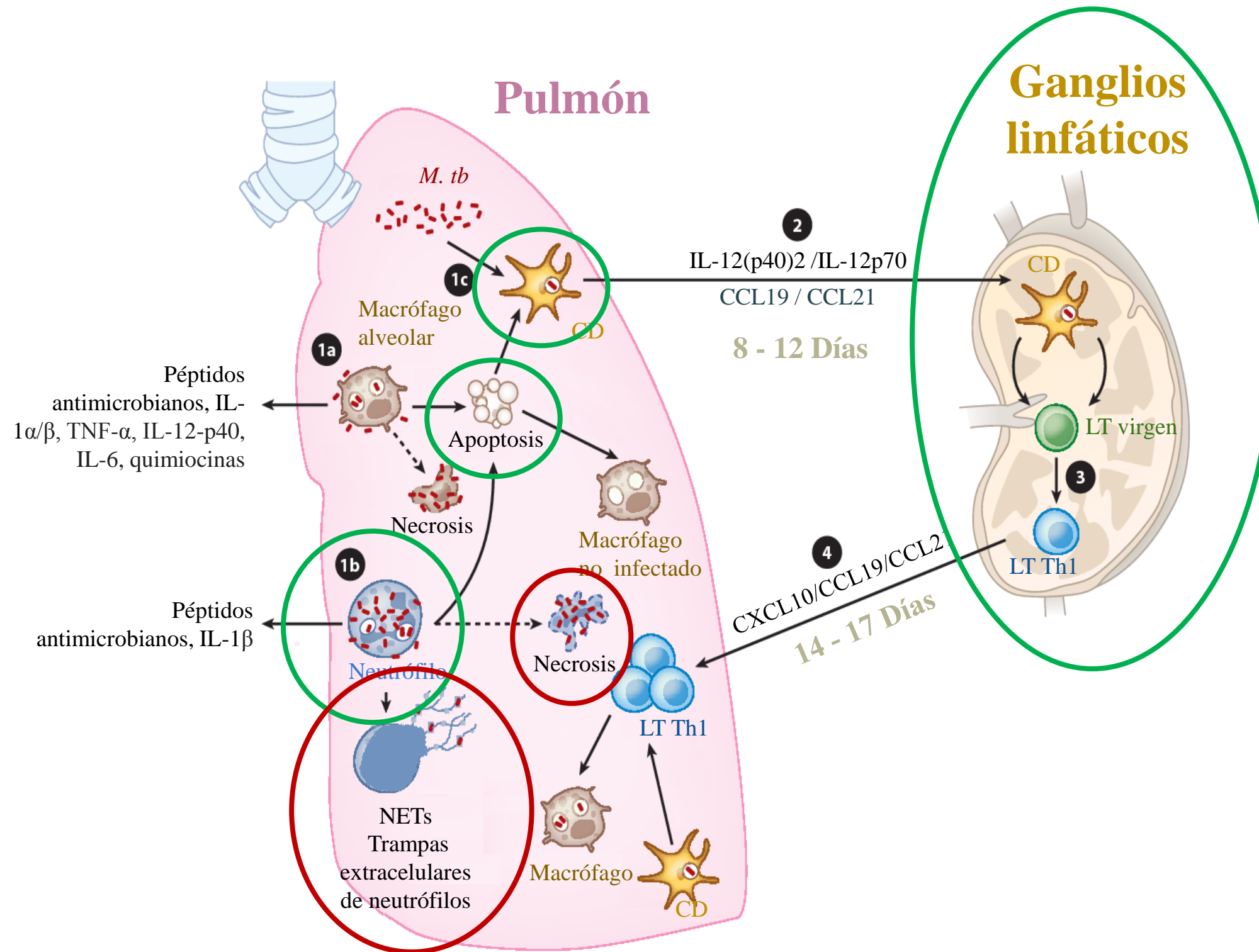
Es necesario buscar nuevas metodologías que contribuyan a la erradicación de la enfermedad, siendo la vacunación la alternativa más eficiente según la OMS



FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA (FIDIC)



RESPUESTA INMUNE PROTECTIVA FRENTE A *Mtb*



APOPTOSIS DE NEUTRÓFILOS

RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

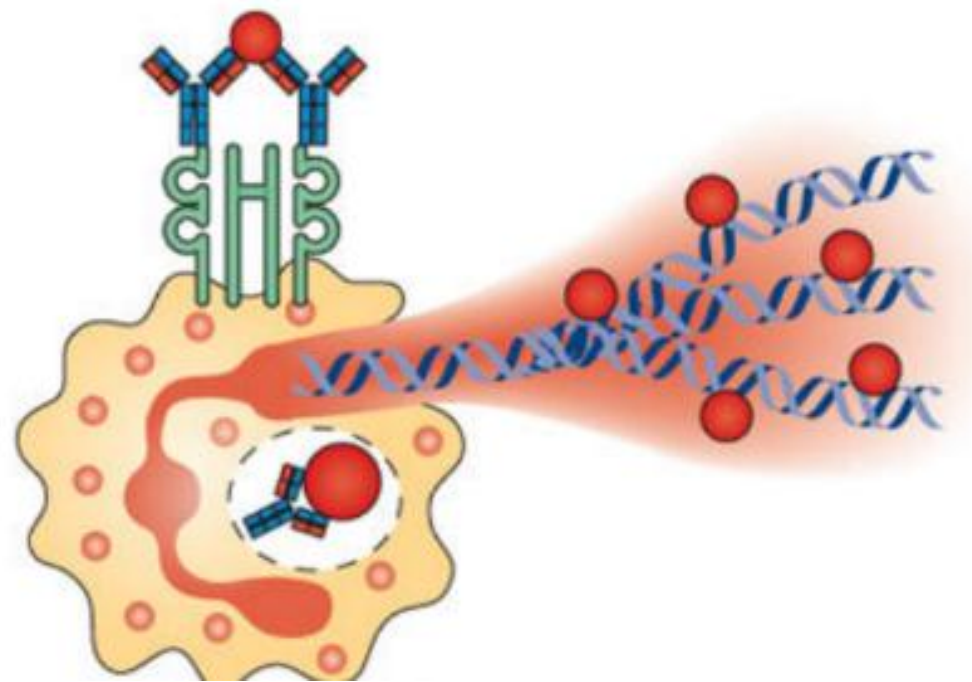


Modulation of Human Neutrophil Apoptosis by Immune Complexes

Romina Gamberale, Mirta Giordano, Analía S. Trevani, Graciela Andonegui and Jorge R. Geffner

This information is current as of November 30, 2019.

J Immunol 1998; 161:3666-3674; ;
<http://www.jimmunol.org/content/161/7/3666>



En la TB solamente se ha evidenciado que las IgGs promueve la Opsonofagocitosis

EVALUAR SI LA APOPTOSIS PUEDE SER MEDIADA POR IgG EN LA TB

OBJETIVOS

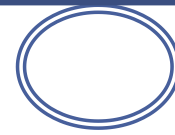
General

Evaluar la apoptosis de neutrófilos infectados por *Mtb* H37Rv durante la fagocitosis mediada por IgGs específica a antígenos de la envoltura micobacteriana.

Específicos

1. Seleccionar péptidos provenientes de proteínas de la envoltura de *Mtb* H37Rv que sean antigénicos mediante el uso de herramientas bioinformáticas e inmunoensayos.
2. Aislar anticuerpos IgGs que reconozcan antígenos peptídicos de *Mtb* H37Rv en sangre periférica.
3. Evaluar el porcentaje de apoptosis en neutrófilos mediante la formación del complejo antígeno-anticuerpo.

METODOLOGÍA



Objetivo 1

Determinación de epítopes B en antígenos peptídicos de *Mtb* H37Rv

Aproximación bioinformática

Aproximación experimental

Objetivo 2

Aislamiento de IgG afines a péptidos seleccionados

Purificación de IgG afines a péptidos seleccionados

Objetivo 3

Determinación de apoptosis en neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv mediado por IgG

Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica

Evaluación de apoptosis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1

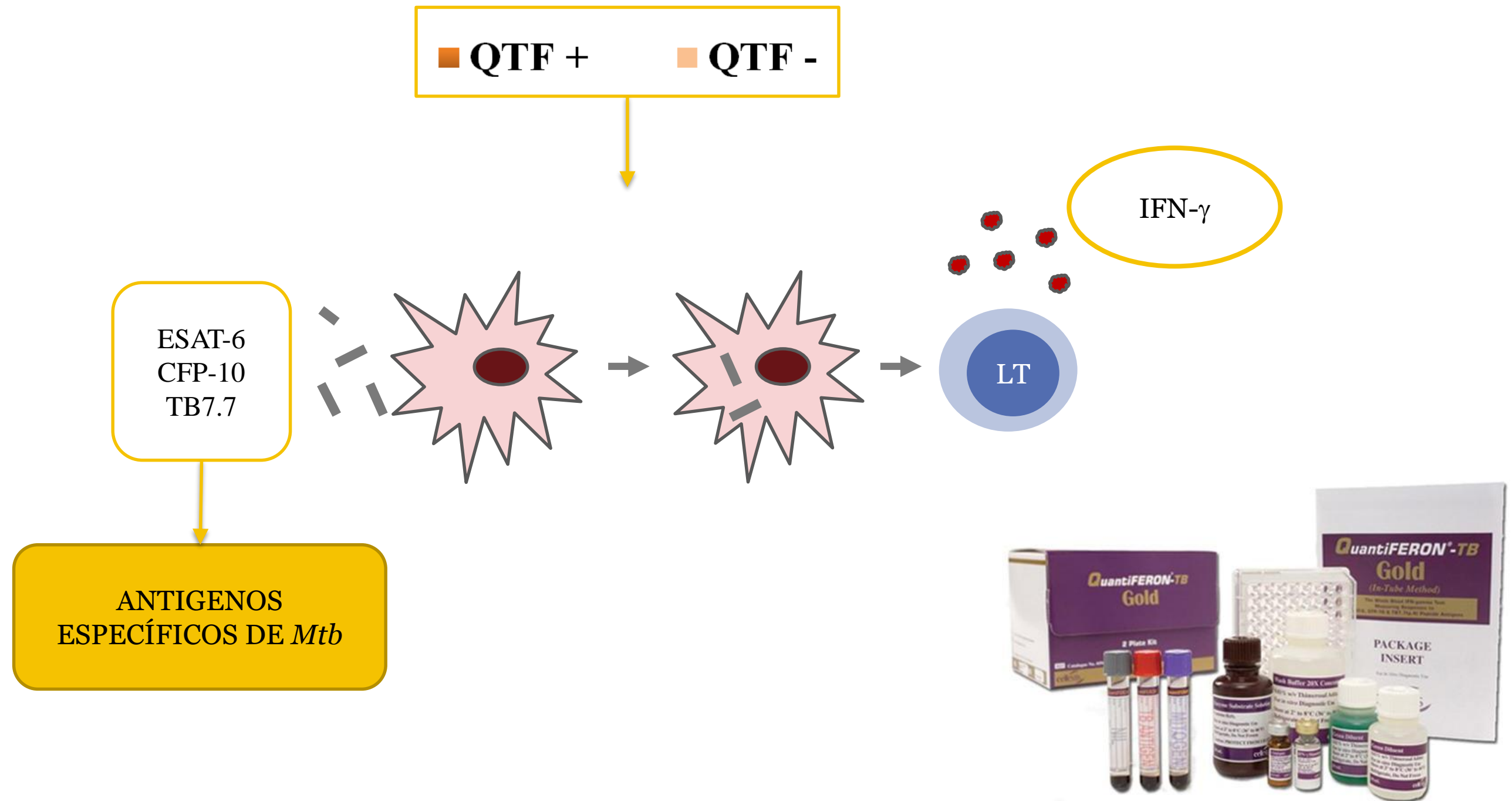
1. Predicción de epítopes B lineales (BepiPred 2.0)

Proteína	Péptido	Secuencia del péptido	Aminoácidos del epítope
Rv0180c	31024	AALYLGGILN <u>PMTNLR</u> HFPI	6
	31025	GPAGQ <u>QIVDGLVSGLDK</u> NKF	12
	31039	LGLPS <u>AGATVPLEAVPA</u> FFRY	12
	31028	RDFG <u>ASAVTPTRTDRPA</u> ITIIY	13
Rv0227c	16951	PRLGS <u>AQPPPPDAGH</u> PDPG	11
Rv0679c	30987	YKNG <u>DPTIDNLGAGNRI</u> NKE	13
Rv1268c	37964	AVALGLA <u>SPADAAAGT</u> MYGD	9
Rv1411c	37096	PDFN <u>ATQPVPA</u> TVWIQE	7
Rv1490	11073	FGRV <u>ESHADYHDWVC</u> EHVTP	11
Rv1911c	37763	MESPMT <u>STLHRTPLATA</u> GLAY	11
	37765	YVPKAT <u>TVDATTPAPA</u> AEPL	10
	37767	GANVAP <u>PLTWSSPAGAA</u> ELAY	11

Rv1980c	36827	TQIQ <u>MSDPA</u> YNINISLPSYY	5
	31107	IVQG <u>ELSKOTGOQVSIA</u> PNAY	13
Rv2004c	9111	AGYA <u>VRSAGDTAPASLRD</u> FYI	13
Rv2270	37775	TSSNGA <u>RGGIASTNMNPT</u> NPY	12
	37777	ETWIN <u>LQVGDTLADLPP</u> ADLY	12
	37780	GFAP <u>YTGQSVDTSPYS</u> VAYL	12
Rv2301	30960	CPNTR <u>LVPGGYSLGA</u> AVTDV	10
Rv2560	11024	VVAL <u>SDRATTAYTNTSG</u> VSS	13
Rv2707	16084	RIGVG <u>TTTYSSTAQHS</u> A VAA	12
Rv3166c	16298	MERE <u>LSHVPGVAPQDFD</u> TPTY	13
	16300	VSLFA <u>EARESPHVMNEEH</u> REY	13
Rv3494c	38373	HMRL <u>NSGTAIPSNVTAT</u> VRSY	13

Objetivo 1

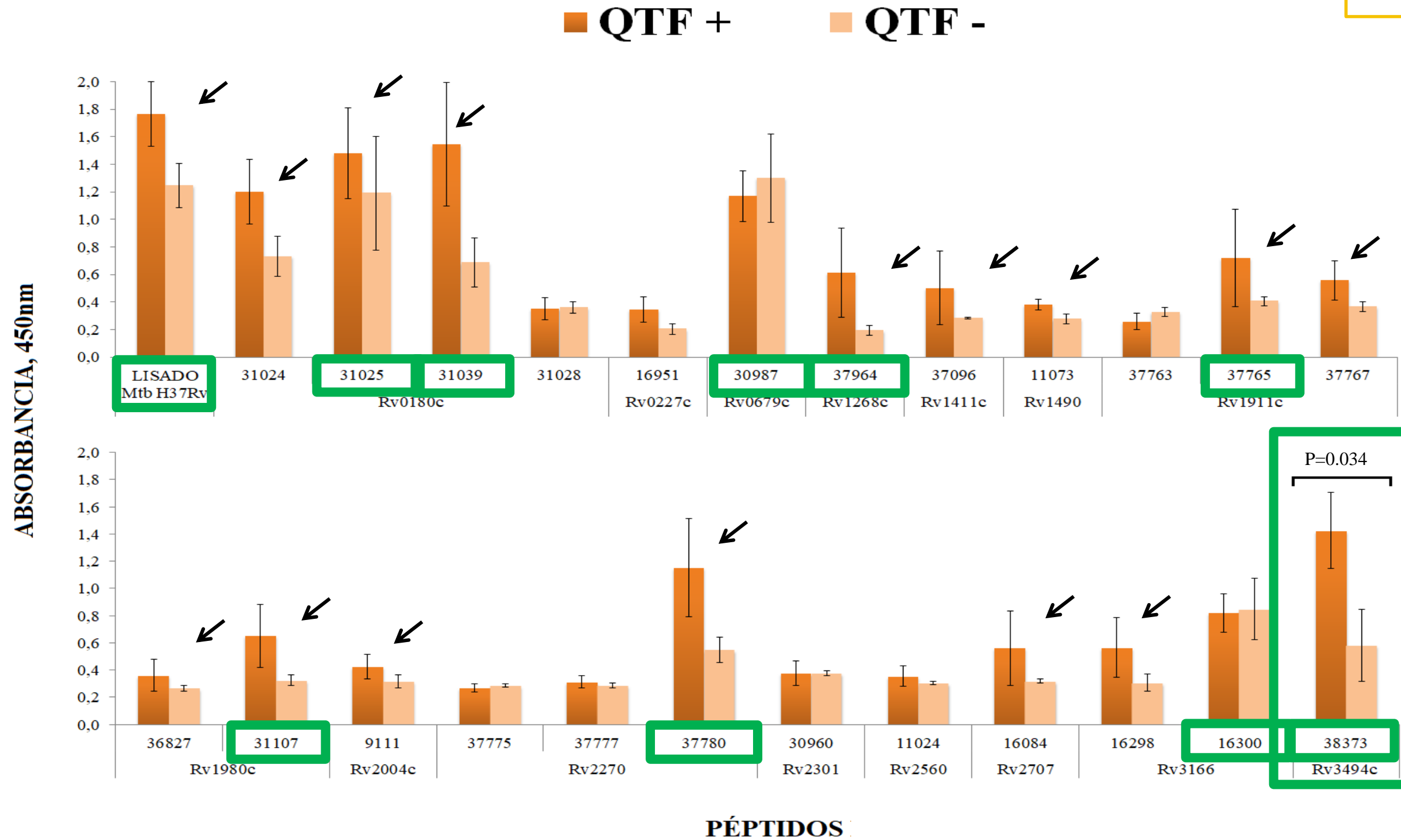
2. Evaluación de anticuerpos que reconocen péptidos en donantes



Objetivo 1

2. Evaluación de anticuerpos que reconocen péptidos en donantes

Li H *et al*, 2017
Lu L.L *et al*, 2019



METODOLOGÍA

Objetivo 2

Objetivo 1

Selección de epítopes B en antígenos peptídicos de *Mtb* H37Rv

Aproximación bioinformática

Aproximación experimental

Aislamiento de IgG afines a péptidos seleccionados

Purificación de IgG afines a péptidos seleccionados

Objetivo 3

Determinación de apoptosis en neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv mediado por IgG

Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica

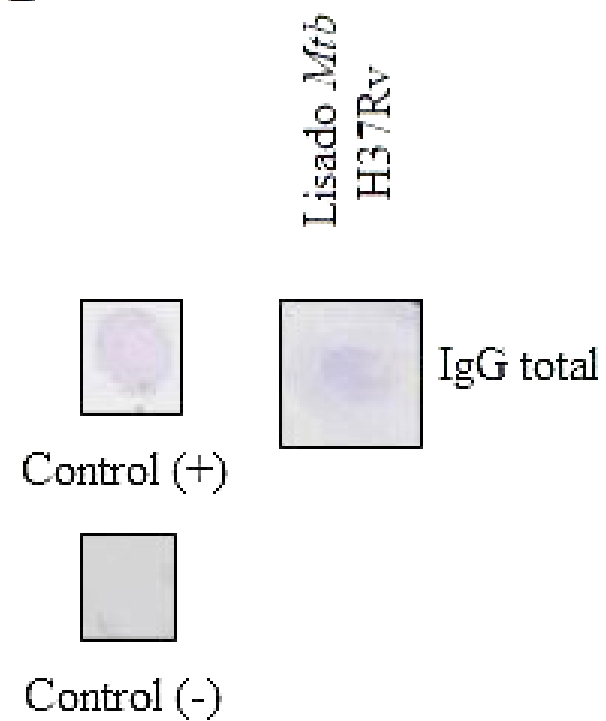
Evaluación de apoptosis

Objetivo 2

1. Aislamiento de inmunoglobulina G

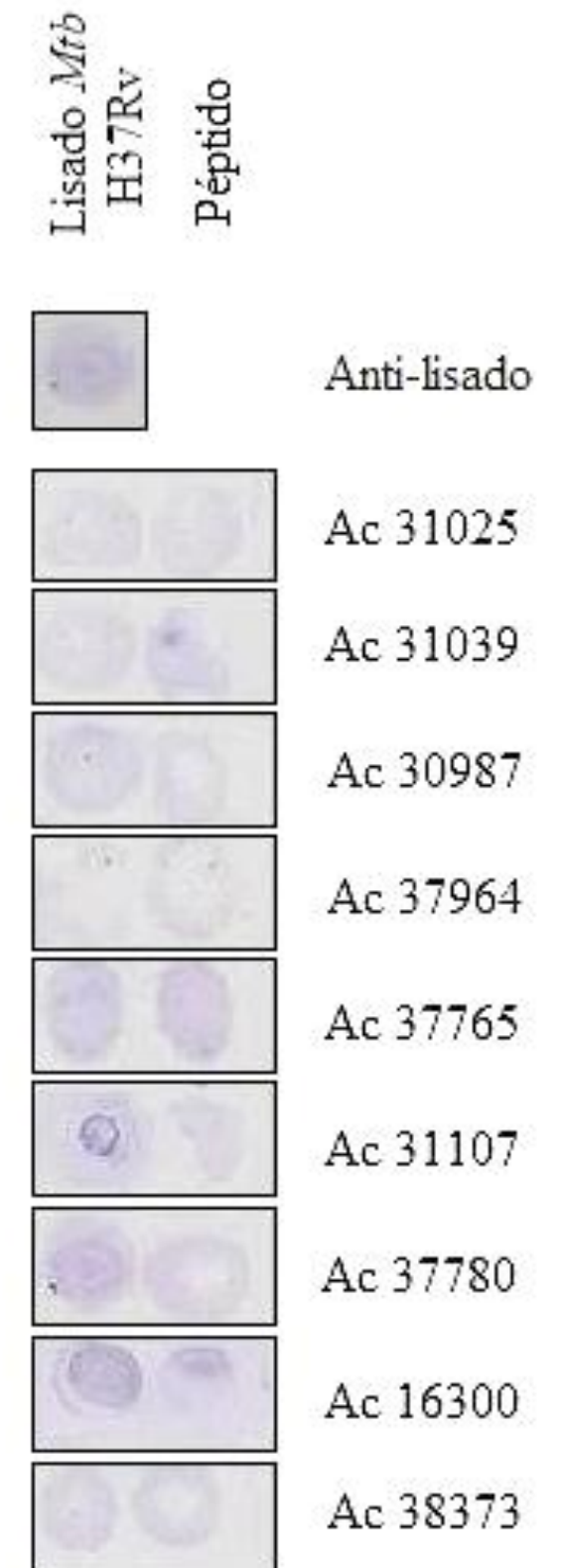
1.1 Obtención de IgG total
(Precipitación con ácido caprílico-sulfato de amonio)

A



1.2 Purificación de IgG que reconocieron a los péptidos seleccionados
(cromatografía de afinidad)

B



Objetivo 2

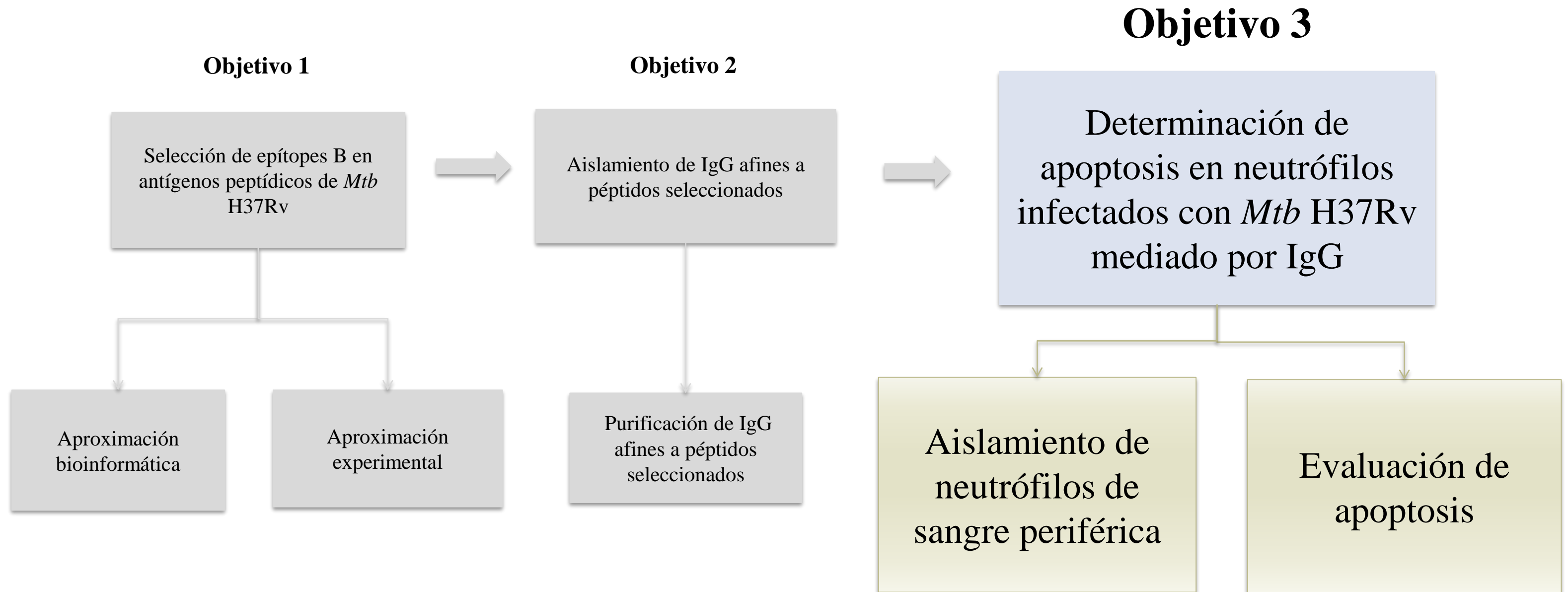
2. Cuantificación de IgG afines a péptidos seleccionados

		Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Rendimiento
Proteínas totales del suero		37028	
IgG total aislada		3703	10
IgG péptido- específica	31025	23.0	0.6
	31039	19.8	0.5
	30987	16.9	0.4
	37964	32.9	0.8
	37765	20.8	0.5
	31107	16.1	0.4
	37780	30.1	0.8
	16300	25.4	0.6
	38373	63.0	1.7

El 10% de las proteínas aisladas de suero corresponden inmunoglobulinas G

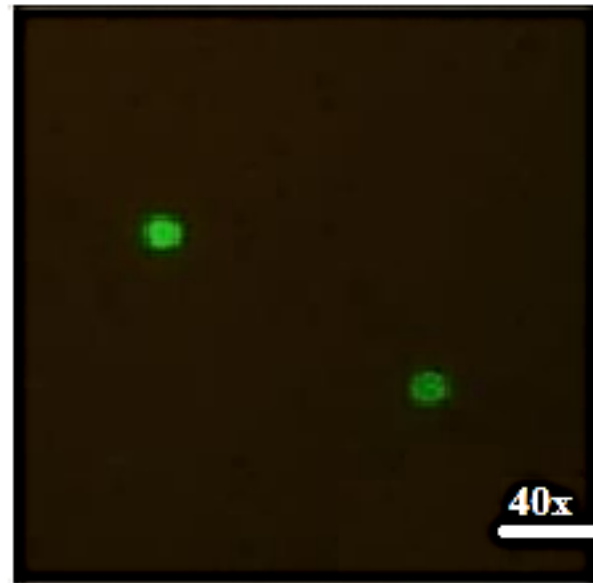
6.7% de las IgGs del donante reconocen los péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb*

METODOLOGÍA

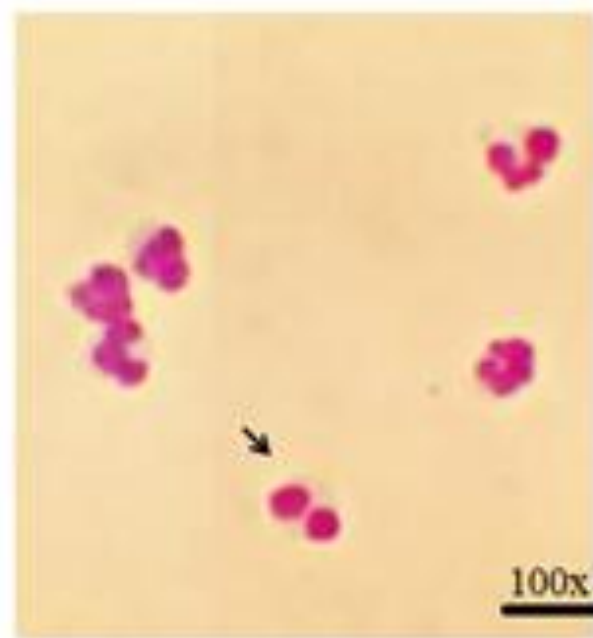


Objetivo 3

1. Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica



Naranja de acridina



Coloración de Giemsa

Aislamiento (gradiente de Ficoll
Histopaque / Lisis de G.R)

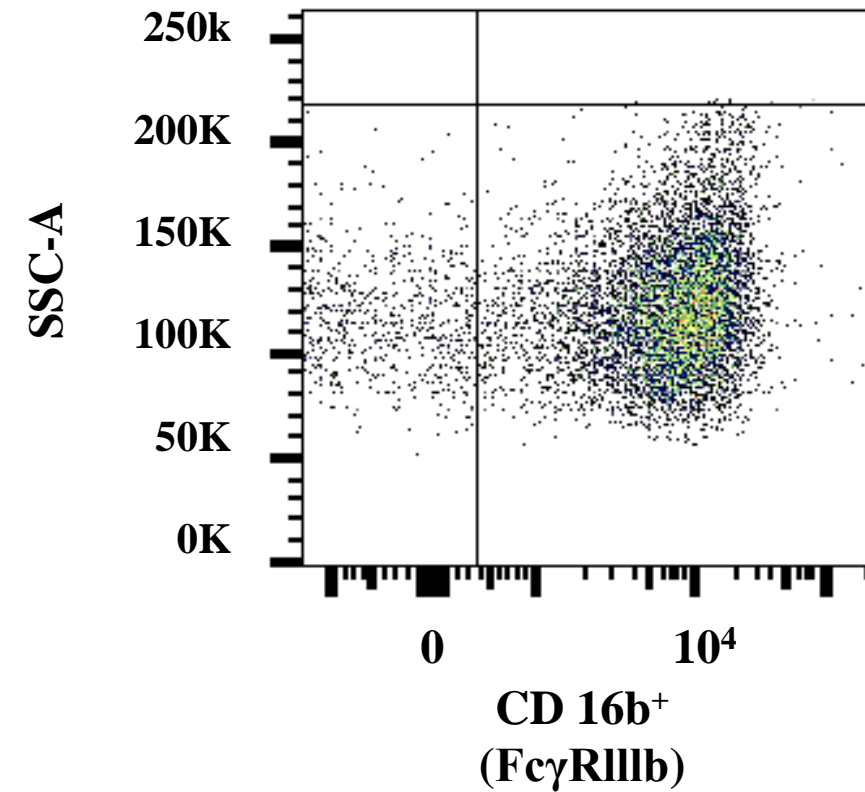
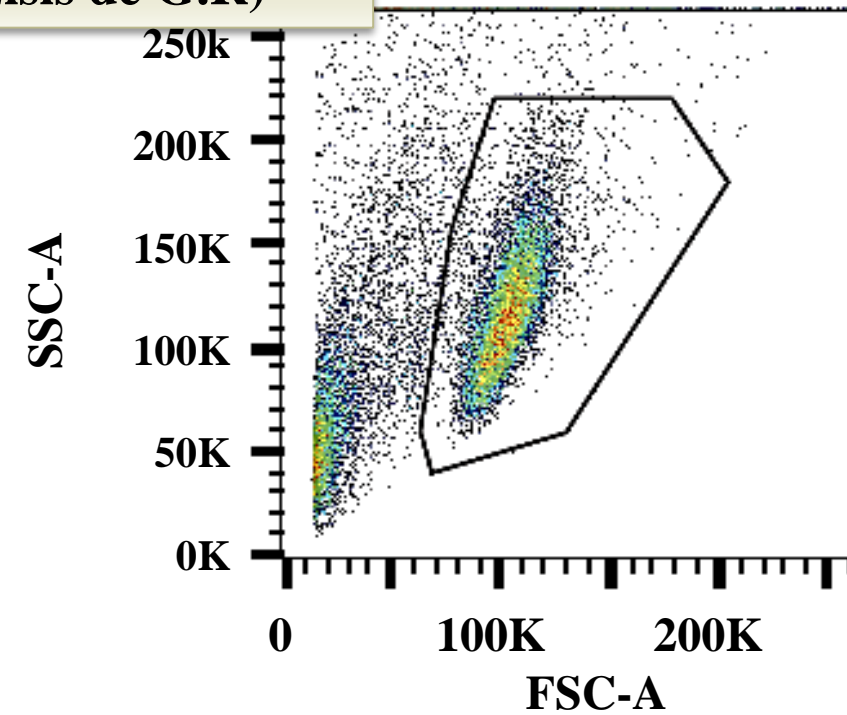
Azul de tripán

Viabilidad del
95-99%

Morfología
celular

5% de células
en apoptosis

Citometría de flujo

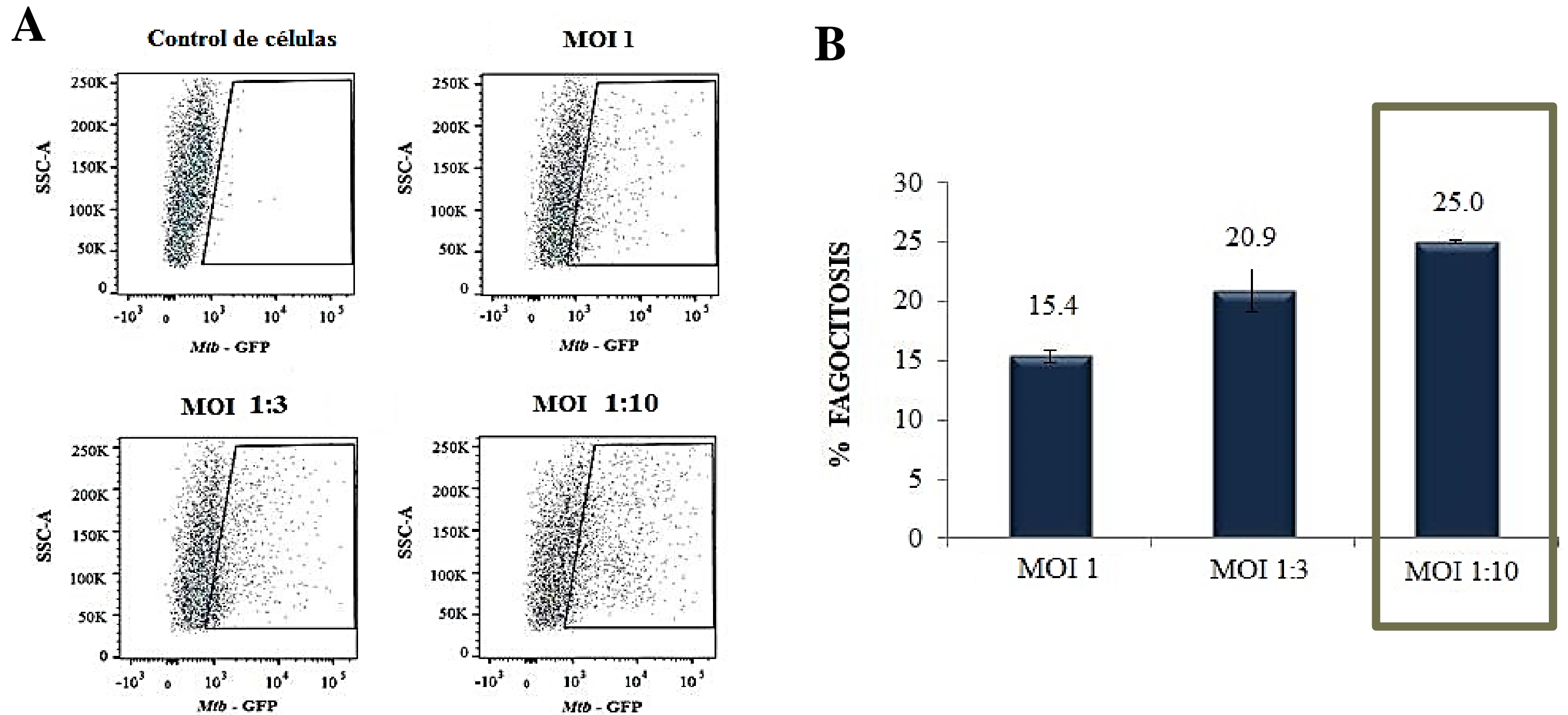


Pureza 95%

Andersson A.M *et al*, 2019

Objetivo 3

2. Estandarización MOI de infección



Objetivo 3

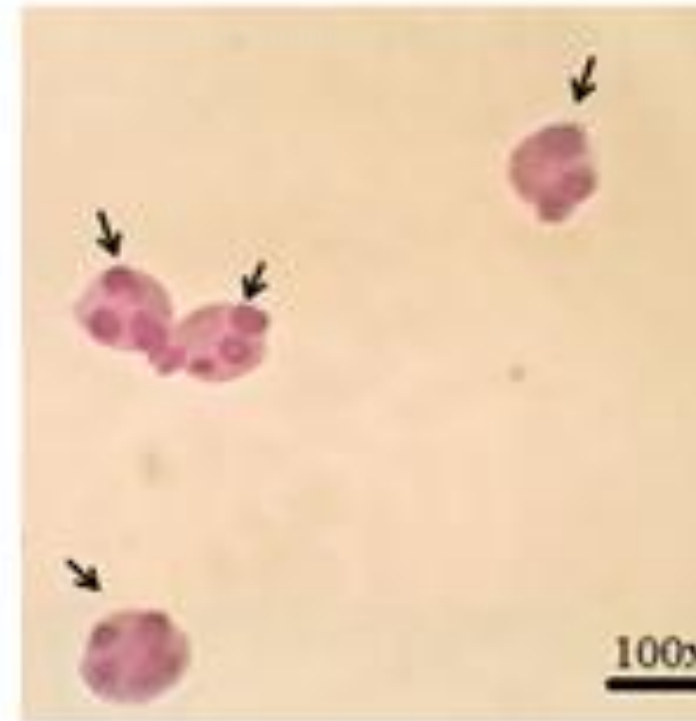
3. Evaluación de apoptosis en neutrófilos infectados

Células fijadas con
Paraformaldehído 4% y
Glutaraldehído al 0.5%

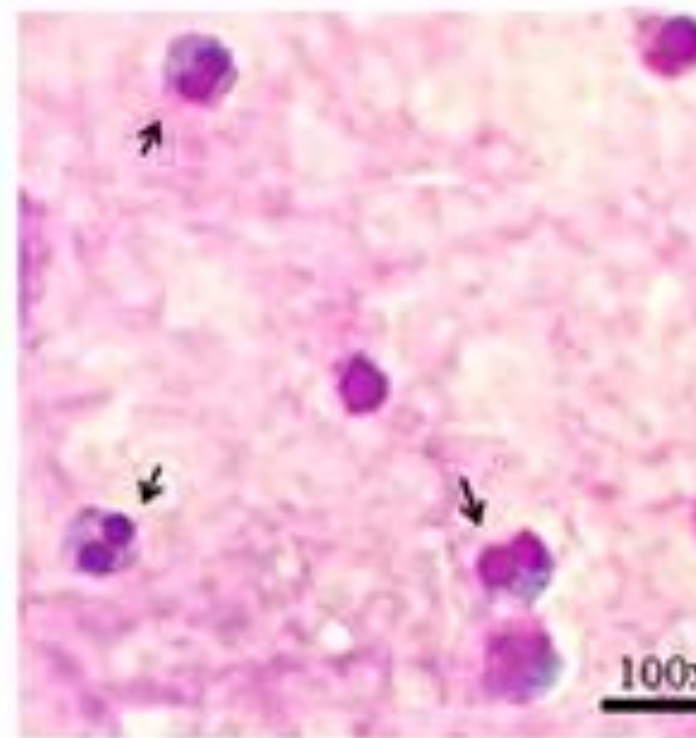


Coloración de Wright

Estandarización



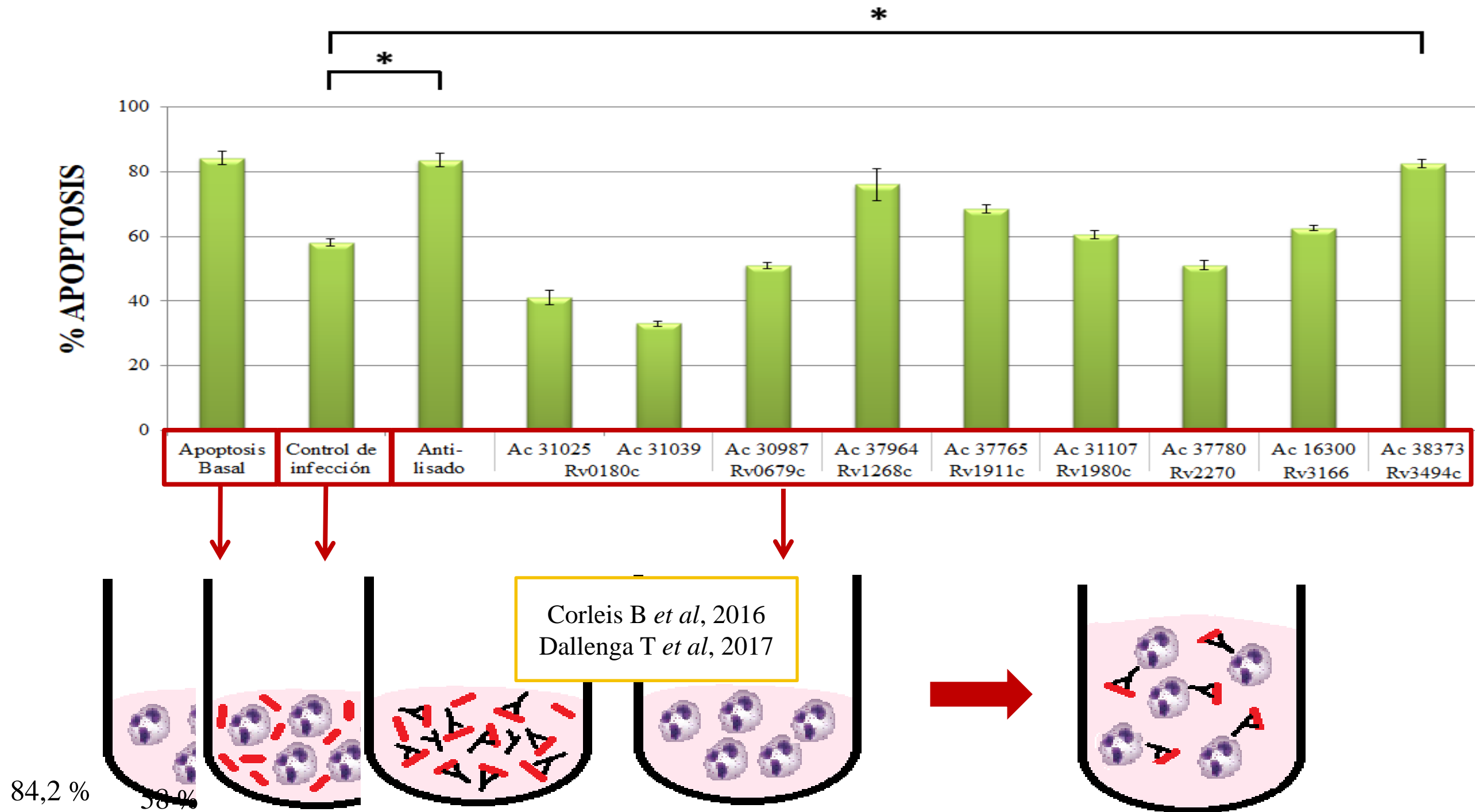
APOPTOSIS
BASAL



CONTROL DE
INFECCIÓN

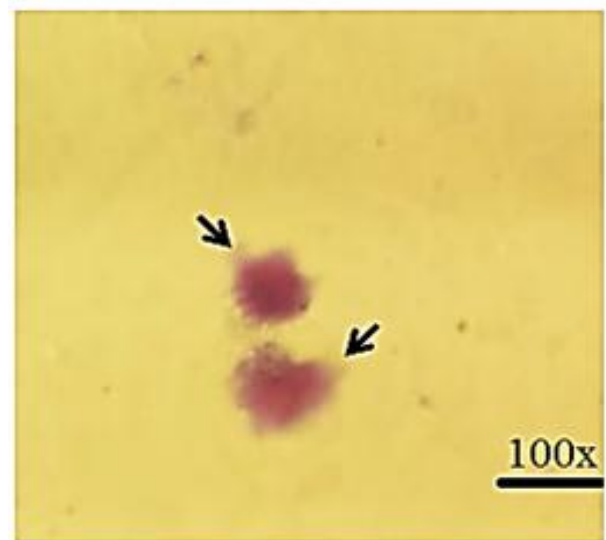
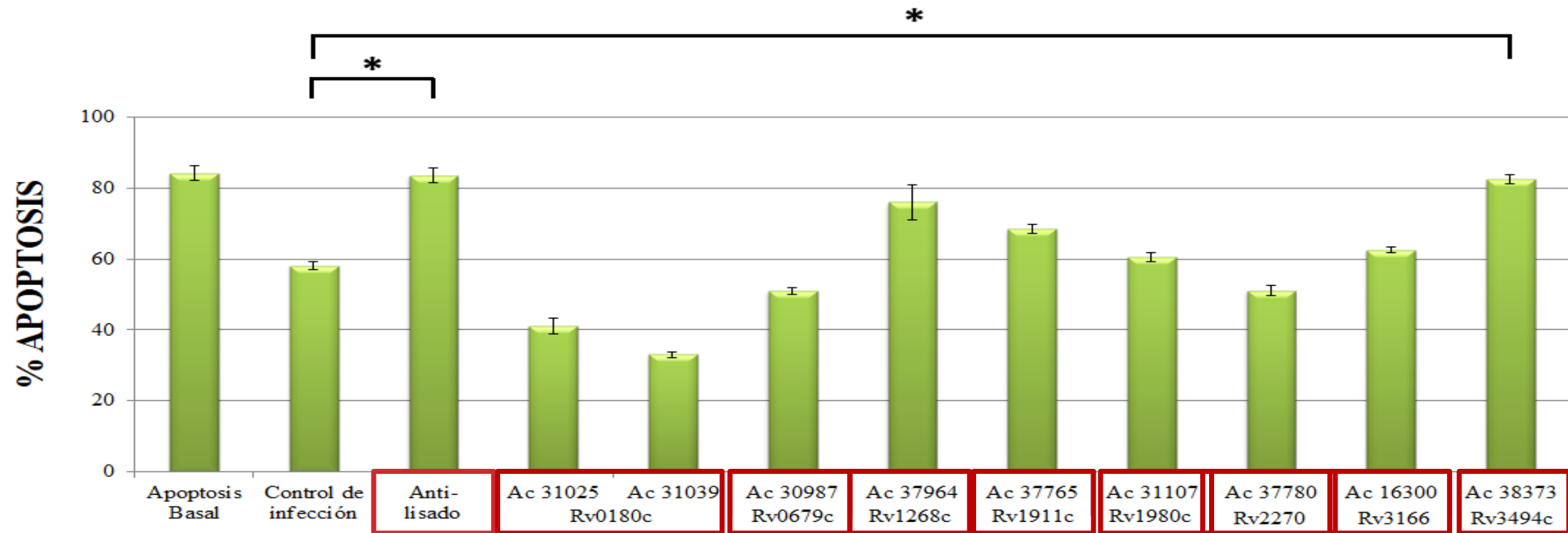
Objetivo 3

3. Evaluación apoptosis de neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv pre-opsonizada con IgG péptidos-específicos.



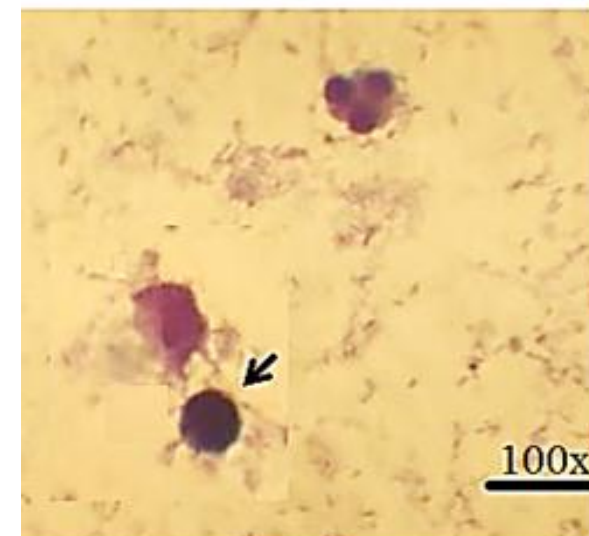
Objetivo 3

3. Evaluación apoptosis de neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv pre-opsonizada con IgG péptidos-específicos.



Dallenga T *et al*, 2017

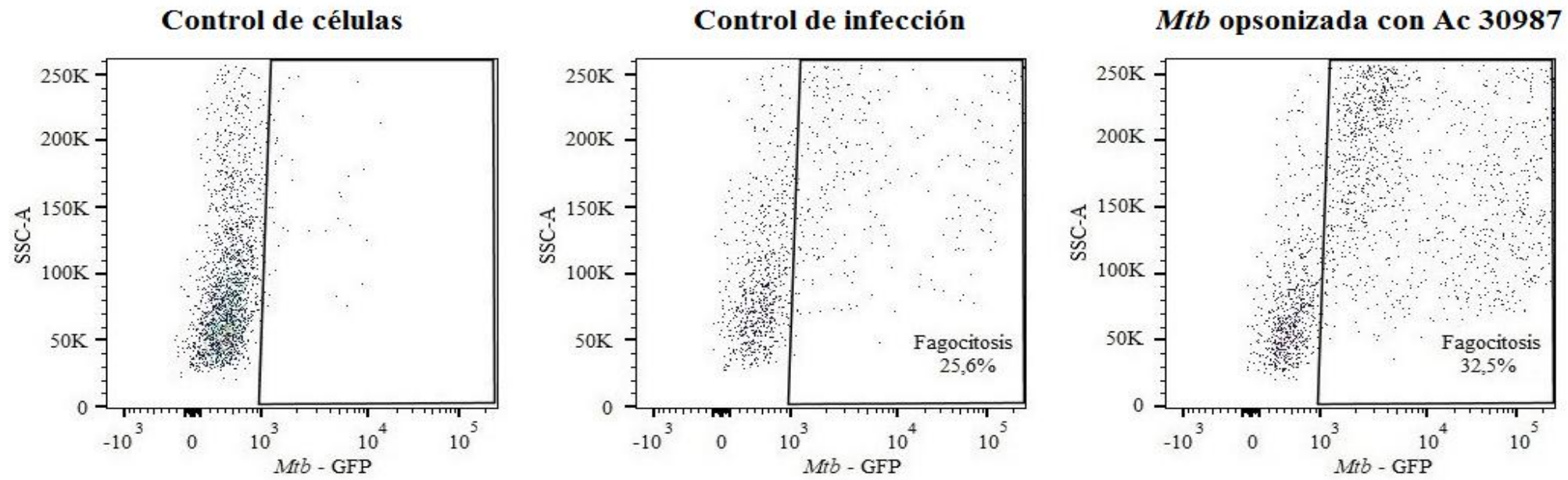
*P:≤0.05



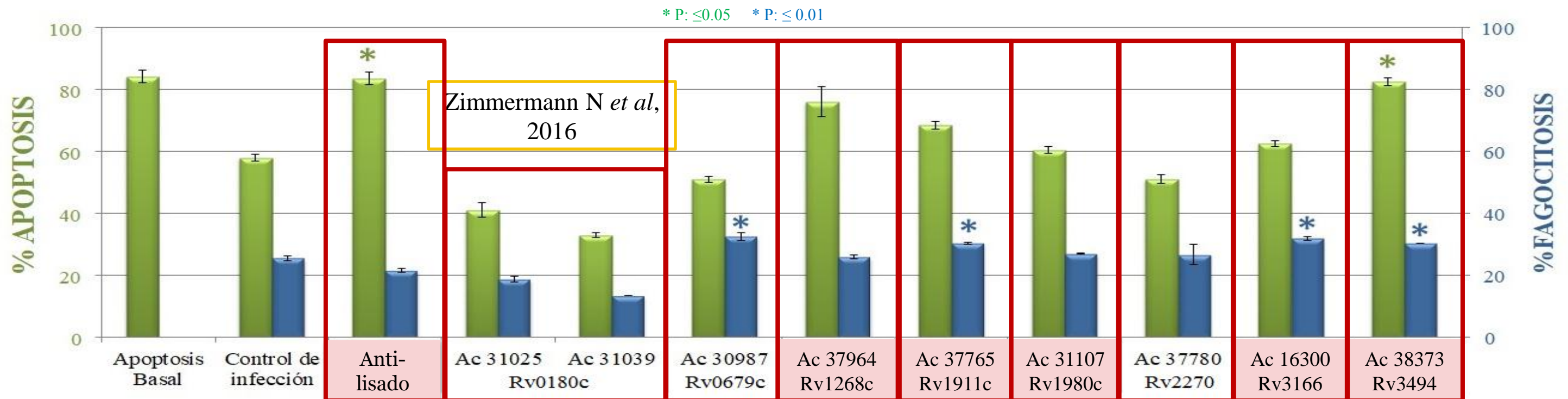
Aleyd E *et al*, 2014

Objetivo 3

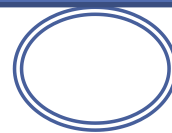
3. Evaluación fagocitosis de neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv pre-opsionizada con IgG péptidos-específicos.



Corleis B *et al* 2016
Hilda NJ *et al*, 2018



CONCLUSIONES

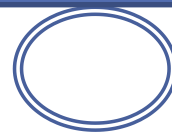


- Los péptidos evaluados derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* presentaron epítopes B.
- Los sueros de los donantes QuantiFERON positivos tuvieron mayor reconocimiento hacia la mayoría de los péptidos analizados en comparación con los donantes negativos.
- Se aislaron IgGs funcionales a partir de sangre periférica, evaluadas a través del Dot blot.
- Las IgGs que reconocen el lisado de *Mtb* H37Rv y 5 péptidos, podrían conducir a la apoptosis de neutrófilos infectados con *Mtb* opsonizada, de manera que dichos péptidos contribuirían de alguna forma a generar una respuesta inmune protectora.



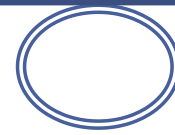
Los resultados de este trabajo permitirán evaluar los futuros candidatos peptídicos que se obtengan en la FIDIC para el diseño de una vacuna sintética contra tuberculosis

RECOMENDACIONES



- Considerar el uso de la Anexina V dado que esta metodología alterna comprueba los datos obtenidos de la apoptosis por conteo manual.
- Aumentar el número de individuos con el fin de evidenciar si las inmunoglobulinas que promovieron la apoptosis pueden mantener el mismo efecto en varios donantes.
- Realizar co-cultivos con macrófagos para evaluar si la apoptosis en neutrófilos promueve la presentación antigénica protectora contra la TB.

AGRADECIMIENTOS



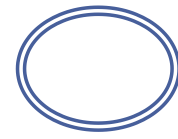
A mis padres, mi abuela y mis hermanos por el apoyo y la motivación pese a cada una de las dificultades.

A mis amigos y futuros colegas que hicieron de esta la mejor experiencia.

A cada uno de los docentes de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca que hicieron parte de mi formación integral y profesional, además de enseñarme todas las cosas maravillosas de mi carrera profesional que va dar inicio a los frutos de mi vida.

A mis asesoras Mary y Susan por el apoyo, sugerencias y comentarios que fueron importantes para terminar el proyecto de grado y que contribuyeron en mi formación profesional y personal.

A FIDIC en especial al grupo de Tuberculosis, a la doctora Marisol por darme la oportunidad de ser parte del grupo de investigación y adquirir nuevos conocimientos, a mis compañeros de laboratorio Jonathan, Christian y Camila por sus risas y enseñanzas.



DIAPPOSITIVAS

ANEXOS

MIARCO

TEORICO

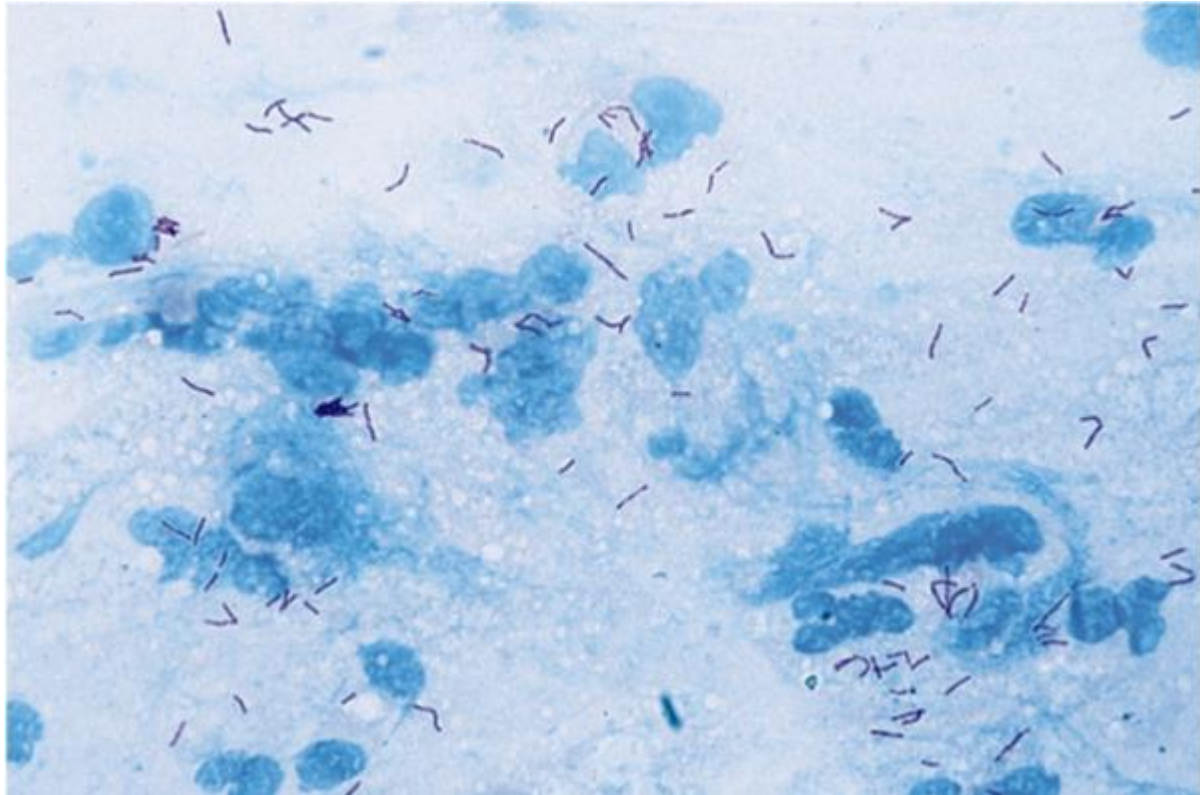
- ❖ Mtb y complejo MTB
- ❖ Micobacterias ambientales
- ❖ Sintomatología de la TB
- ❖ Diagnóstico de la TB
- Membrana micobacteriana
- ❖ Fármacos antituberculosos

- ❖ Vacunas
- ❖ FIDIC
- ❖ Formación del granuloma
- ❖ Artículo
- ❖ Funciones Ig
- ❖ IgG

- ❖ IgG e IgA
- ❖ Ensayos de unión
- ❖ Ensayos de inhibición
- ❖ Estructuras secundarias
- ❖ Enfermedad granulomatosa crónica



Mtb y el complejo MTB



COMPLEJO MTB

- Bacilos Ácido Alcohol Resistente
- Longitud de 1 a 4 micras
- Inmóviles
- No esporulados



- *M. tuberculosis*
- *M. bovis*
- *M. canetti*
- *M. africanum*
- *M. microti*
- *M. pinnipedi*
- *M. caprae*

TAXONOMÍA

Dominio: Bacteria
Filo: Actinobacteria
Orden: Actinomycetales
Suborden: Corynebacterineae
Familia: Mycobacteriaceae
Genero: *Mycobacterium*

BAAR: Son resistentes a la decoloración ácido-alcohólica debido a que sus pared contiene un alto contenido de lípidos

Sintomatología de la TB



TUBERCULOSIS PULMONAR

- ❖ Fiebre
- ❖ Escalofrío
- ❖ Debilidad
- ❖ Fatiga
- ❖ Tos severa
- ❖ Hemoptisis
- ❖ Pérdida de peso
- ❖ Sudores nocturnos

<https://www.who.int/topics/tuberculosis/es/>

SITIO DE INFECCIÓN	SINTOMATOLOGÍA
Ganglios linfáticos	Linfadenitis
Líquido pleural	Puede ser asintomática, pero en ocasiones cursa con la misma sintomatología de TB pulmonar y dolor torácico.
Sistema nervioso central	Meningitis (cefalea, fiebre, déficit neurológico), tuberculomas o abscesos cerebrales.
Huesos	Enfermedad de Pott (dolor en la columna), dolor en los huesos largos y osteomielitis.
Peritoneo	Dolor abdominal, fiebre, pérdida de peso, diarrea, ascitis, hepatomegalia y esplenomegalia.
Genitourinaria	Disuria, hematuria, inflamación pélvica y masas epididimales.
Corazón	Dolor torácico, tos, disnea, taquicardia, cardiomegalia y frotamiento de pericardio.

Modificado de *Diagnosis and treatment of tuberculosis: latest developments and future priorities*, 2017

Micobacterias ambientales

Micobacterias No Tuberculosas (MNT)

De crecimiento lento:

Micobacterias no cromógenas:

Mycobacterium avium complex

Mycobacterium celatum

Mycobacterium gastri

Mycobacterium genavense

Mycobacterium haemophilum

Mycobacterium malmoeense

Mycobacterium shigmoidei

Mycobacterium terrae complex

Mycobacterium triviale

Mycobacterium ulcerans

Mycobacterium xenopi

Micobacterias cromógenas:

Mycobacterium asiaticum

Mycobacterium flavescens

Mycobacterium gordonae

Mycobacterium kansasii

Mycobacterium marinum

Mycobacterium scrofulaceum

Mycobacterium simiae

Mycobacterium szulgai

Mycobacterium xenopi

De crecimiento rápido:

Micobacterias no cromógenas:

Mycobacterium abscessus

Mycobacterium chelonae

Mycobacterium fortuitum

Mycobacterium mucogenicum

Mycobacterium smegmatis

Micobacterias cromógenas:

Mycobacterium phlei

Mycobacterium vaccae

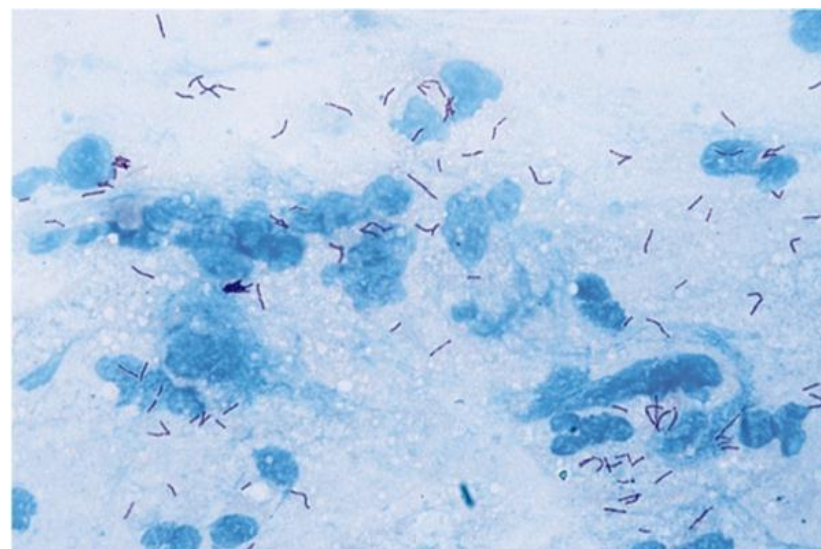
- *M. Kansasii*
- *M. Marinum*
- *M. Ulcerans*
- *M. Szugai*
- *M. Smegmatis*
- *M. Intracelullare*
- *M. fortuitum*

Clasificación de Runyon 1959

Diagnóstico de la TB

CRITERIOS

- ❖ Bacteriológico
- ❖ Histopatológicos
- ❖ Clínicos
- ❖ Epidemiológicos
- ❖ Prueba de Tuberculina y QuantiFERON
- ❖ Radiológicos



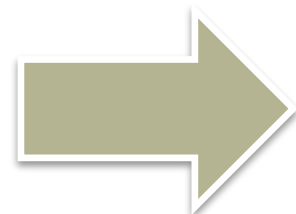
Ziehl Neelsen



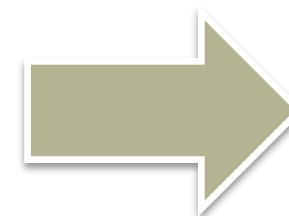
Auramina-rodamina

Resultado del examen microscópico	Informe
No se encuentran BAAR en los 100 campos observados	No se observan bacilos ácido-alcohol resistentes
Se observan de 1 a 9 BAAR en 100 campos observados	Nº exacto de bacilos en 100 campos
Se observan de 10 a 99 BAAR en 100 campos observados	Positivo (+)
Se observan de 1 a 10 BAAR en 50 campos observados	Positivo (++)
Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados	Positivo (+++)

Diagnostico de la TB

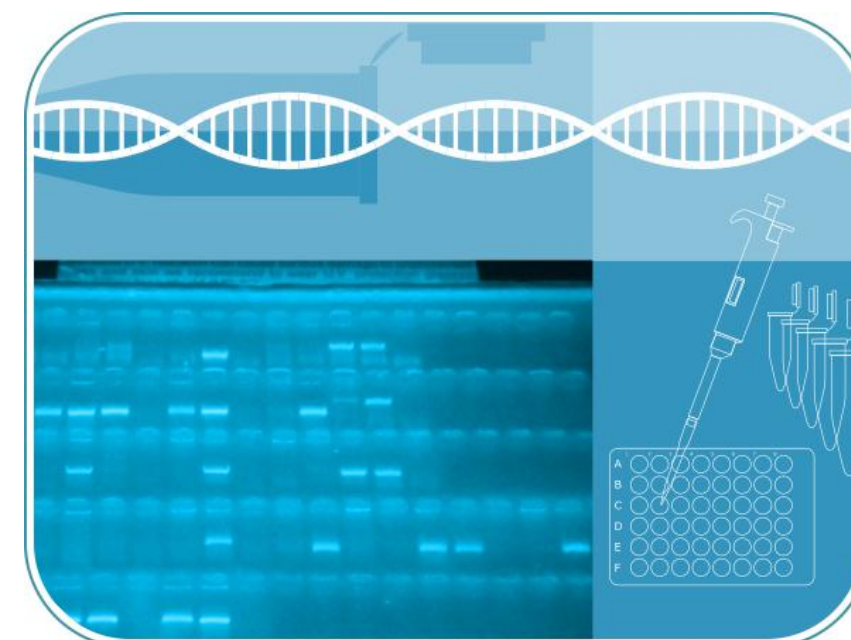


Antibiograma



Identificación
fenotípica

(MPT64-
inmunoanálisis
cromatográfico)



Ogawa-kudoh
Lowenstein-Jensen

Middlebrook 7H10 y 7H9

Caldos sensores de
crecimiento (MGIT y
MB/BacT)

Tabla 5. Identificación fenotípica de las micobacterias de crecimiento lento más frecuentes

Especie	NIA	NIT	AS	Tw80	URE	NaCl	C-SQ	C-68°	INH 1	INH 10	HIDRO	P-NB	OLE	PZA	22°C	30°C	37°C	42°C	PIGMENTO
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	-	-	-	V	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	NO
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	V	-	-	-	+	V	+	V	-	-	+	+	V	-	NO
<i>M. genavense</i>	-	-	-	-	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	-	+	+	+	NO
<i>M. bovis</i>	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	-	NO
<i>M. nonchromogenicum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	V	V	+	+	+	+	V	NO
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	+	+	-	NO
<i>M. haemophilum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-	+	ND	+	+	+	-	-	NO
<i>M. celatum</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	ND	ND	-	+	+	+	NO
<i>M. terrae</i>	-	V	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	V	-	+	+	+	-	NO
<i>M. triplex</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	-	NO
<i>M. triviale</i>	-	+	-	V	-	+	+	+	+	+	ND	+	ND	-	+	+	+	-	NO
<i>M. africanum</i>	V	V	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	V	+	V	NO
<i>M. microtii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND	+	-	NO
<i>M. malmoense</i>	-	-	-	+	V	-	-	V	+	-	V	+	-	+	+	+	+	-	NO
<i>M. kansasii</i>	-	+	V	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	FOTO
<i>M. marinum</i>	-	-	V	+	+	-	V	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	V	-	FOTO
<i>M. asiaticum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	+	-	+	-	+	+	+	-	FOTO
<i>M. simiae</i>	v	-	-	-	+	-	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	+	FOTO
<i>M. lentiflavum</i>	-	-	-	-	-	ND	V	V	+	ND	+	+	V	V	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. scrofulaceum</i>	-	V	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	ESCOTO
<i>M. gordonae</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	V	+	V	-	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. xenopi</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	V	-	+	-	V	+	+	ESCOTO
<i>M. szulgai</i>	-	+	-	V	+	-	+	+	-	ND	-	+	+	+	+	+	+	-	ESCOTO

NIA: Niacina; NIT: Nitratos; AS: Arilsulfatasa (3 días); Tw80: Tween 80; URE: Ureasa; NaCl: NaCl 5%; C-SQ: Catalasa semicuantitativa; C-68°: Catalasa termoestable (68°C); INH 1: Isoniacida 1 µg/ml; INH 10: Isoniacida 10 µg/ml; HIDRO: Hidroxilamina; P-NB: ácido p-nitrobenzoato; OLE: Oleato; PZA: Pirazinamidasa; 22°C, 30°C, 37°C, 42°C: Temperaturas de incubación; +: Positivo; -: Negativo; V: Variable; ND: no determinado; FOTO: Fotocromógeno; ESCOTO: Escotocromógeno; NO: No cromógeno

Diagnostico de la TB

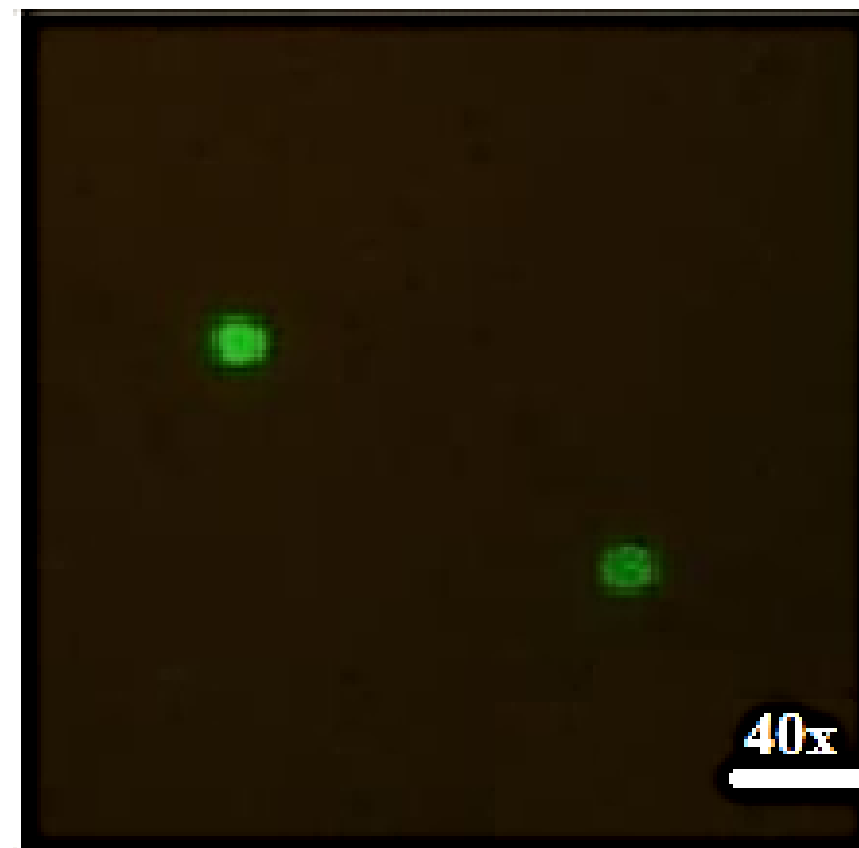
Los ácidos micólicos de las paredes celulares de las micobacterias poseen afinidad para los fluorocromos auramina y rodamina. Estos colorantes se fijan a las bacterias, que aparecen de color amarillo o naranja brillante contra un fondo verdoso.



Naranja de acridina

El fluorocromo naranja de acridina se une al ácido nucleico ya sea en su forma nativa o desnaturalizada. En algunas preparaciones de naranja de acridina, el color de la fluorescencia puede variar, dependiendo del pH y de la concentración. El naranja de acridina ha sido empleado como colorante vital, que da una fluorescencia verde si el microorganismo está vivo y roja si está muerto.

Atraviesa la
membrana



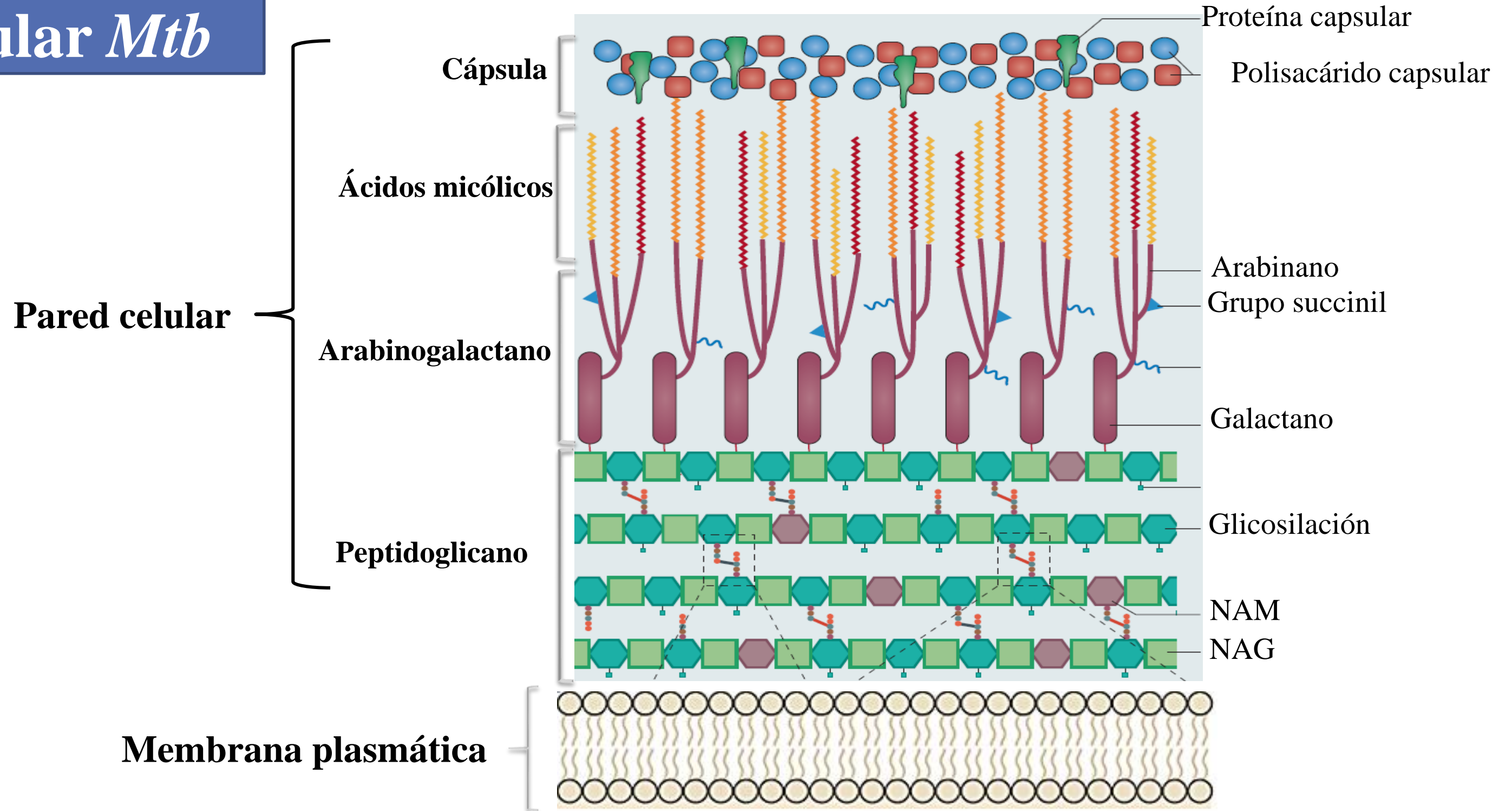
Fármacos antituberculosos

Fármaco	Dosis diaria	Dosis 2/semana	Efectos Secundarios	Acción
Isoniacida	5 mg/kg hasta 300	15 mg/kg hasta 900	Neuritis Hepatitis Hipersensibilida	Bactericida extra e intracelular
Rifampicina	10 mg/kg hasta 600*	10 mg/kg hasta 600	Hepatitis Reacción febril Púrpura	Bactericida todas poblaciones Esterilizante
Pirazinamida	15-30 mg/kg hasta 2,5 g	50 mg/kg hasta 3,5 g	Hiperuricemia Hepatitis	Bactericida intracelular Esterilizante
Etambutol	15-25 mg/kg hasta 2 g**	50 mg/kg hasta 3 g	Neuritis óptica	Bacteriostático extra e intracelular
Estreptomina	15-20 mg/kg hasta 1 g	25-30 mg/kg hasta 1 g	hipersensibilida	Bactericida Extracelular



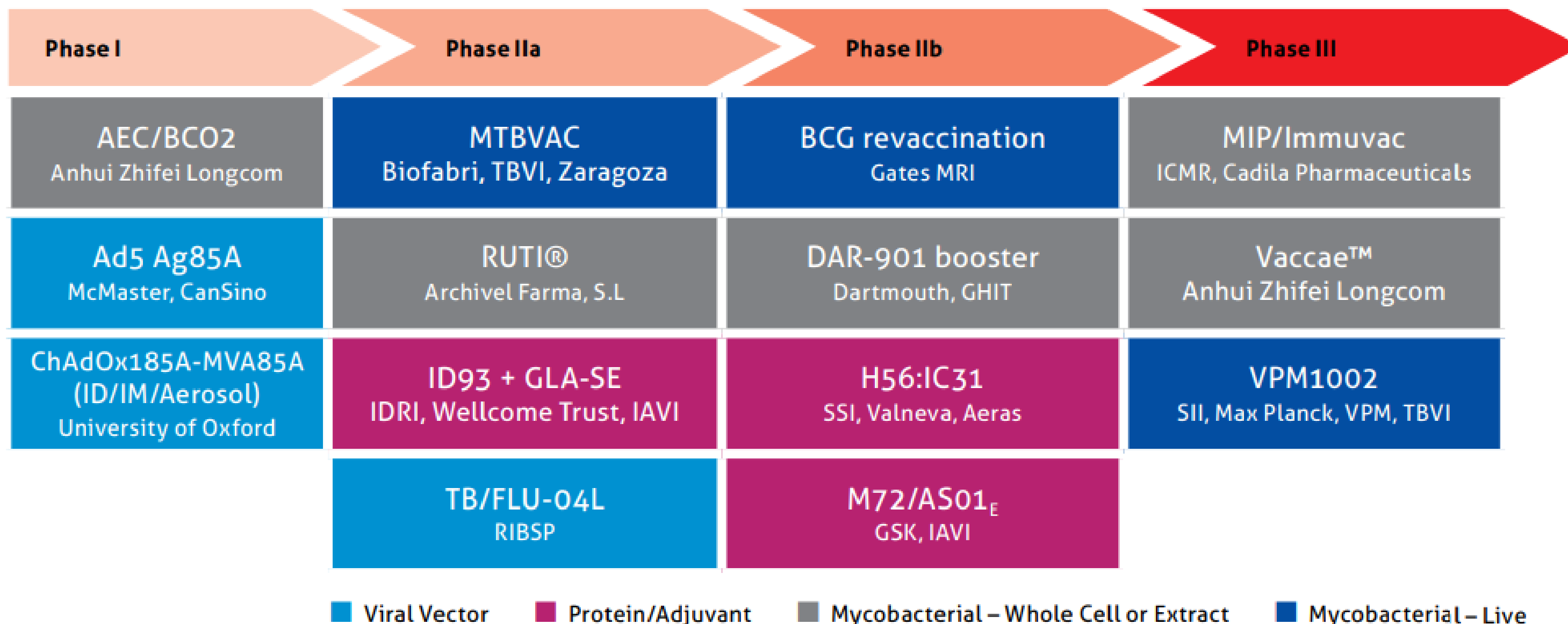
Capreomicina	15-30 mg/kg hasta 1 g	nefrotóxico	bactericida extracelular
Kanamicina	15-30 mg/kg hasta 1 g	nefrotóxico	bactericida extracelular
Etionamida	15-30 mg/kg hasta 1 g	trastornos hepatotóxico	bacteriostático extra e intracelular
PAS	150 mg/kg hasta 12 g	trastornos hepatotóxico	bactericida extracelular
Cicloserina	10-20 mg/kg hasta 1 g	psicosis convulsión eritema	bacteriostático extra e intracelular

Envoltura celular *Mtb*



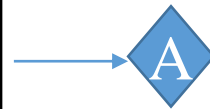
Vacunas

14 CANDIDATOS A VACUNA



SEGURIDAD, LA INMUNOGENICIDAD Y LA EVALUACIÓN DE EFICACIA
EN EL MODELO ANIMAL INICIAL

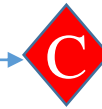
Etapa A
Descubrimiento



Etapa B
Estudios POC



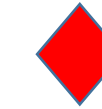
Etapa C
Evaluaciones pre-clínicas



Etapa D
Preparar Fase 1



Filtro: punto en el que se aplican criterios de selección para decidir si se mueve a la siguiente etapa



Filtro de inversión crítica

DESARROLLOS PRE-CLÍNICOS, ESTUDIOS CON ANIMALES ESTUDIOS DE TOXICIDAD Y PREPARAR LA APLICACIÓN DE ENSAYO CLÍNICO

Etapa F
Fase II



Etapa E
Fase I

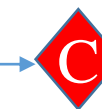
ESTUDIOS CLÍNICOS, ESCALAMIENTO Y VALIDACIÓN



Etapa G
Fase IIB

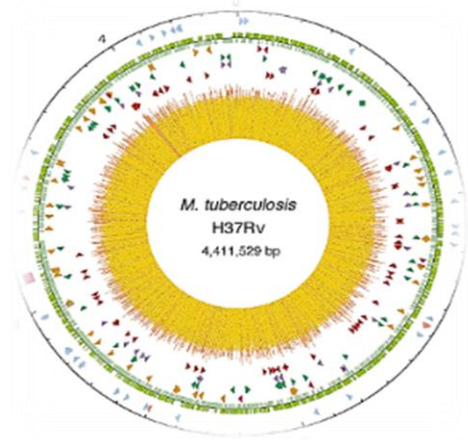


Etapa H
Fase III



Registro

Metodología de FIDIC

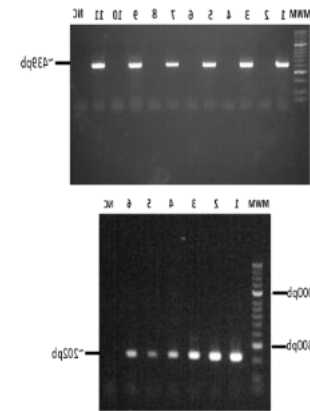


Descrito por Cole et al,
1998

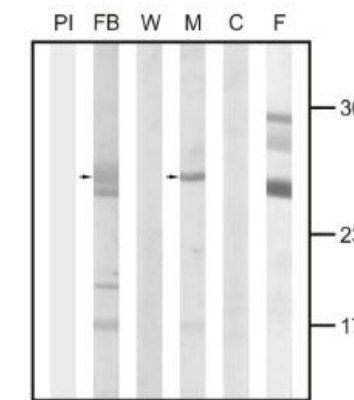
Bioinformática



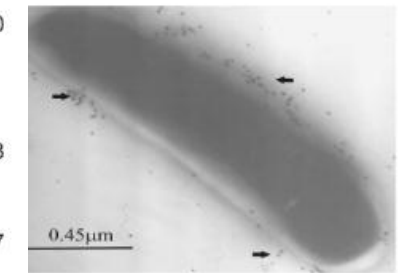
Presencia y transcripción



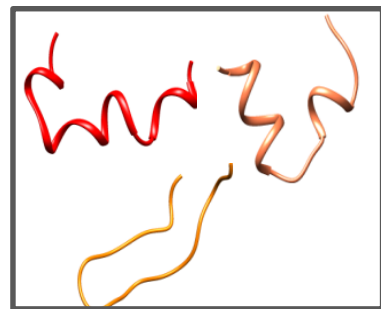
Inmunoblot



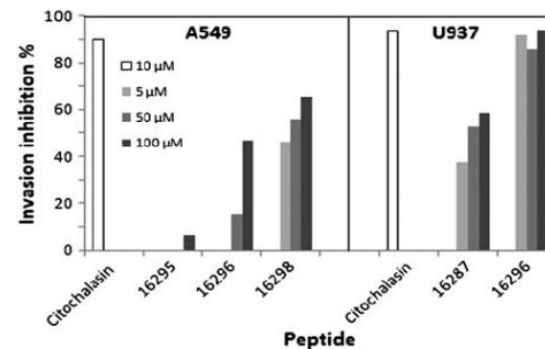
Microscopía electrónica



Determinación de la estructura secundaria



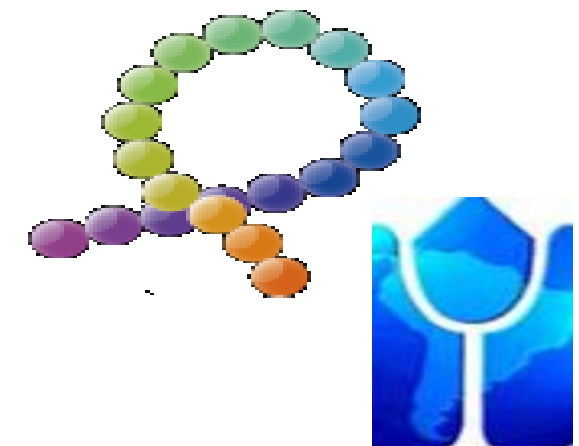
Inhibición de la entrada del patógeno



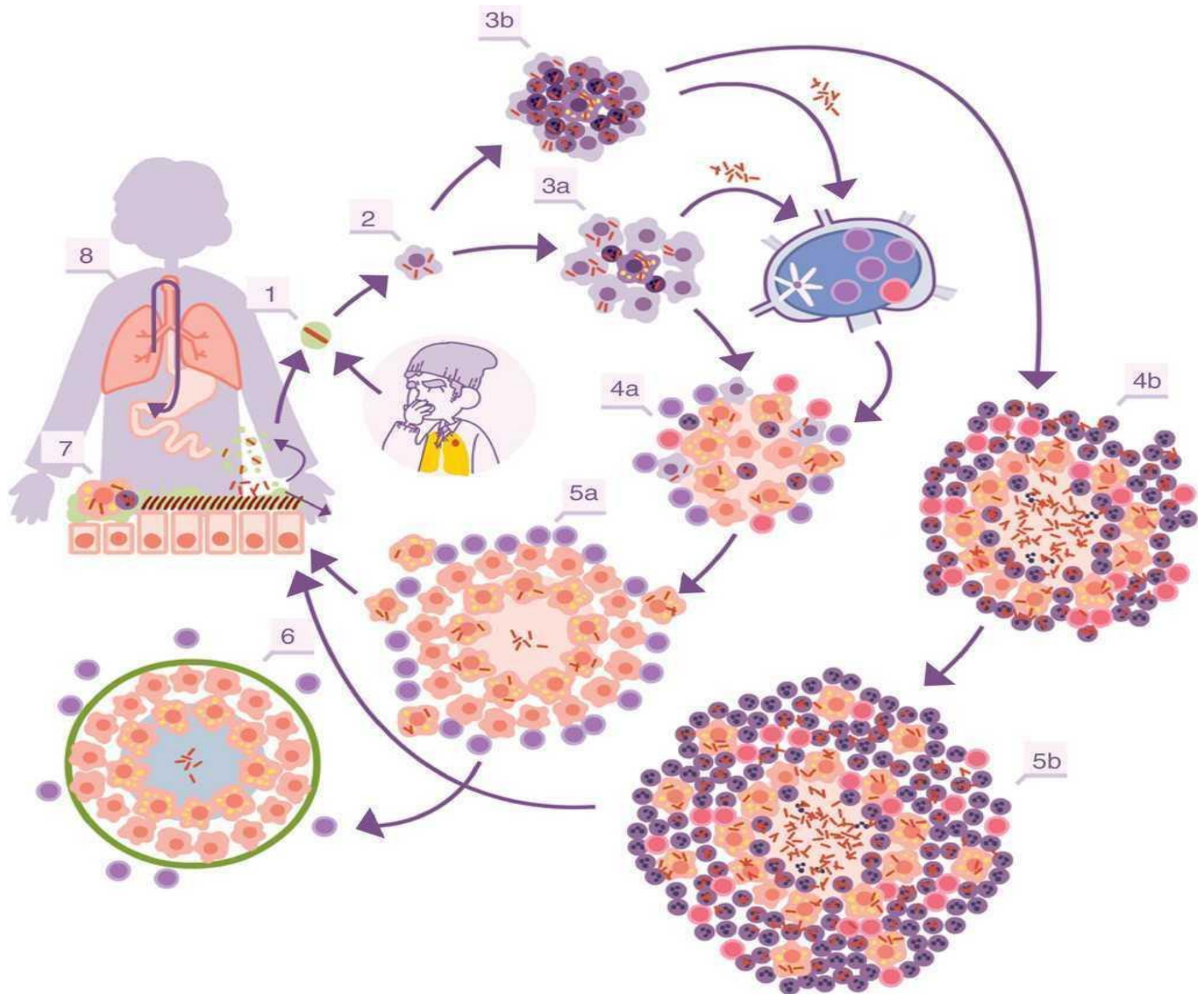
Ensayos de Receptor-Ligando

Peptide number	Sequence R(358)	Binding Activity (%)			
		A549 Cells		U937 Cells	
3527	1 MLDLIPROPLPTEIYWRRO	1	1	1	1
3528	2 LALGIAYVVYGLAVIYIAY	1	1	1	1
3529	3 FVDSAGAKPYSADKPSAY	1	1	1	1
3530	4 QSHPGSPAPQAPPAQQTET	1	1	1	1
3531	5 QXAAAAPPQGNPETPTTET	1	1	1	1
3532	6 AAYQPPFVLEODDCPDSIT	1	1	1	1
3533	7 LAVKGLNAPQYVVDQPKF	1	1	1	1
3534	8 YMVVYNIOLVCKRDVGAAY	1	1	1	1
3535	9 VLAAYVYSLDNKRLWSLDT	1	1	1	1
3536	10 APSNETLVKTFSPGEQVIT	1	1	1	1
3537	11 AVIWTGOMOSAPRCPLRPAY	1	1	1	1
3538	12 IOPOTYKLVVQLNLRSLPY	1	1	1	1
3539	13 PFI LNQPPPPFPVPAPOPY	1	1	1	1
3540	14 VFAPGPAQAPFPFPAQOQY	1	1	1	1

Síntesis péptidos



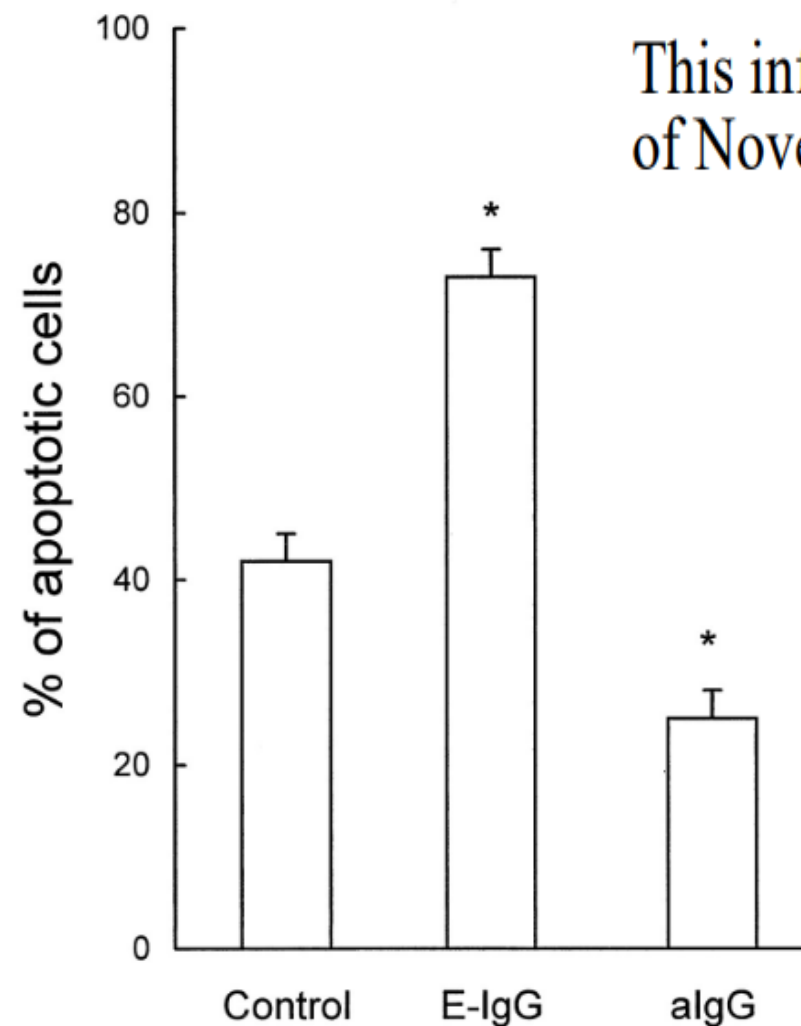
Formación del granuloma



Artículo



This information is current as of November 30, 2019.



- Eritrocitos recubiertos de Ac (E-IgG)
- IgG inactivada por calor (algG)
- ❖ Bloqueo dirigido a FcγRIIIa
- ❖ Expression of Fas and FasL

Modulation of Human Neutrophil Apoptosis by Immune Complexes

Romina Gamberale, Mirta Giordano, Analía S. Trevani, Graciela Andonegui and Jorge R. Geffner

J Immunol 1998; 161:3666-3674; ;

<http://www.jimmunol.org/content/161/7/3666>

• Complejo Ag-Ac: Incubación durante 1 hora a 37 ° C y 18 horas a 4 ° C. Después de este período, los CI se centrifugaron a 3.000 × g durante 10 minutos, y se recuperó el precipitado o el sobrenadante.

• Los agregados de IgG se prepararon calentando IgG humana durante 12 minutos a 63 ° C. Luego, la IgG humana agregada por calor se centrifugó y el precipitado se desechó.

• Los eritrocitos recubiertos con IgG se prepararon usando eritrocitos de ratón

IgG

- 10-20% Encontradas en suero
- Larga vida media
- Control y destrucción de patógenos

Las longitudes de bisagra
diferenciales y los enlaces disulfuro
influyen en las funciones efectoras
de los anticuerpos

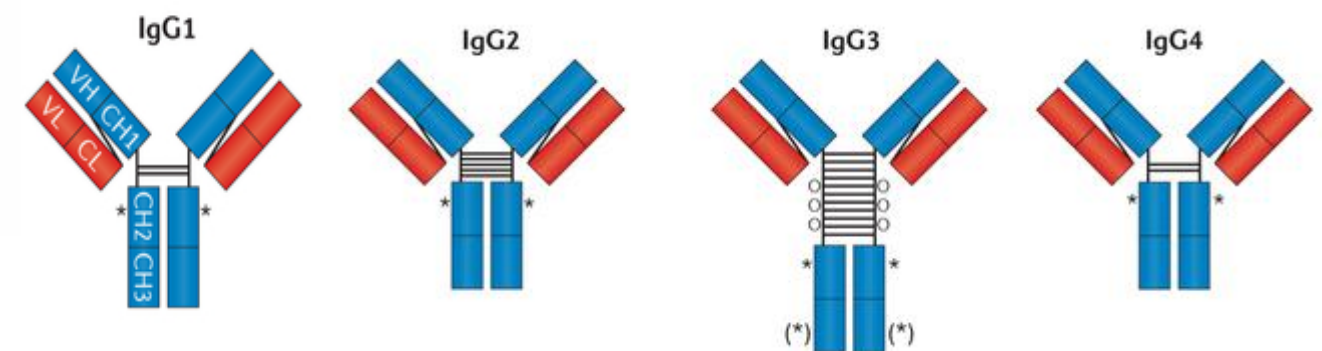
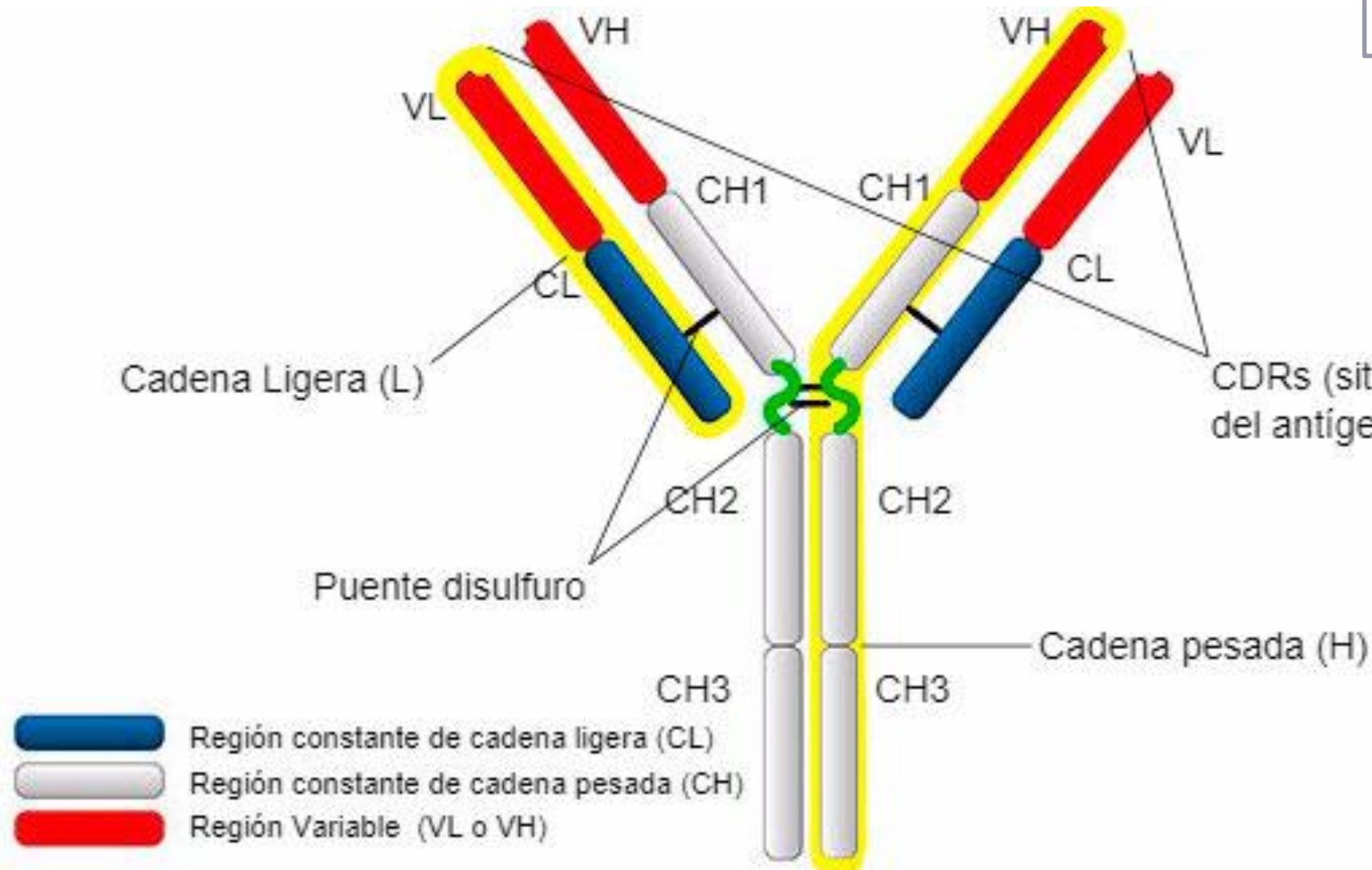
4 SEROTIPOS

IgG 1
IgG 2
IgG 3
IgG 4

(IgG 1 e IgG 3)

Las bisagras más largas y flexibles
mejoran la unión al antígeno y
complementan los receptores Fc
(FcR) y por lo tanto la función
efectora.

Citofílicas: IgG1 y 3
Neutralizantes: IgG2 e IgG4



Subclasses de IgG

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
General				
Molecular mass (kD)	146	146	170	146
Amino acids in hinge region	15	12	62 ^a	12
Inter-heavy chain disulfide bonds	2	4 ^b	11 ^a	2
Mean adult serum level (g/l)	6.98	3.8	0.51	0.56
Relative abundance (%)	60	32	4	4
Half-life (days)	21	21	7/~21 ^a	21
Placental transfer	++++	++	++/++++ ^a	+++
Antibody response to:				
Proteins	++	+/-	++	++ ^e
Polysaccharides	+	+++	+/-	+/-
Allergens	+	(-)	(-)	++
Complement activation				
C1q binding	++	+	+++	-

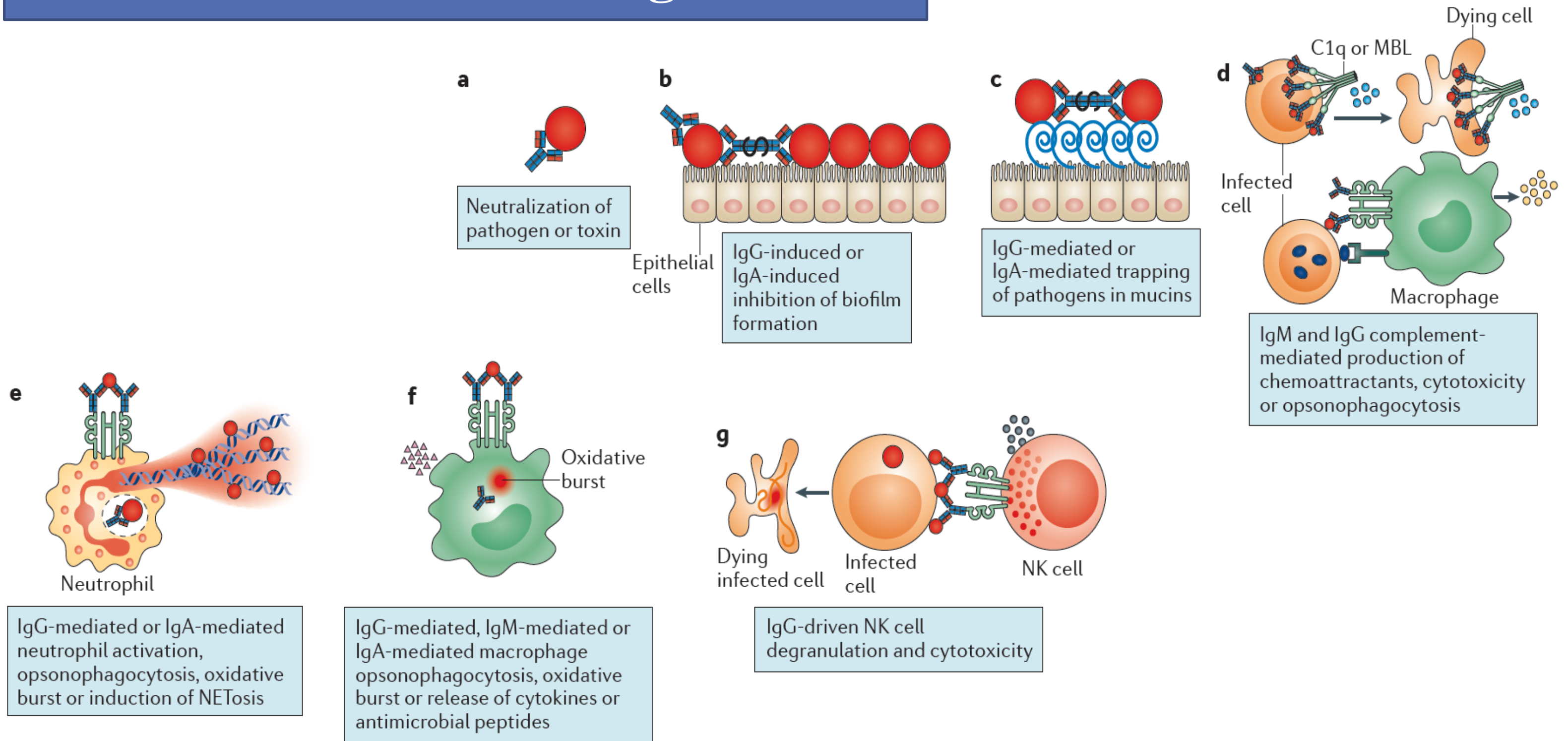
Fc receptors

FcγRI	+++ ^c	65 ^d	-	-	++++	61	++	34
FcγRIIa _{H131}	+++	5.2	++	0.45	++++	0.89	++	0.17
FcγRIIa _{R131}	+++	3.5	+	0.10	++++	0.91	++	0.21
FcγRIIb/c	+	0.12	-	0.02	++	0.17	+	0.20
FcγRIIIa _{F158}	++	1.2	-	0.03	++++	7.7	-	0.20
FcγRIIIa _{V158}	+++	2.0	+	0.07	++++	9.8	++	0.25
FcγRIIIb	+++	0.2	-	-	++++	1.1	-	-
FcRn (at pH < 6.5)	+++		+++		++/+++ ^{10a}		+++	

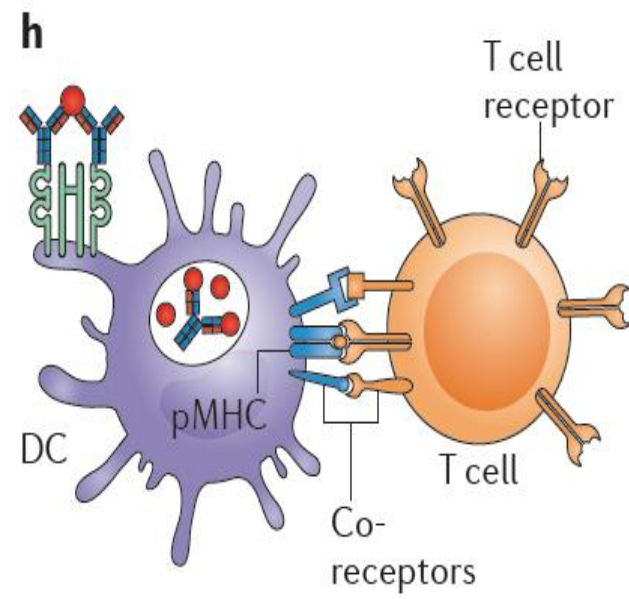
CD16b

FcR	Cell Distribution
Fc γ RI (CD64)	Macrophages, neutrophils; also eosinophils
Fc γ RIIA (CD32)	Macrophages, neutrophils; eosinophils, platelets
Fc γ RIIB (CD32)	B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, other cells
Fc γ RIIC (CD32)	Macrophages, neutrophils, NK cells
Fc γ RIIIA (CD16)	NK cells
Fc γ RIIIB (CD16)	Neutrophils
Fc ϵ RI	Mast cells, basophils, eosinophils
Fc ϵ RII (CD23)	B lymphocytes, eosinophils, Langerhans cells
Fc α R (CD89)	Neutrophils, eosinophils, monocytes

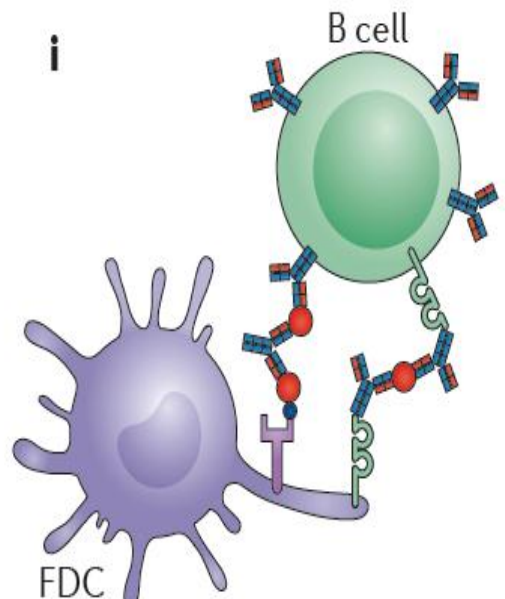
Funciones de las Inmunoglobulinas



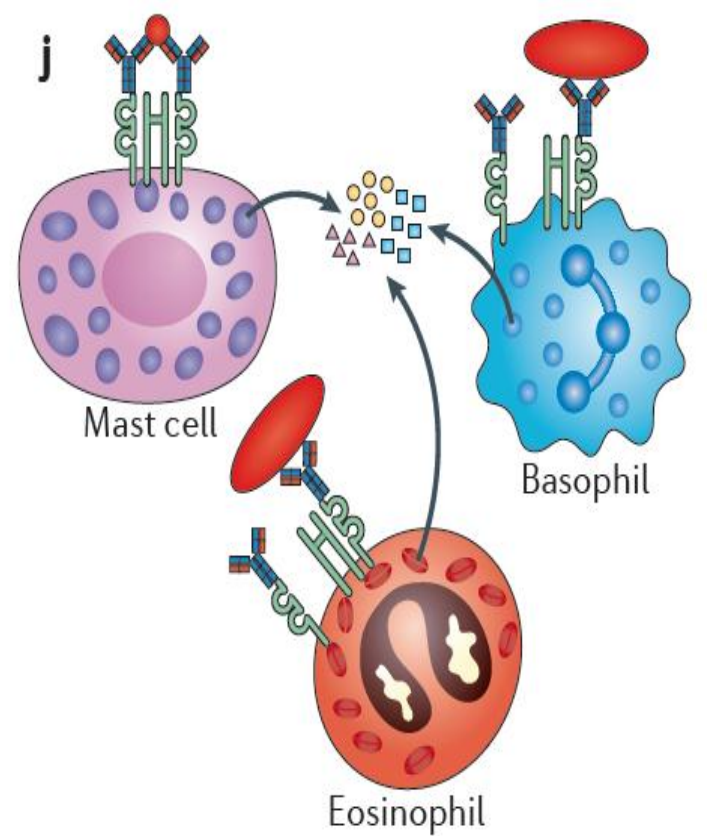
Funciones de las Inmunoglobulinas



IgG-driven, IgM-driven or IgA-driven antigen uptake, DC maturation and antigen presentation



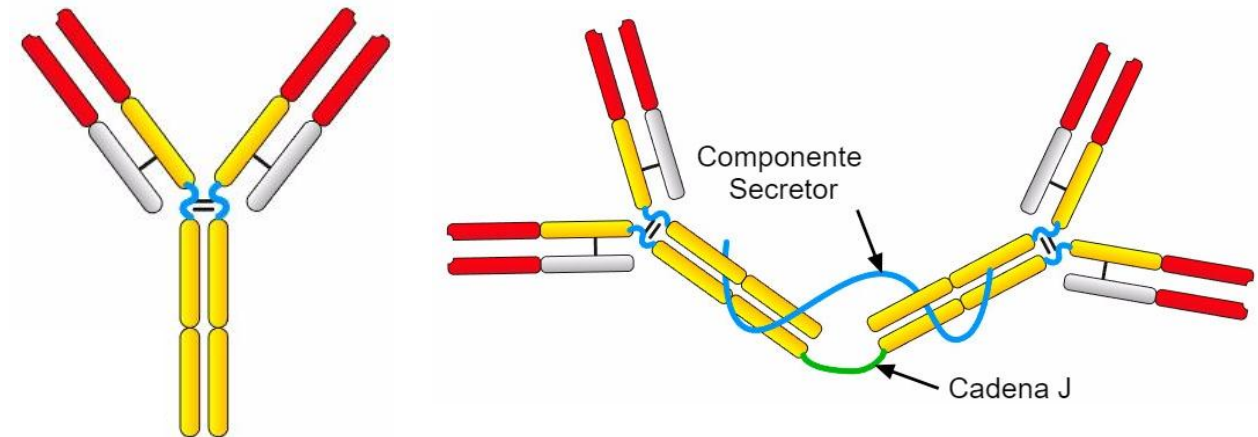
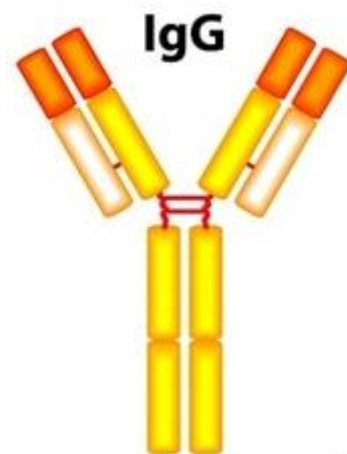
IgG-driven, IgM-driven or IgA-driven antigen capture on FDCs for presentation to B cells



IgG-mediated, IgE-mediated and IgD-mediated granulocyte degranulation and release of vasoactive mediators, chemoattractants and T_H2-type cytokines

Pathogen or toxin	Antibody	Perforin and granzymes
Fc receptors	Mucin	Vasoactive mediators
Complement receptor	Cytokines or antimicrobial peptides	Chemoattractants
		Complement

IgG e IgA



- Monómero
- 10-20% Encontradas en suero
- Larga vida media
- 4 subclases (IgG 1, IgG 2, IgG 3 e IgG 4)
- Induce apoptosis , promueve la fagocitosis neutralizantes (Bibliografía)
- traspasa placenta
- IgG3 tiene la mayor potencia funcional, seguida de IgG1. IgG2 e IgG4 tienen la potencia menos funcional de las subclases
- IgG3, tiene la vida media más corta entre todas las subclases.

- Monómero (suero) Dímero (mucosas)
- 2 Subtipos: IgA 1(Dímero) IgA 2 (Monómero)
- Induce NETs, neutralizantes (Bibliografía)
- No traspasa placenta
- la IgA1 tiene una secuencia única de 16 aminoácidos en la bisagra que la hace más susceptible a la escisión proteolítica por parte de los patógenos
- IgA2 tiene una bisagra más corta que confiere más resistencia a la lisis.

Ensayo de unión



Radiomarcaje

Yodo 125

Se incuba durante 2h a 37°C y 4°C con las células
U937 - A549



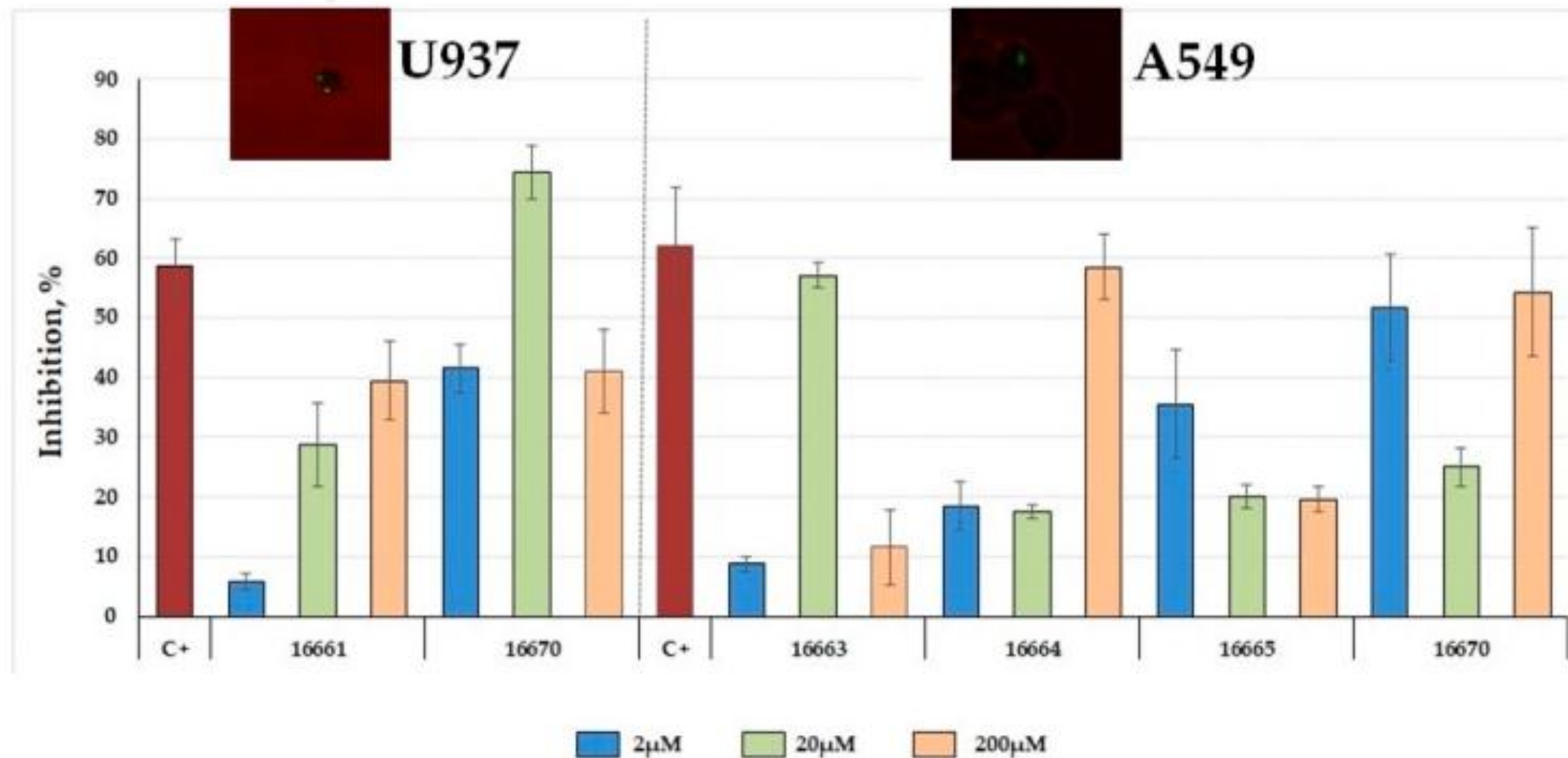
REACTIVIDAD

Contador gamma

Ensayo de inhibición

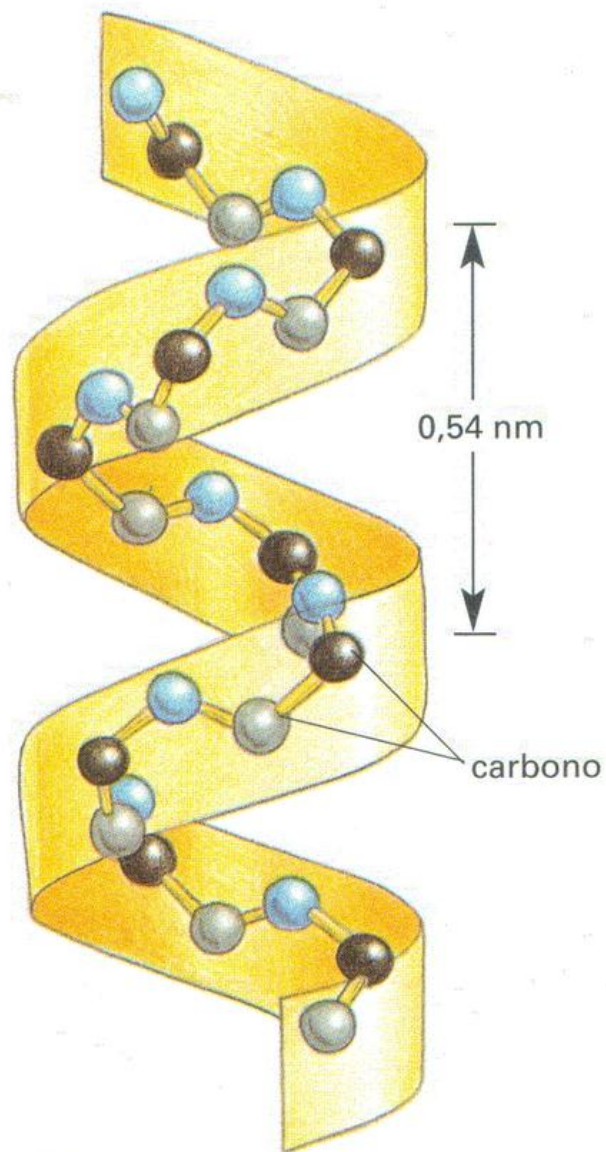
Control positivo: Lisado de *Mtb* H37Rv

Control negativo: Citocalasina



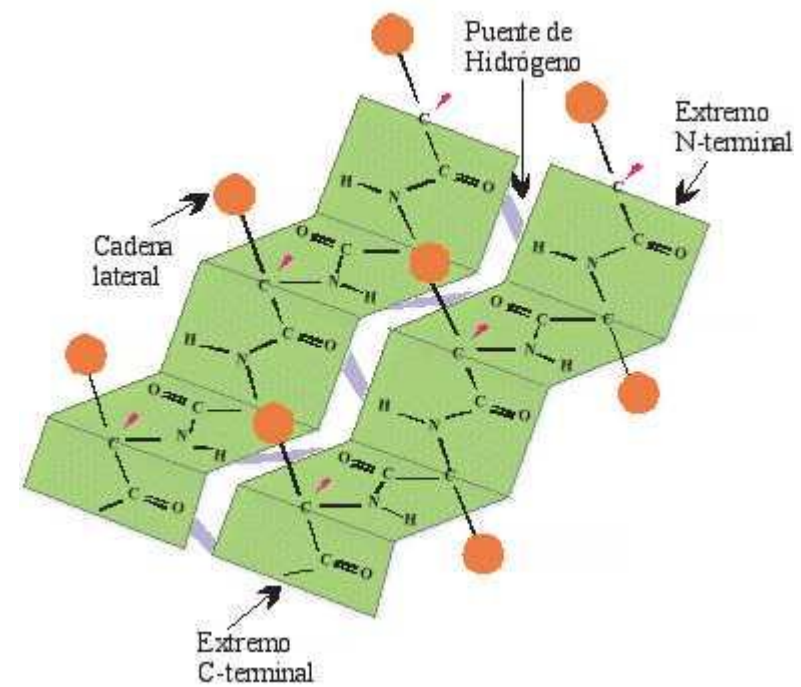
- Cultivo células diana
- Incubación con péptido durante 2h
- Infección con *Mtb* H37Rv durante 1 noche a 37°C
- Las células se desprenden de la monocapa y se elimina la micobacteria no fagocitada por centrifugación
- Las células se fijan con paraformaldehído y glutaraldehído
- Lavados
- Citometría de flujo

Estructuras secundarias



Hélice
alfa

<http://bioquimicarps.blogspot.com/2015/02/estructura-de-las-proteinas.html>



<http://www.biorom.uma.es/contenido/proteinas3d/ema/estruc203a.html>

Hojas plegada

Poliprolina



<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/cs/c0cs00152j/unauth#!divAbstract>

Enfermedad granulomatosa crónica

- Mutación que causa deficiencia en el complejo enzimático NADPH oxidasa conduce a una reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno (utilizadas por los fagocitos para eliminar bacterias y hongos)
- Enfermedad hereditaria ligada al sexo normalmente diagnosticada antes de los 5 años
- Infecciones recurrentes por levaduras y hongos
- Profilaxis: uso continuo de antibióticos orales

Apoptosis anormal

Retraso en las manifestaciones morfológicas de la apoptosis
Disminución de la exposición a la fosfatidil serina (PS)
Fragmentación del ADN

- Más del 50% de los pacientes cursa con:
Diarrea
dolor abdominal
falta de crecimiento.

- Son comunes:
Neumonía
Abscesos
Celulitis
Adenitis
Osteomielitis

DIAGNOSTICO

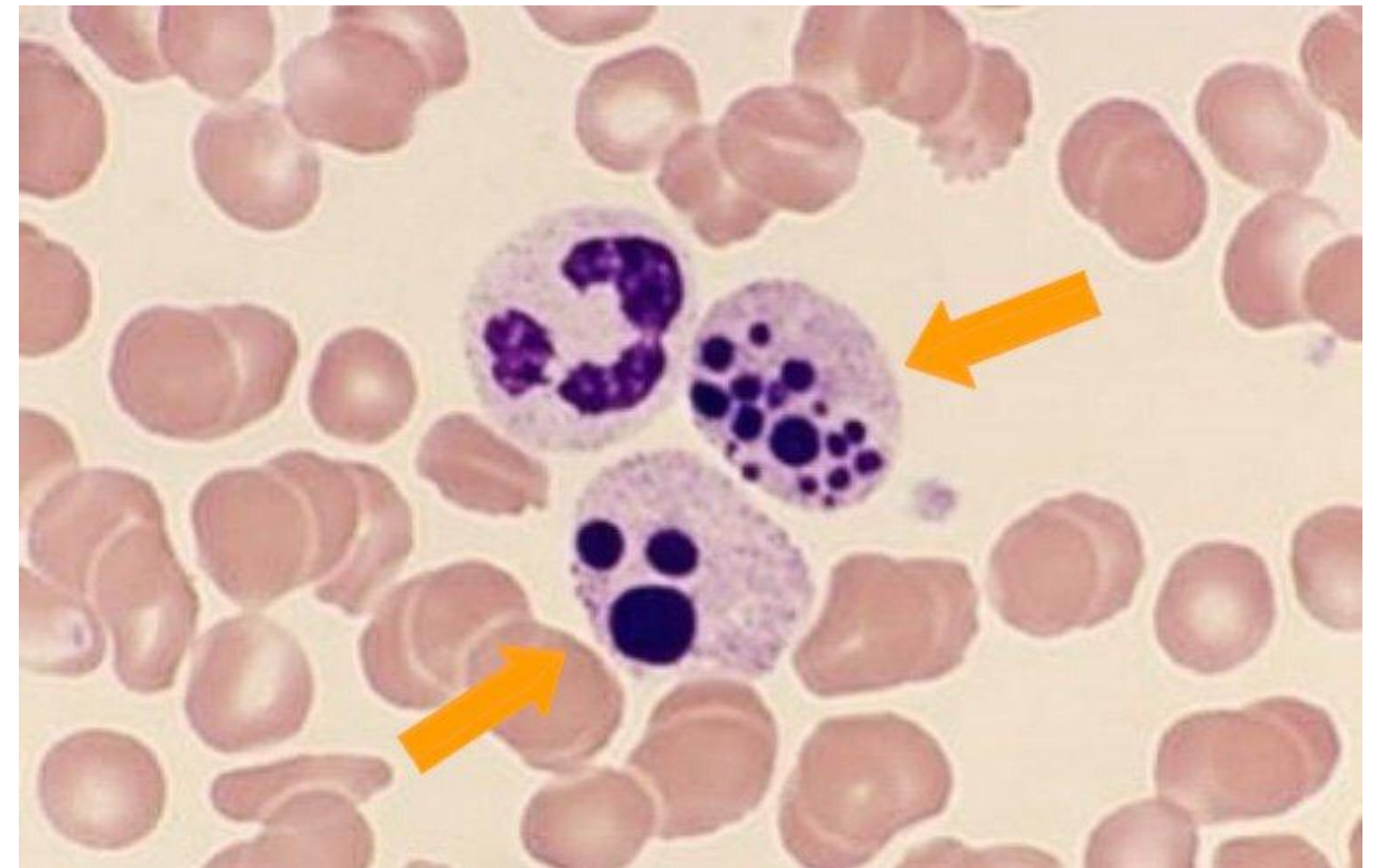
Ensayos que miden la producción de superóxido por el complejo NADPH oxidasa de los neutrófilos, que en estos pacientes está ausente o muy reducida.

El análisis por Western Blot confirmar la ausencia de la subunidad específica del complejo de NADPH oxidasa involucrada.

La prueba genética .

Neutrófilos apoptóticos en enfermedad

- Leucemia mieloide aguda
- Síndromes dismielopoyéticos
- Anemia perniciosa (deficiencia de vitamina B12)
- Lupus



https://pbs.twimg.com/media/Df_5Kt7XcAAOsr-.jpg

Nivel de bioseguridad 3



PRACTICAS

- ✓ Microorganismos asociados con enfermedades humanas, para las cuales podrían estar disponibles medidas preventivas y/o terapéuticas
- ✓ El personal deberá utilizar ropa de protección de material desechable u overoles
- ✓ Los residuos se descontaminan antes de su eliminación (uso del autoclave)
- ✓ Cabina de flujo laminar (Filtro HEPA)

FILTRO HEPA

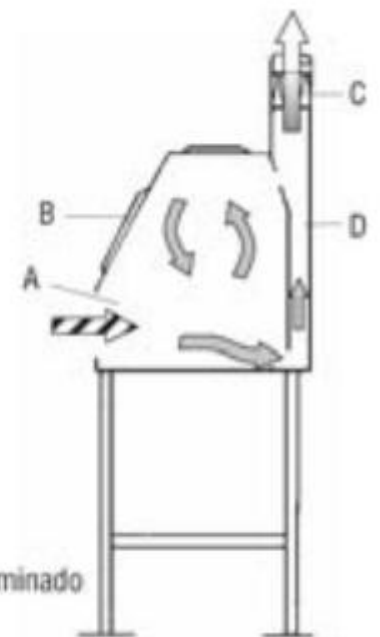
Puede capturar el 99.97% de partículas

Malla de fibras dispuestas al azar. Las fibras típicamente están compuestas por fibra de vidrio



INSTALACIONES DEL LABORATORIO

- ✓ El laboratorio debe estar separado de las zonas del edificio por las que se puede circular sin restricciones
- ✓ Las ventanas deben estar cerradas herméticamente
- ✓ Acceso restringido o limitado al laboratorio
- ✓ Paredes, pisos y techo, deben ser resistentes al agua, de manera que puedan ser limpiadas y descontaminadas fácilmente



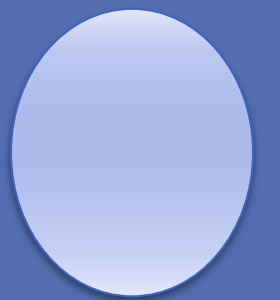
- ▨ aire de la sala
- aire potencialmente contaminado
- aire filtrado por HEPA

Cuadro I. Listado de microorganismos patógenos manejados en un BSL-3 de acuerdo al CDC.⁵

Bacterias	<ul style="list-style-type: none"> — <i>Bartonella</i> — <i>Brucella</i> incluyendo <i>B. abortus</i>, <i>B. canis</i>, <i>B. suis</i> — <i>Burkholderia (Pseudomonas) mallei</i>, <i>B. pseudomallei</i> — <i>Coxiella burnetii</i> — <i>Francisella tularensis</i> — <i>Mycobacterium bovis</i>, <i>M. tuberculosis</i> — <i>Pasteurella multocida</i> — <i>Rickettsia akari</i>, <i>R. australis</i>, <i>R. canada</i>, <i>R. conorii</i>, <i>R. prowazekii</i>, <i>R. rickettsii</i>, <i>R. siberica</i>, <i>R. tsutsugamushi</i>, <i>R. typhi (R. mooseri)</i> — <i>Yersinia pestis</i> 	
Hongos	<ul style="list-style-type: none"> — <i>Coccidioides immitis</i> — <i>Histoplasma capsulatum</i>, <i>H. capsulatum var. duboisii</i> 	
Parásitos	Ninguno	
Virus	<ul style="list-style-type: none"> Alphaviruses (Togaviruses) - Grupo A Arboviruses <ul style="list-style-type: none"> — Virus de Semliki Forest — Virus de la encefalitis de San Luis — Virus de la encefalitis equina venezolana Arenaviruses <ul style="list-style-type: none"> — Flexal — Virus coriomeningitis linfocítica Bunyaviruses <ul style="list-style-type: none"> — Hantaviruses — Virus de la fiebre de Rift Valley Coronavirus (SARS-CoV) 	<ul style="list-style-type: none"> Flaviviruses (Togaviruses) – Arboviruses Grupo B <ul style="list-style-type: none"> — Virus de la encefalitis japonesa — Virus de la fiebre amarilla Poxviruses <ul style="list-style-type: none"> — Virus <i>monkeypox</i> Retroviruses <ul style="list-style-type: none"> — Virus de inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2 — Virus linfotrópico de células T humanas (HTLV) tipos 1 y 2 — Virus inmunodeficiencia del simio (SIV) Rhabdoviruses <ul style="list-style-type: none"> Virus estomatitis vesicular

FUNDAMENTOS

- ❖ Apoptosis
- ❖ Otra forma de evaluar Apoptosis
- ❖ BepiPred 2.0
- ❖ Prueba de QuantiFERON
- ❖ Pruebas de liberación de INF- γ
- ❖ QuantiFERON y Tuberculina
- ❖ Epitope B lineal
- ❖ Ficoll-Histopaque
- ❖ Wright y Giemsa
- ❖ Citometría neutrofilos
- ❖ Citometría de Flujo
- ❖ Citometria de flujo separación PMN
- ❖ Evaluar NETs
- ❖ Evaluar Necrosis
- ❖ Como *Mtb* causa necrosis
- ❖ Como *Mtb* causa NETs
- ❖ Anexina V



APOPTOSIS

Extrinsic pathway (death-receptor dependent)

TNF- α /FasL



Activation of
caspase-8

Intrinsic pathway (mitochondrial, stress-induced)

?



Mitochondria

Anti-apoptotic
Bcl-2 homologues

Pro-apoptotic
Bcl-2 homologues

Release of pro-apoptotic proteins

Cytochrome *c*

Smac/Diablo

Activation of
caspase-9

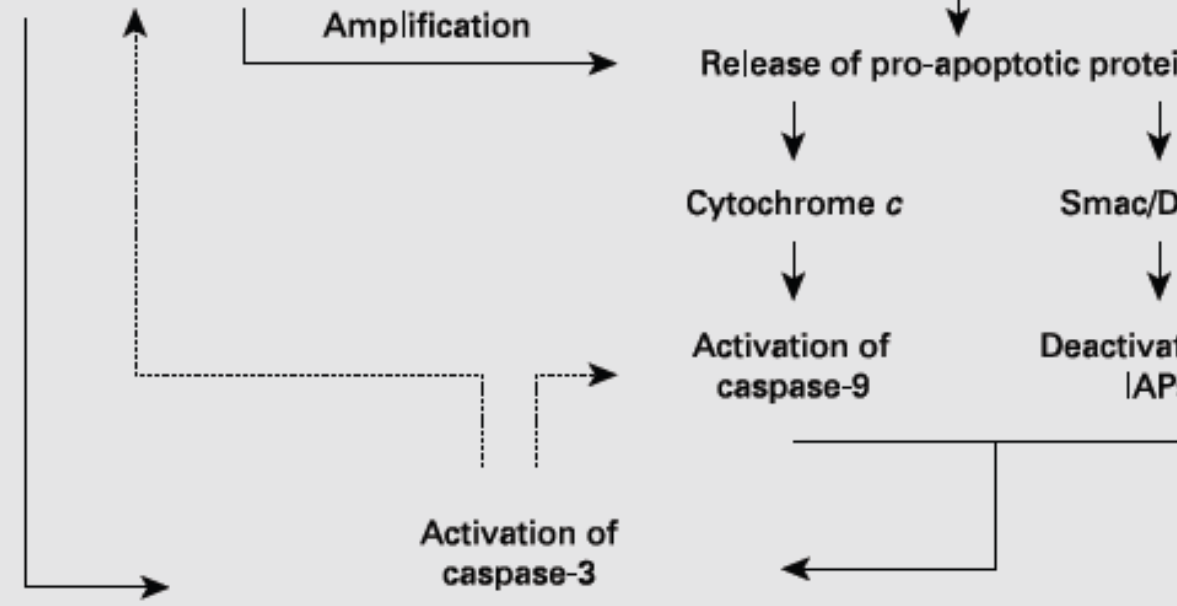
Deactivation of
IAPs

Activation of
caspase-3

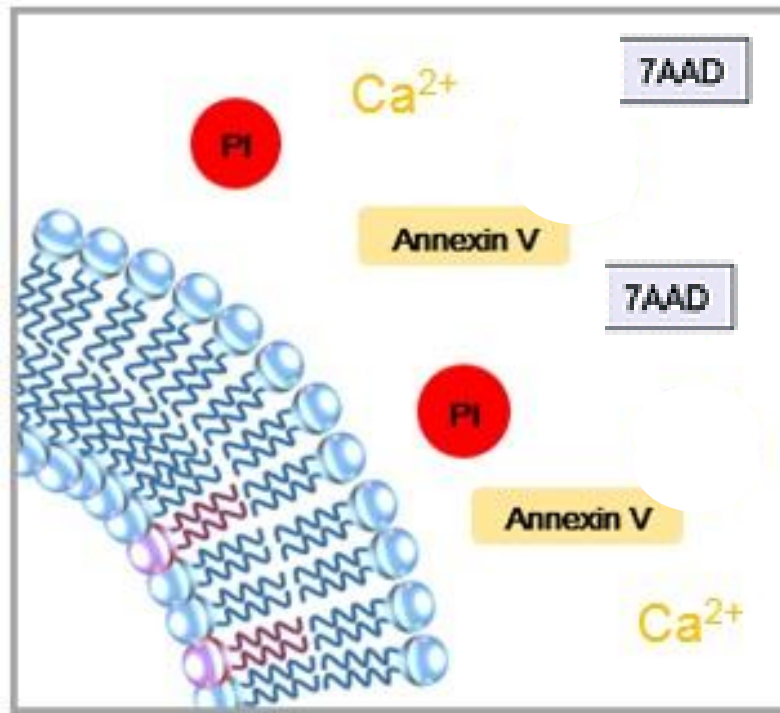
Apoptosis

Amplification

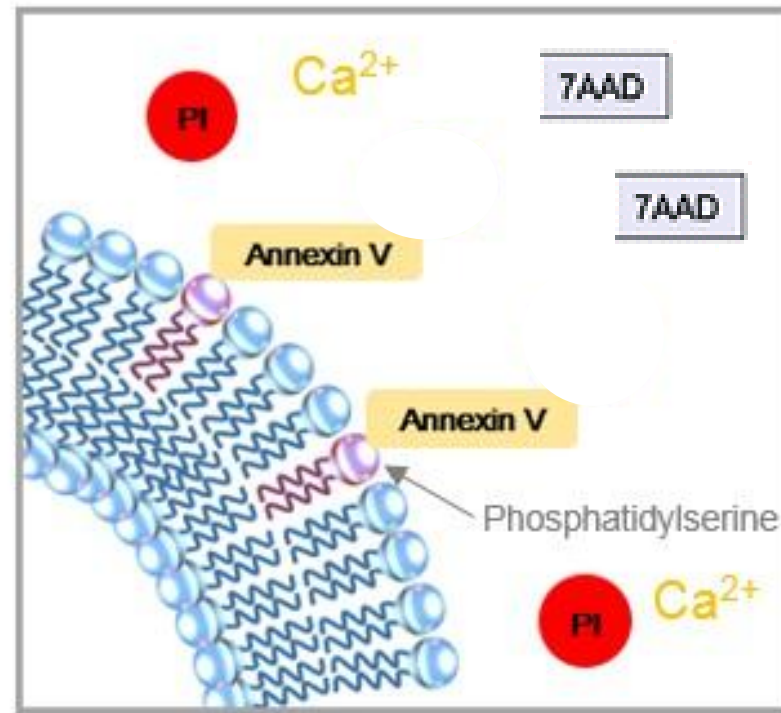
REGULADA
ROS derivadas de
oxidasa
NADPH y proteasas
granulares



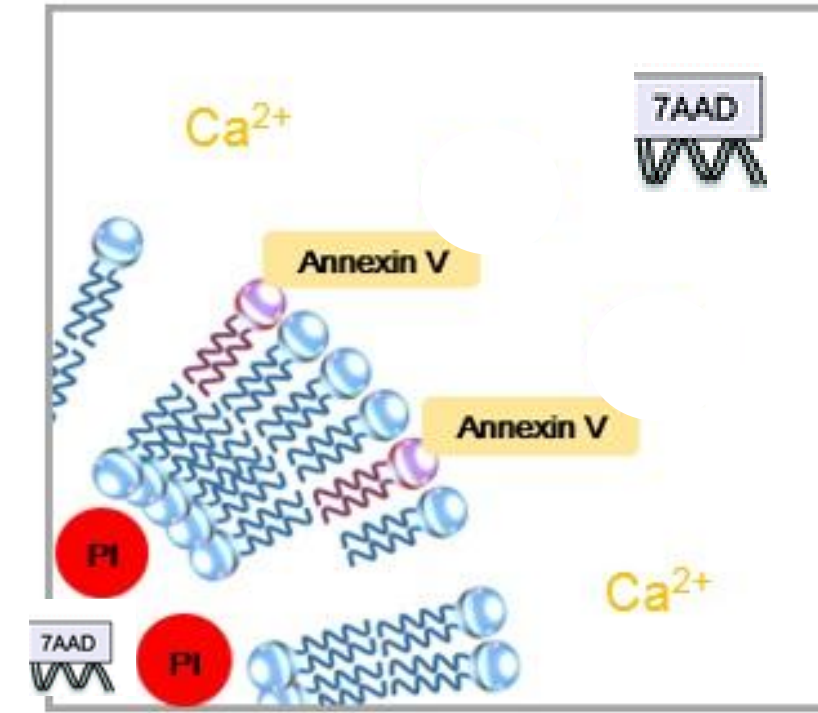
OTRA FORMAS DE EVALUAR LA APOPTOSIS



Normal Cell

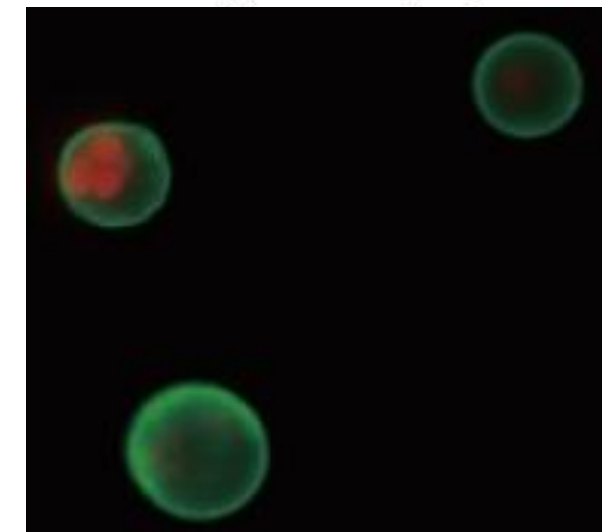


Early stages of apoptosis

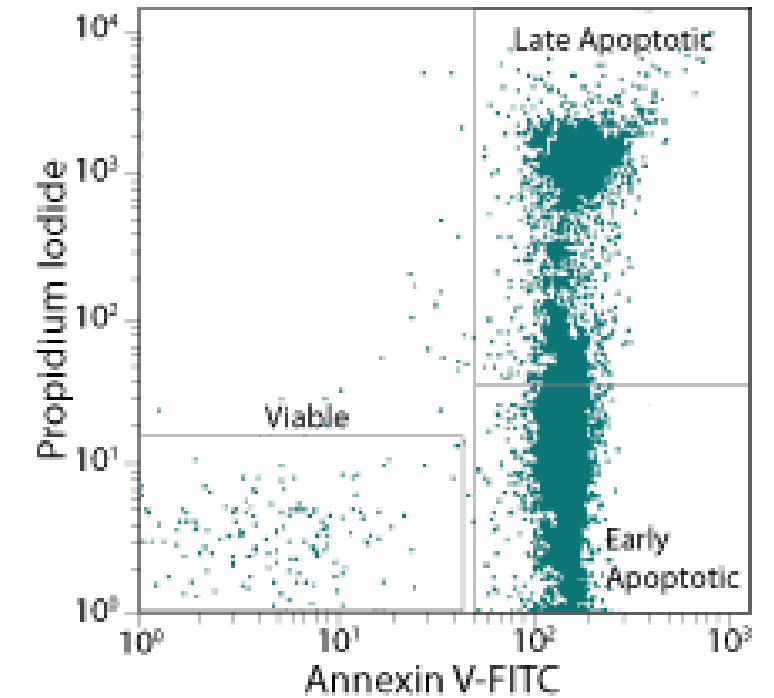
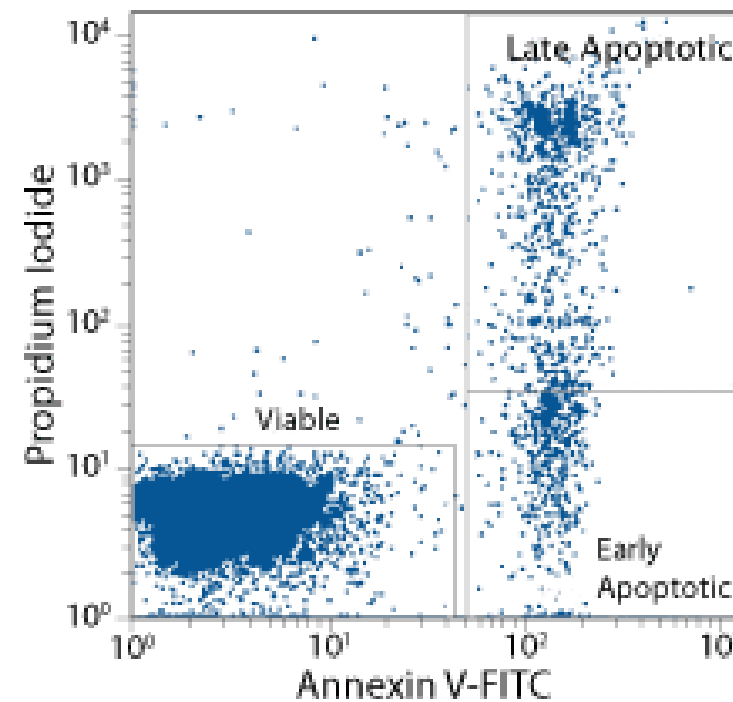
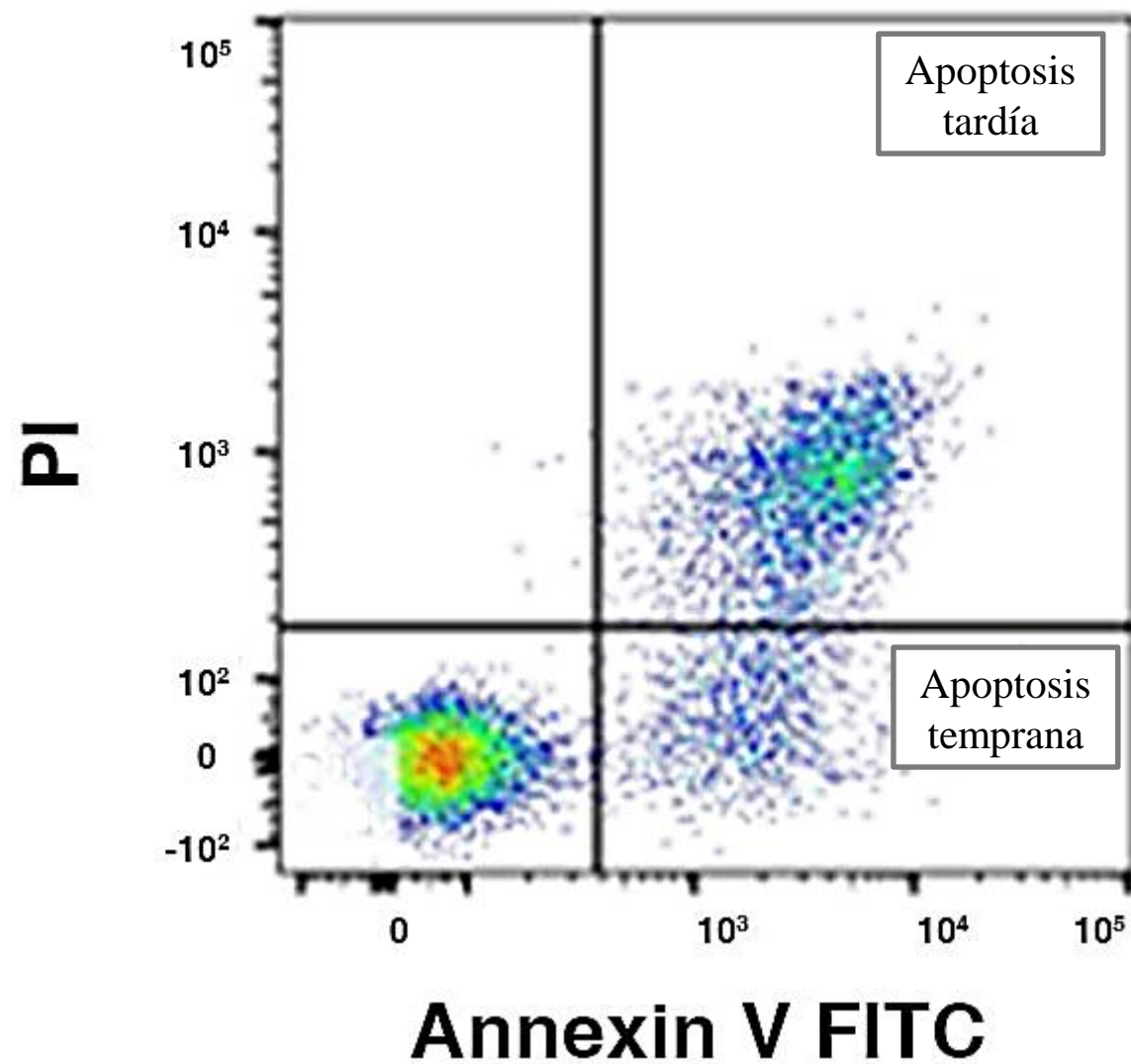


Late stages of apoptosis

Caspasas: 8 y 3



OTRA FORMAS DE EVALUAR LA APOPTOSIS



BepiPred 2.0

Umbral de 0.5 :
58% Sensibilidad
57% Especificidad

BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor

Predict Instructions/Help Datasets Abstract/Cite

Submit data

Paste or upload protein sequence(s) as fasta format to predict potential B-cell epitopes. Prediction can take a few minutes per sequence.

At most 50 sequences and 300,000 amino acids per submission; each sequence not less than 10 and not more than 6000 amino acids.

Enter protein sequence(s) in fasta format...

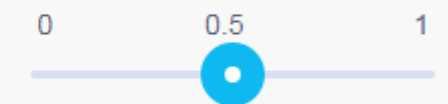
Sequence Markup Types

- > **Epitopes:** Positions above epitope threshold
- > **Predictions:** The protein sequence displayed with orange gradient, illustrating BepiPred-2.0 predictions

Gradients



Epitope Threshold ?



Name	Sequence Markup
Sequence	Epitopes :EEEEEEEEEE..... Predictions: LGLPSAGATVPLEAVPAFFRY 1-----10-----20

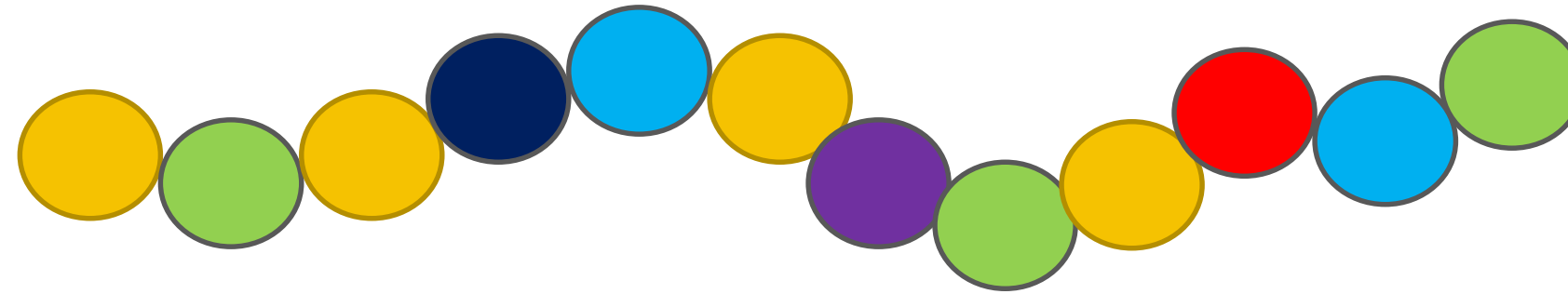
Algoritmo de Bosque aleatorio entrenado
secuencias proteicas epítopes y no
epítopes determinados a partir de
estructuras cristalinas

Cada residuo se codifica utilizando:

Volumen calculado
Hidrofobicidad
Polaridad
Accesibilidad relativa a la superficie

Predicciones mayores
que un umbral
definido (E)

Epítotope B lineal

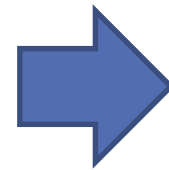


- ✓ Secuencia lineal (a.a continuos cortos) de estructura primaria
- ✓ Longitud: 5 – 20 residuos de a.a
- ✓ Solubles (Hidrofílicos)
- ✓ Enriquecidos con a.a polares , cargados y empobrecido en a.a hidrófobos
- ✓ Debe tener una forma complementaria con el anticuerpo. (interacciones débiles)
- ✓ Accesibilidad a la superficie de cada residuo
- ✓ Paratopo: reconoce de 5 a 7 a.a

PRUEBA DE QuantiFERON

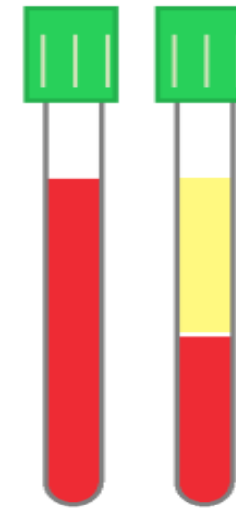
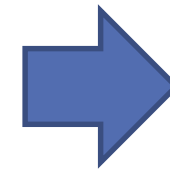


Se recolecta sangre periférica

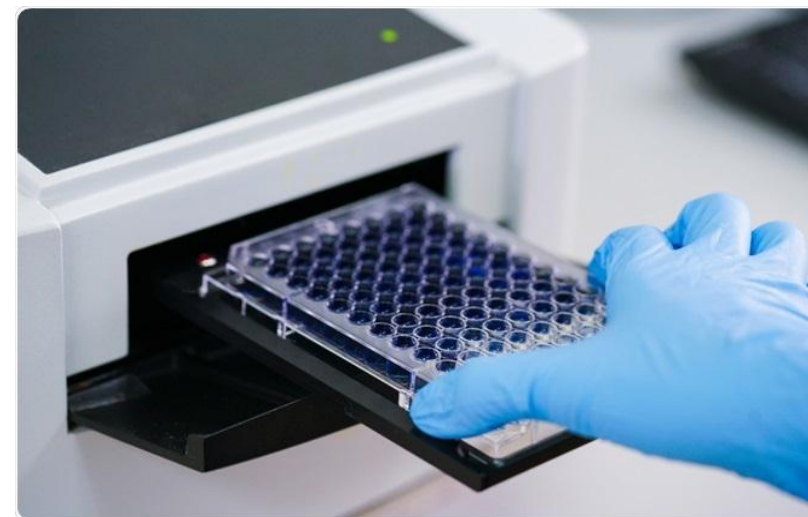
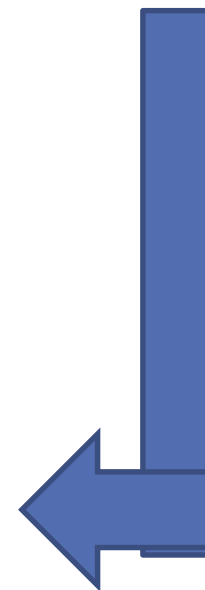


ESAT-6
CFP-10
TB7.7

37°C durante 16 a 24 h



Se centrifuga durante
15m a 2000 o 3000g



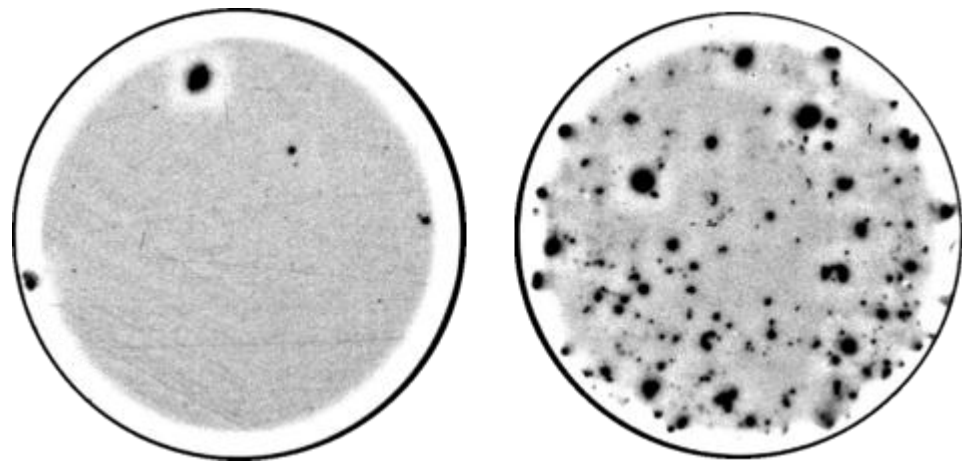
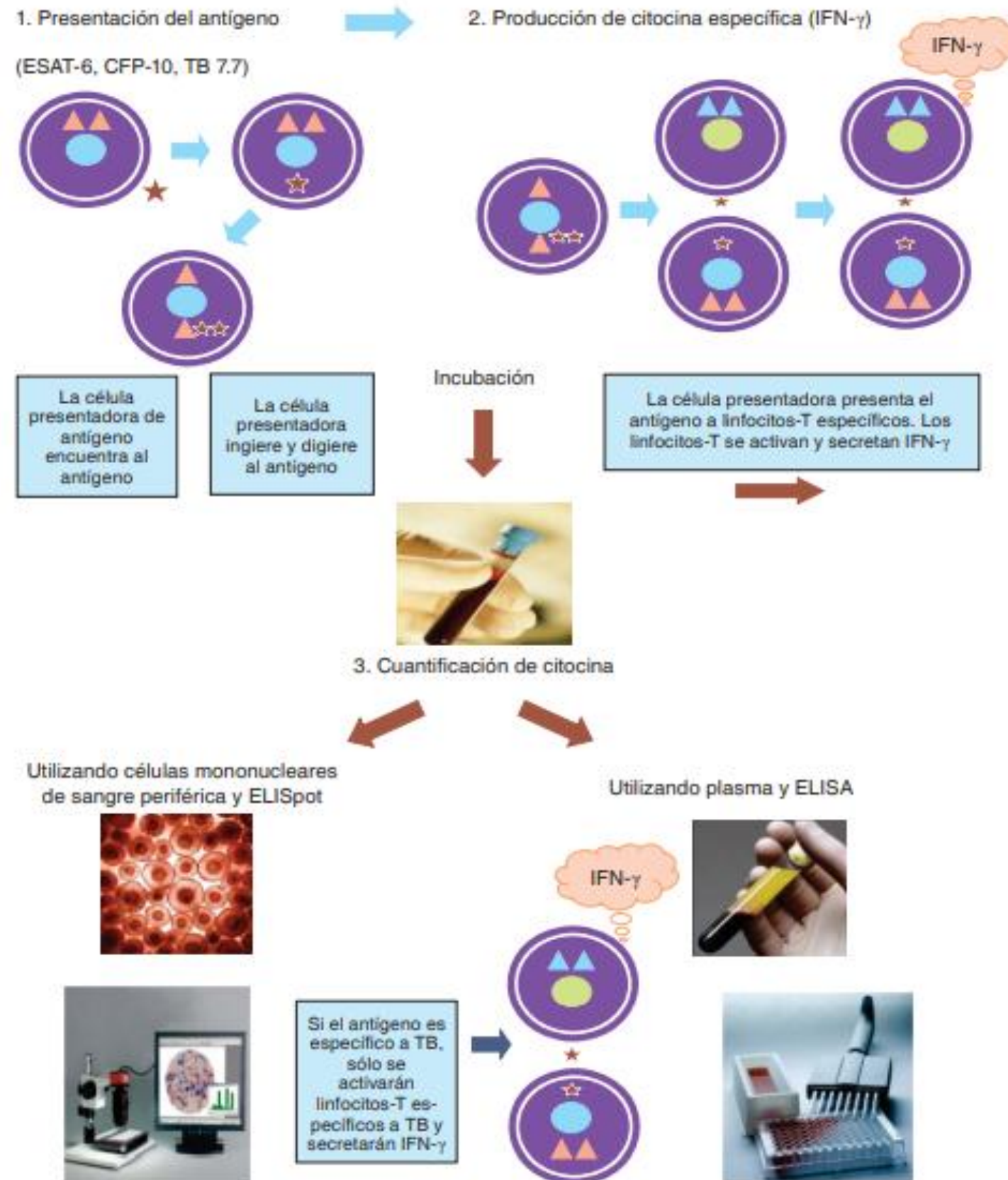
QuantiFERON – Tuberculina

PRUEBA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	FALSOS POSITIVOS	FALSOS NEGATIVOS
<p>TUBERCULINA</p> <p>Derivado proteico purificado</p>	<p>Variable</p> <p>69% -77%</p>	<p>Variable</p> <p>59% - 90%</p>	<p>Micobacterias ambientales</p> <p>Vacunación BCG</p> <p>Método incorrecto de administración</p>	<p>Anergia Cutánea</p> <p>Infección reciente</p> <p>Infección TB muy antigua</p> <p>Infección < 6 meses</p> <p>Vacunación con virus vivos</p> <p>Enfermedad viral</p> <p>Método incorrecto de administración</p>
<p>QuantiFERON</p> <p>ESAT-6</p> <p>CFP-10</p> <p>TB7.7</p>	<p>95%</p>	<p>95%</p>	<p>Lectura de incubación</p>	<p>Incubación</p> <p>Lectura de incubación muy corta</p>

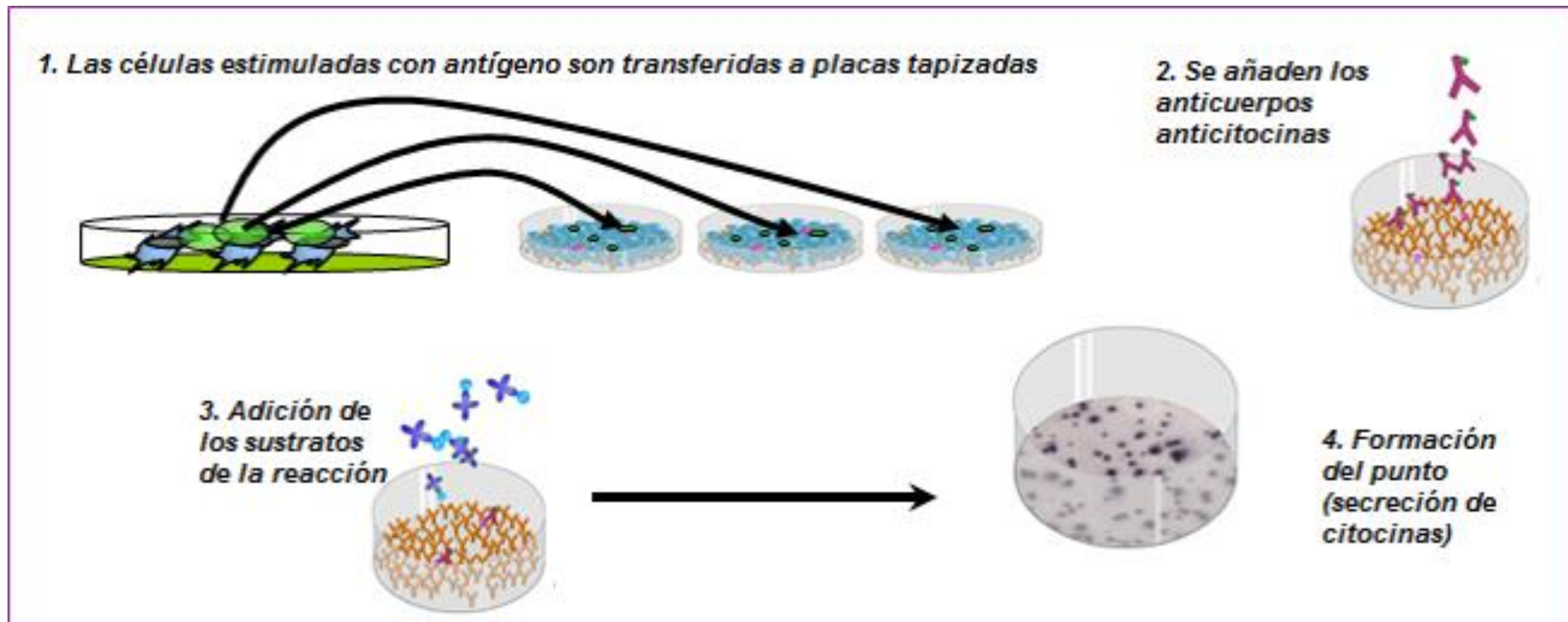
Tabla 4. Especificidad de especie de ESAT-6 y CFP-10 en las micobacterias.

Complejo micobacterium complex	Antígenos		Micobacterias ambientales	Antígenos	
	ESAT-6	CFP-10		ESAT-6	CFP-10
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	<i>M. abscessus</i>	-	-
<i>M. africanum</i>	+	+	<i>M. avium</i>	-	-
<i>M. bovis</i>	+	+	<i>M. branderi</i>	-	-
Cepas contenidas en vacuna			<i>M. celatum</i>	-	-
gothenburg	-	-	<i>M. chelonae</i>	-	-
moreau	-	-	<i>M. fortuitum</i>	-	-
tice	-	-	<i>M. goodii</i>	-	-
tokyo	-	-	<i>M. intracellulare</i>	-	-
danish	-	-	<i>M. kansasii</i>	+	+
glaxo	-	-	<i>M. malmoense</i>	-	-
montreal	-	-	<i>M. neoaurum</i>	-	-
pasteur	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	-	-
	-	-	<i>M. smegmatis</i>	-	-
			<i>M. szulgai</i>	+	+
			<i>M. terrae</i>	-	-
			<i>M. xenopi</i>	-	-

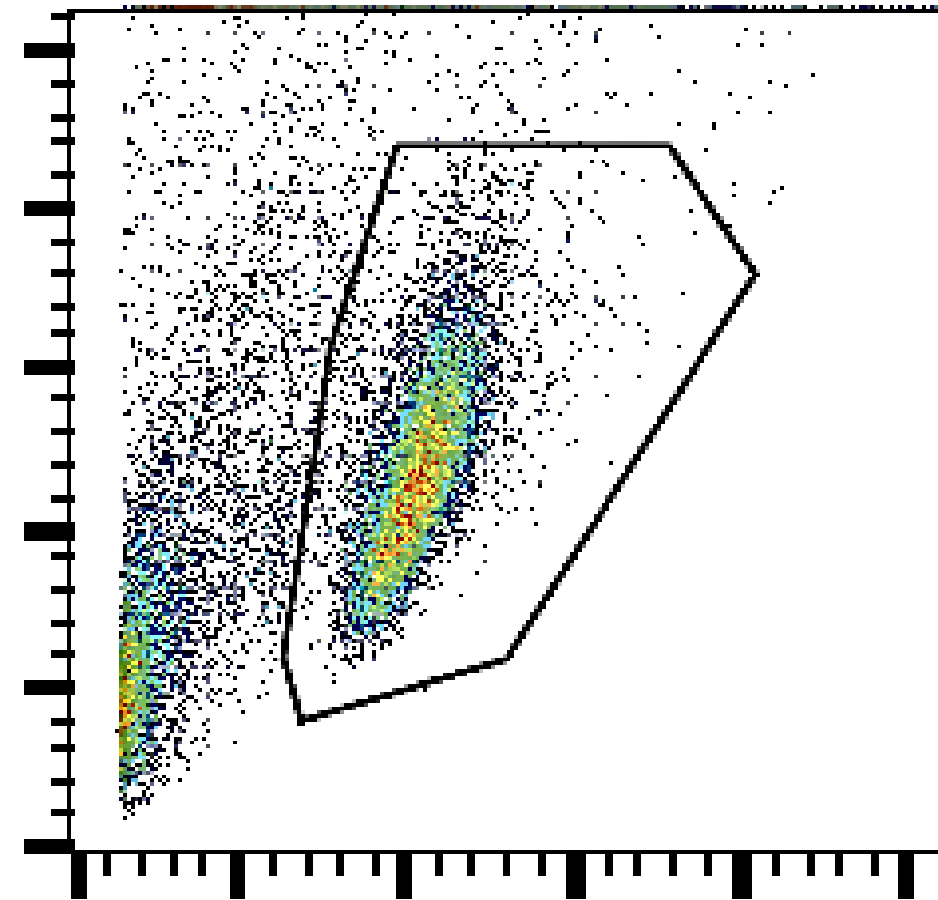
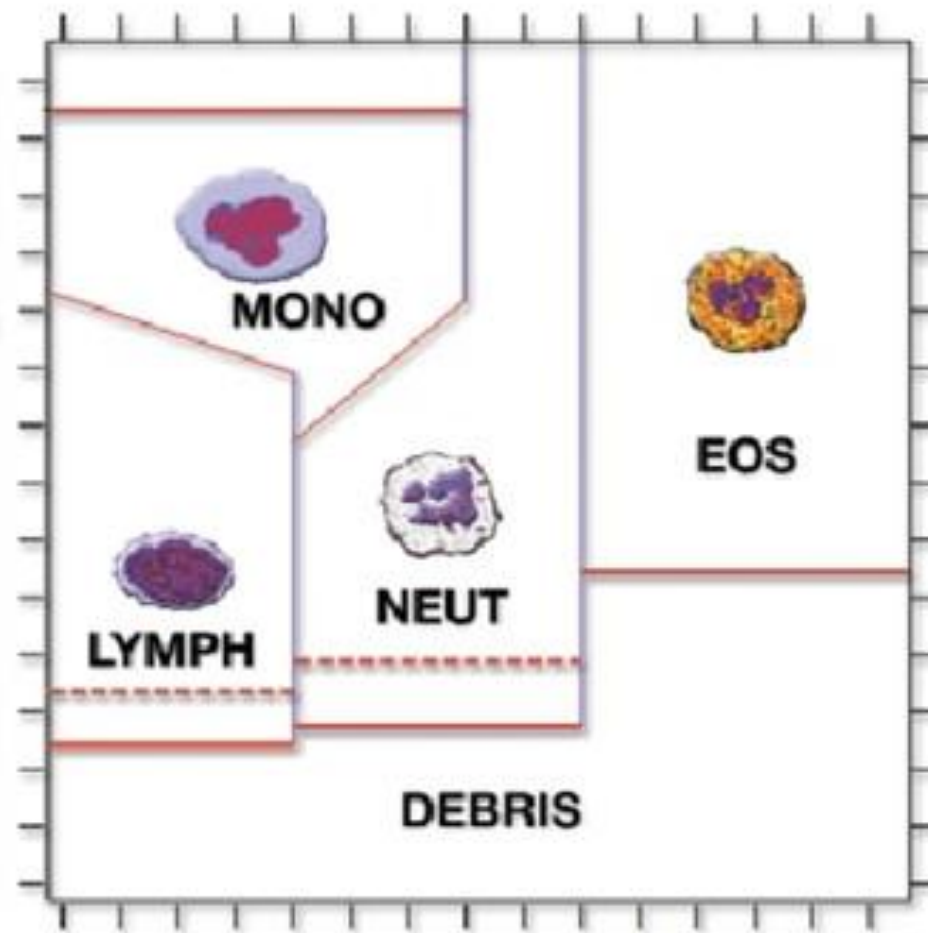
Pruebas de liberación de IFN- γ



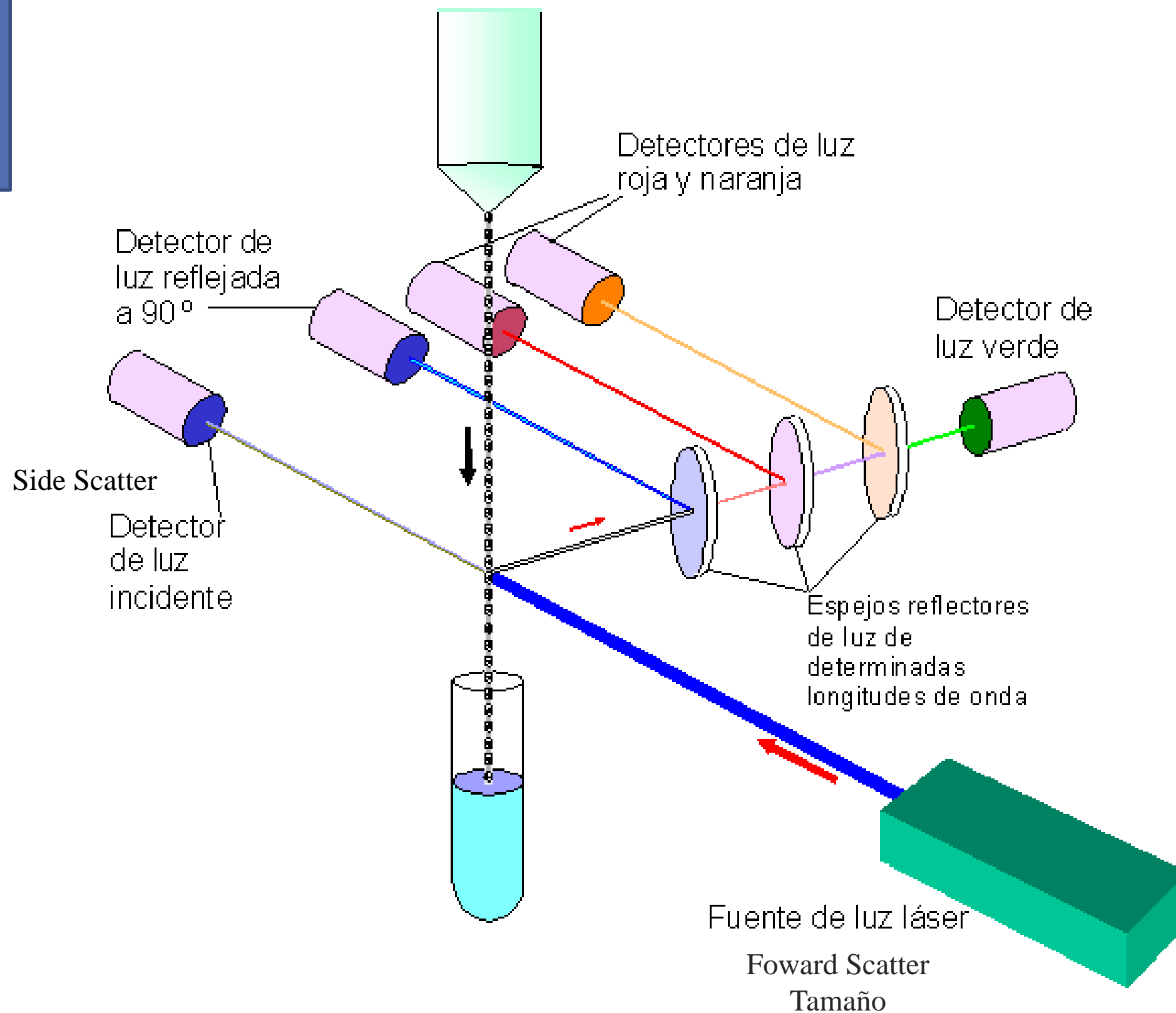
ELISPOT



Citometría neutrófilos



Citometría de flujo



Citometría de flujo

Aislamiento de neutrófilos

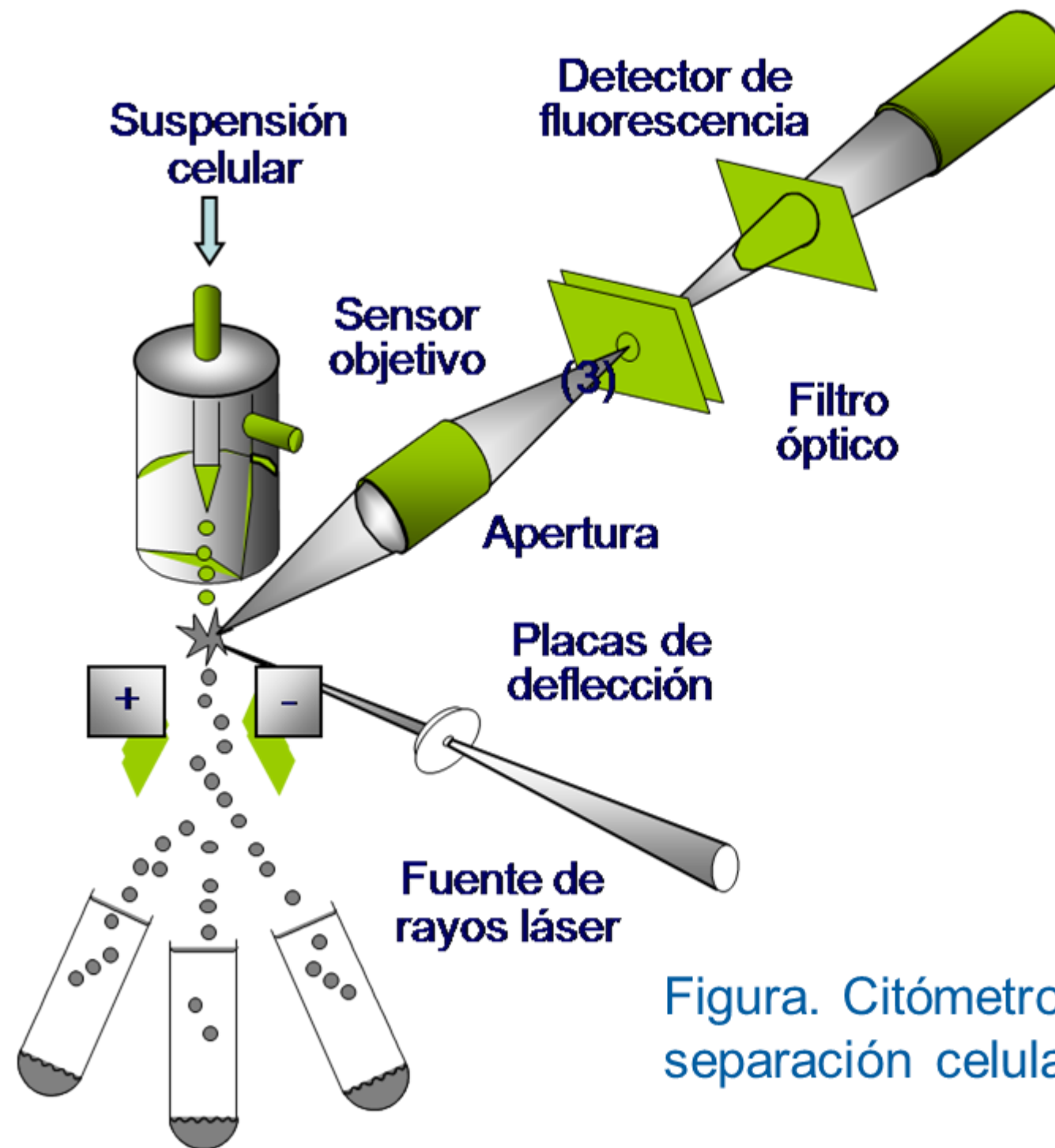


Figura. Citómetro de flujo y separación celular

Cell Host & Microbe

M. tuberculosis-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages

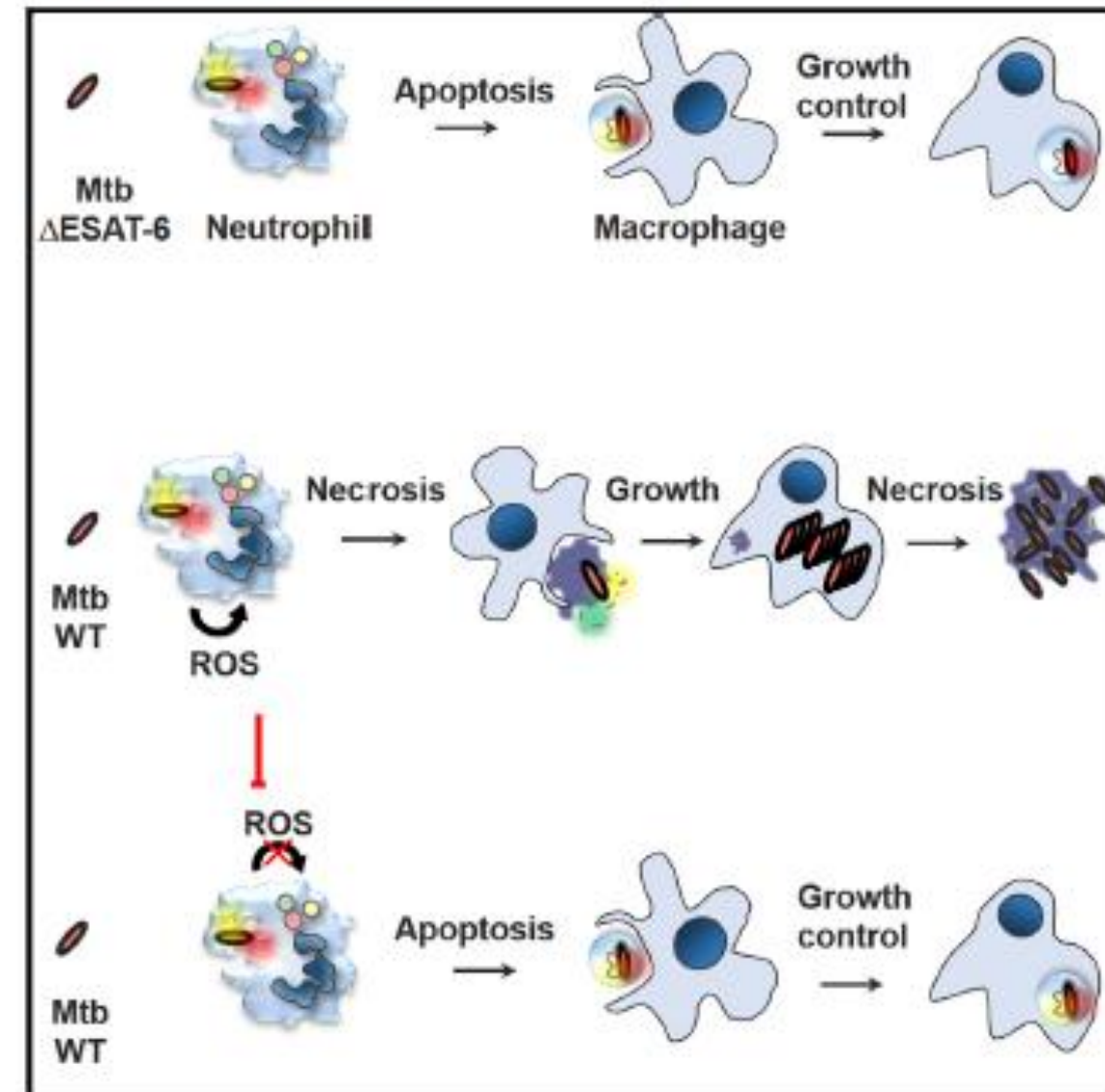
Mtb y necrosis en neutrófilos

La fusión de gránulos de neutrófilos con el fagosoma da como resultado la formación de un fagolisosoma, lo que permite el ensamblaje del complejo de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)

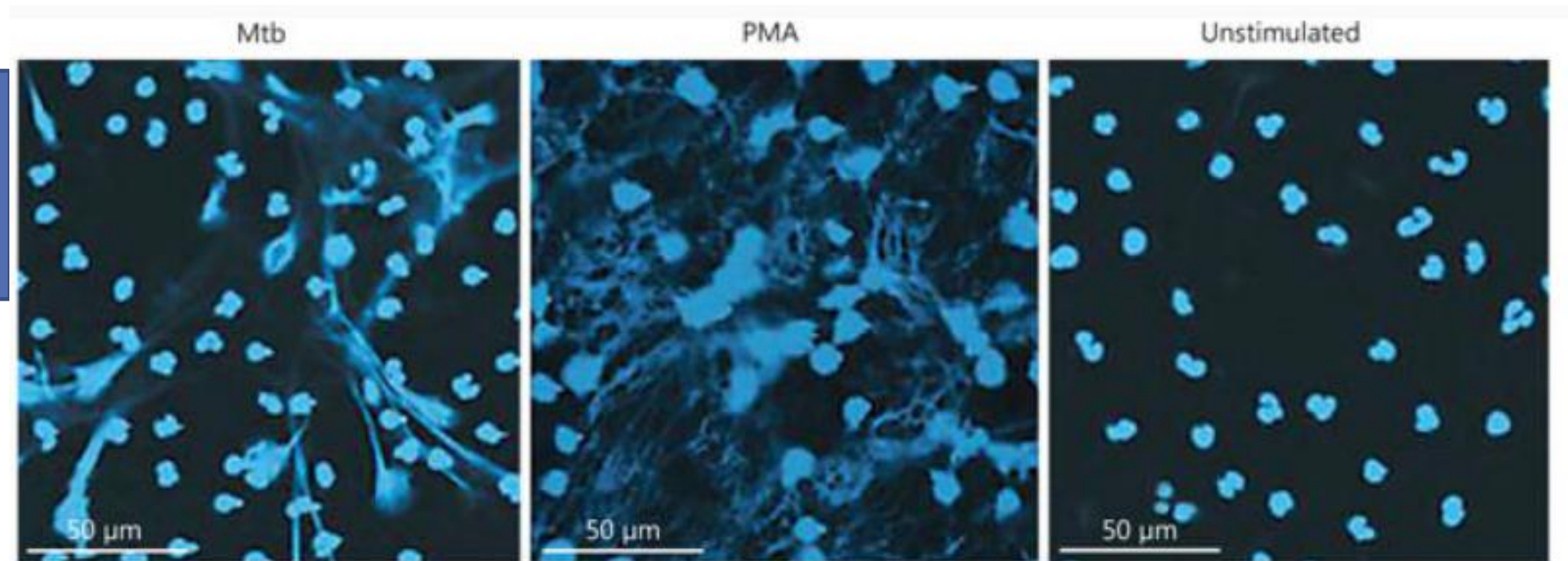
La NADPH oxidasa es un complejo multiproteína transmembrana que transfiere electrones al oxígeno molecular, para generar aniones superóxido

factores de virulencia codificados por la región genómica RD1

Graphical Abstract

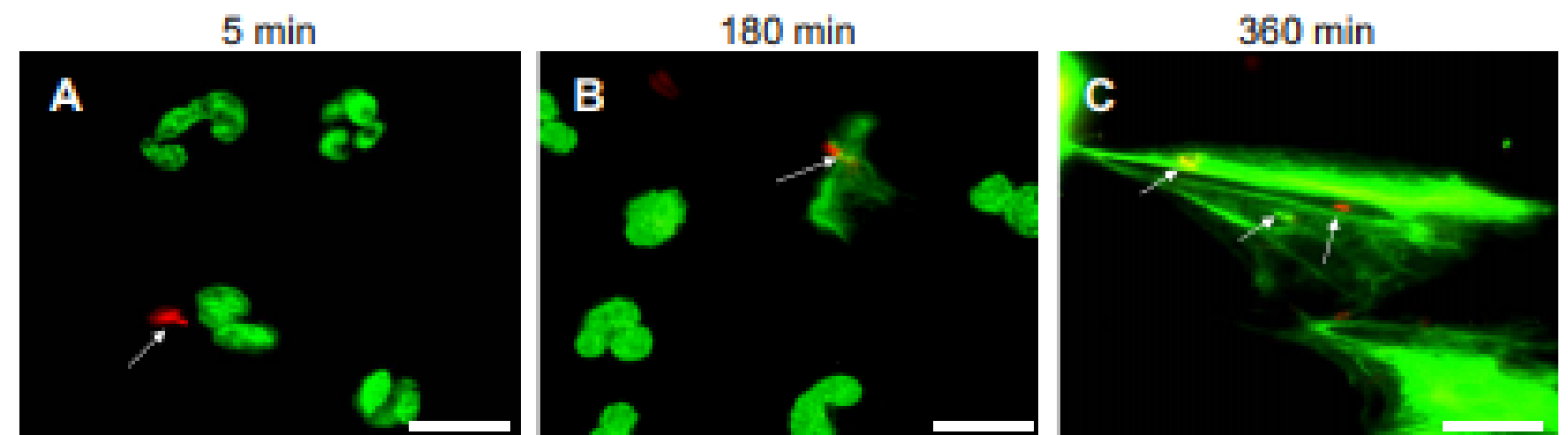
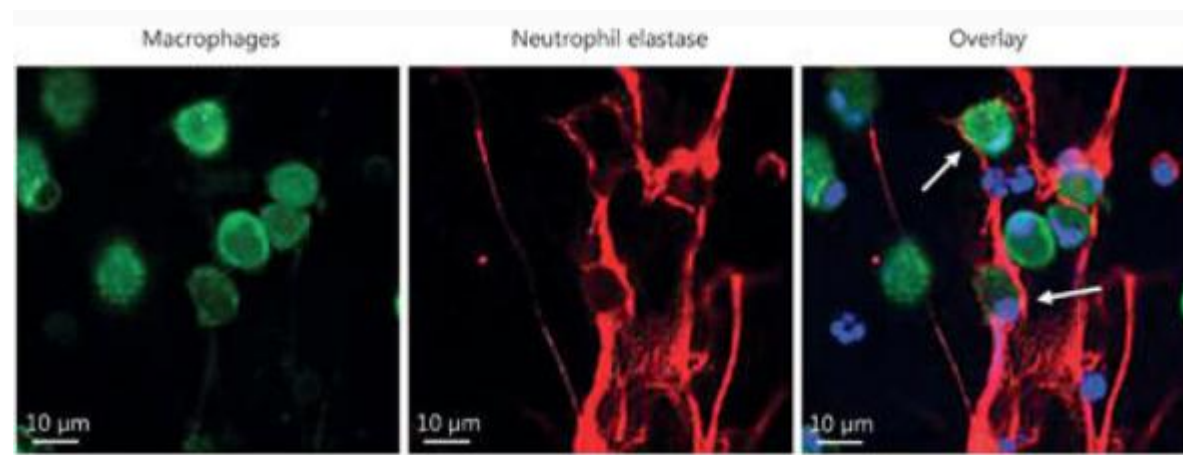


Mtb y NETs



- Se requiere MPO para NETosis mediada por la muerte, pero el mecanismo de acción aún no se ha descubierto por completo.
- No dependiente de la activación de caspasas
- PMA (forbol miristato acetato)

Dependiente de fagocitosis micobacteriana
La apoptosis inducida por *Mtb* no es necesaria para la formación de NET.



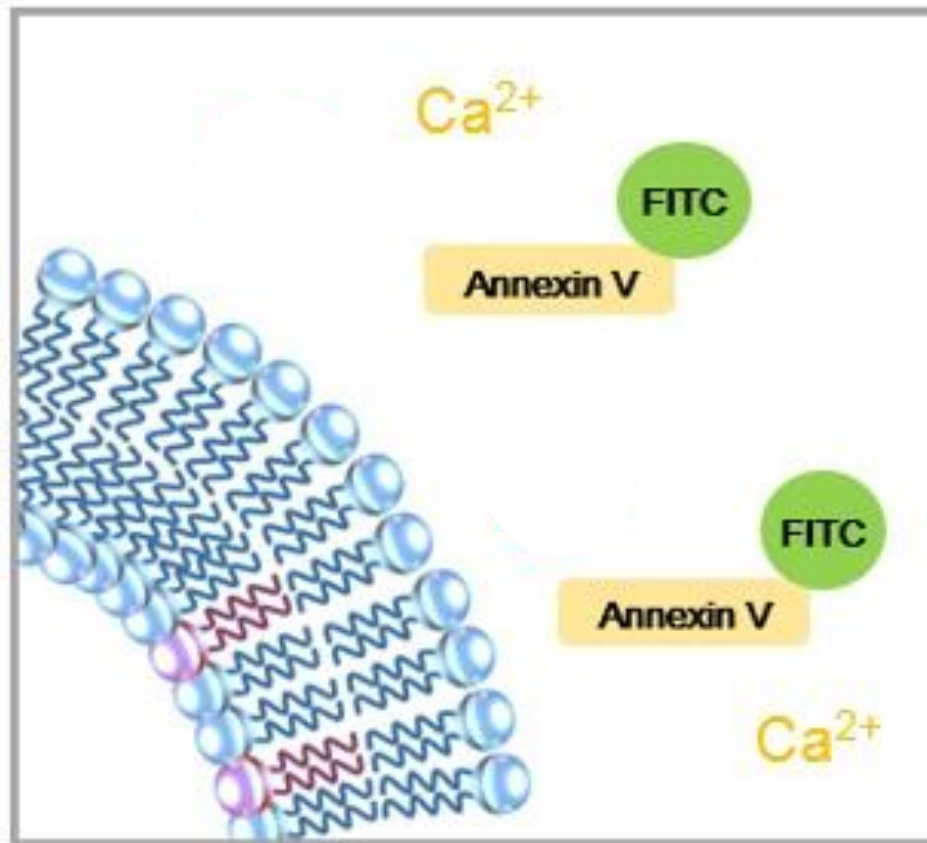
(A) *M. tuberculosis*



(B) Attenuated mycobacteria



Anexina V



Normal Cell



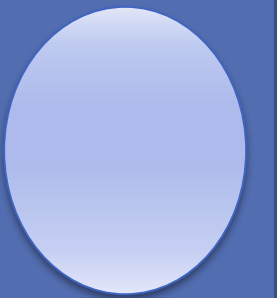
Early stages of apoptosis



Late stages of apoptosis

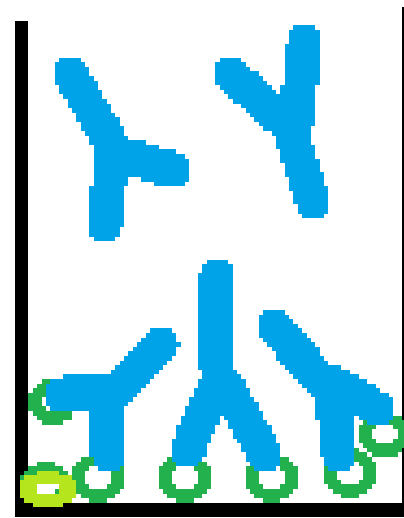
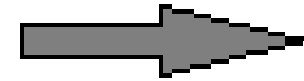
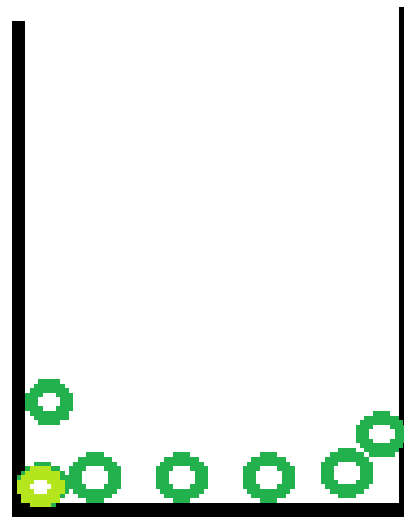
METODOLOGIA

- ❖ [ELISA](#)
- ❖ [Aislamiento de IgGs](#)
- ❖ [Dot blot](#)
- ❖ [Aislamiento de Neutrófilos](#)
- ❖ [Ensayo de Opsonofagocitosis](#)
- ❖ [Cultivo de *Mtb* H37Rv](#)
- ❖ [Lisado de *Mtb* H37Rv](#)
- ❖ [Apoptosis y Macrófagos](#)
- ❖ [Necrosis neutrofilos – Artículo](#)
- ❖ [NETs neutrofilos - Artículo](#)

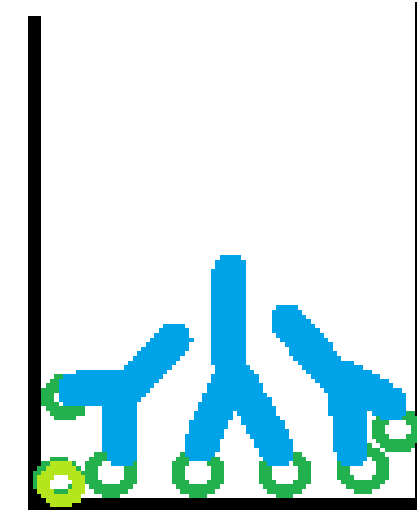


ELISA

Ag 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
37°C por 2h

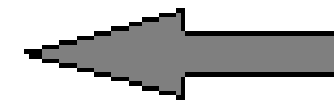
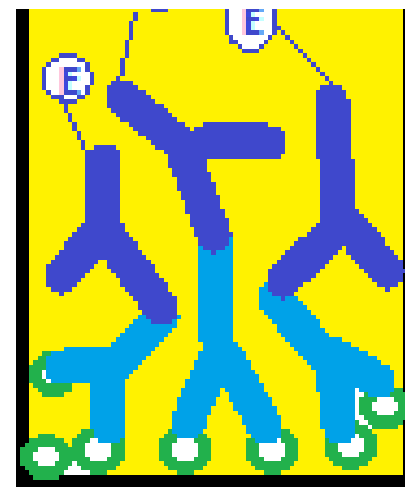


Suero del donante
dil 1:25 2h 37°C

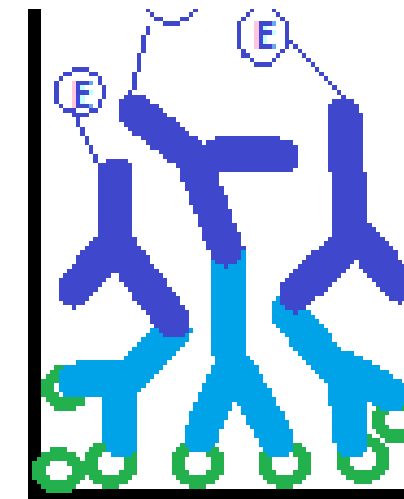


50 μl de ácido fosfórico
(H_3PO_4)

Lectura espectrofotómetro
a 450nm.



Se reveló con
3,3',5,5'
Tetrametilbencidina
(TMB)



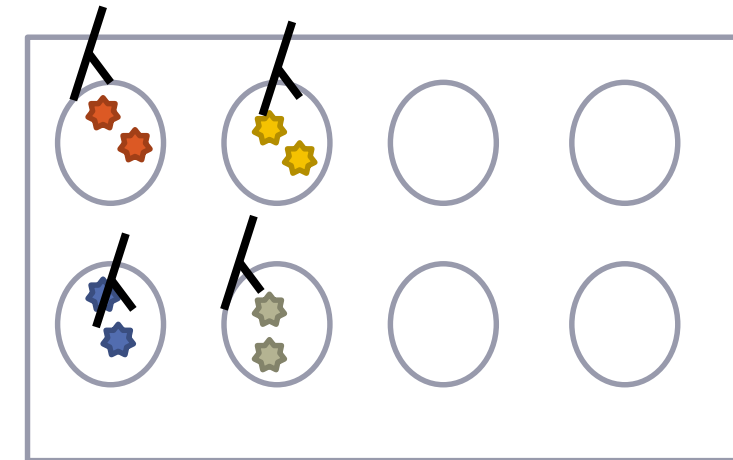
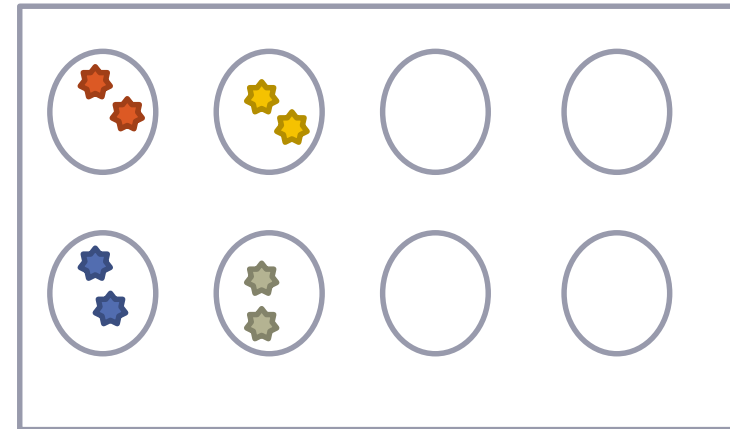
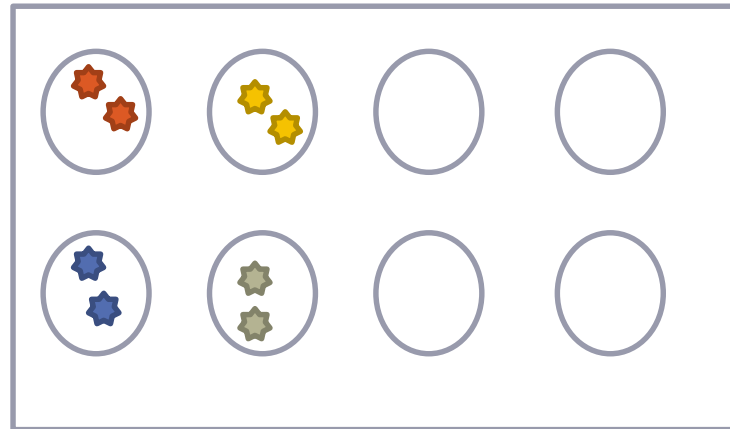
Anti Human IgG -
conjugado con
peroxidasa

1:10000

1h -37°C

Dot Blot

Membrana de nitrocelulosa

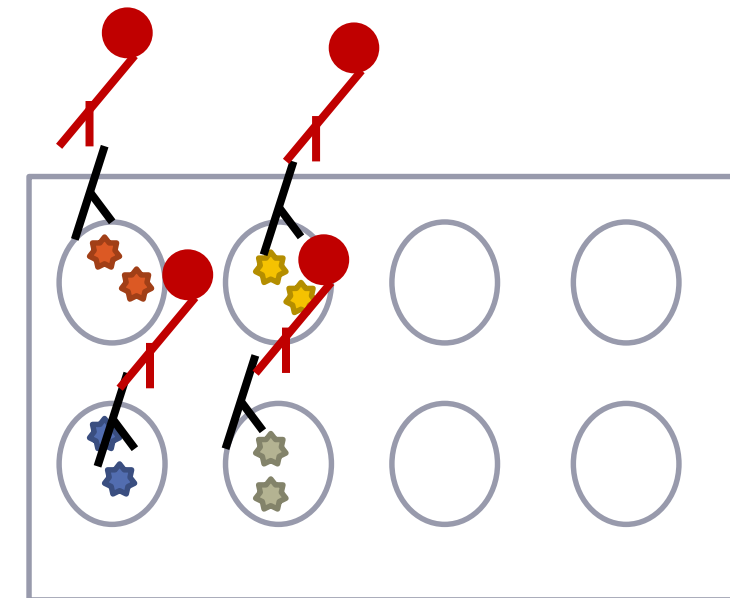
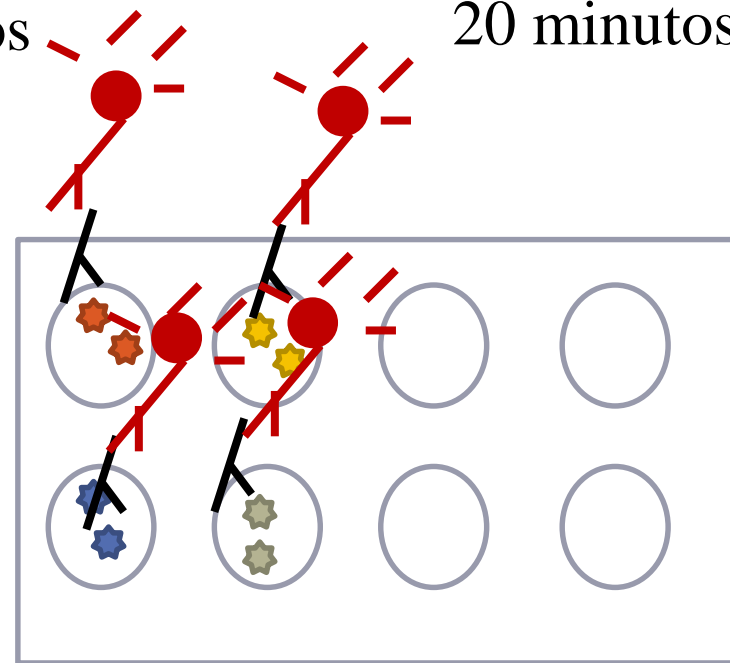


IgG 1:100
10 minutos
37°C

Ag 10 µg/mL
37°C por 10 minutos

Bloqueo sitios de unión
20 minutos

Se reveló con 6.6 µl
de NBT y 3.3 BCIP



anti-human
conjugado con
fosfatasa
1:5000
1 hora - 37°C

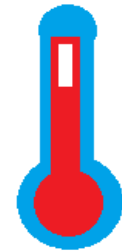
NBT: Tetrazolio azul nitro

BCIP: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-Fosfato

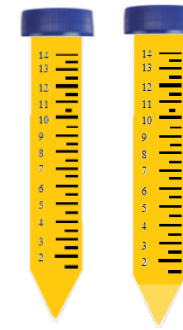
AISLAMIENTO DE IgG



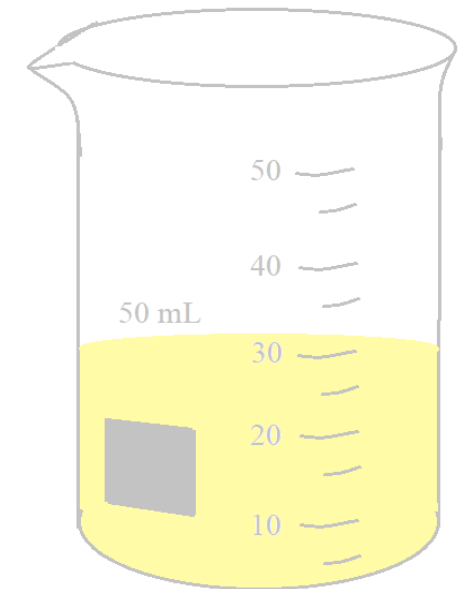
Se recolectó sangre periférica



El suero del donante se inactiva a 56°C durante 30 minutos



Se centrifuga a 13000rpm durante 30 minutos

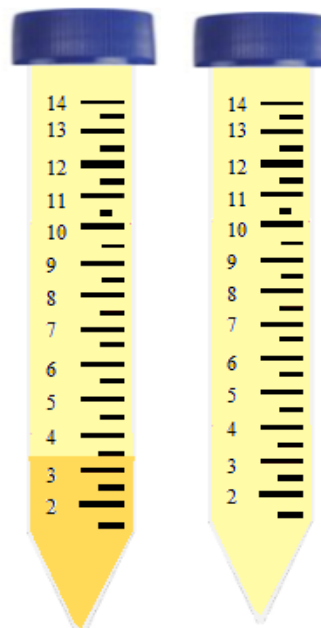


Se adiciona el doble de Buffer acetato con respecto al suero inicial

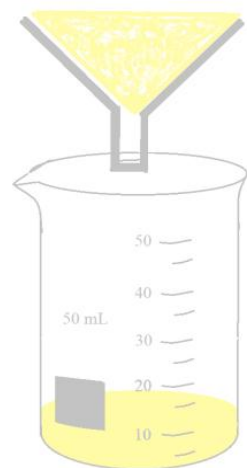
Verificar que el pH quede en 4,6-4,8



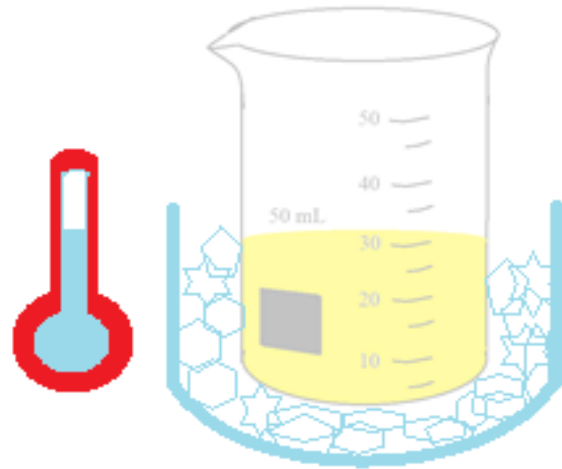
Se adiciona ácido caprílico y se deja en agitación durante 2h



Se centrifuga a 5000rpm durante 15 minutos



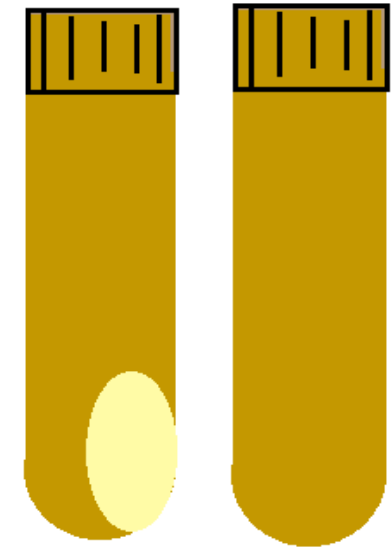
Filtrar el sobrenadante por papel whatman, medir pH y llevar a 7,0



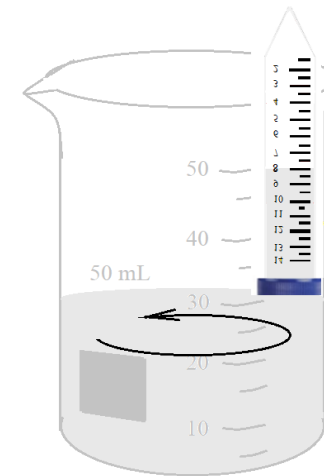
Dejar durante 20 minutos
en cama de hielo



Agregar Sulfato de amonio al 40%
hasta que se disuelva bien.
Centrifugar a 13000rpm x 20 minutos
a 4°C



Centrifugar a 13000rpm x 20 minutos
a 4°C y lavar el pellet 3 veces con
Sulfato de amonio al 33%



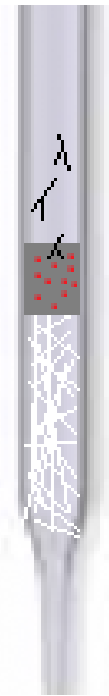
Se dializa en Tris 10mM, utilizando una
membrana de 6-4000Da

PURIFICACIÓN DE IgG



Medio Sefarosa 4B
activada con Bromuro de
Cianógeno

Tris HCl (pH 8.0)
Acetato de Sodio (pH 4)
Bicarbonato de sodio (pH
8.3)



Se agregó la IgG
total del donante



Se eluyó el Ac de
interés con glicina



Se concentra el Ac
en amicon con una
membrana de
100.000 Da

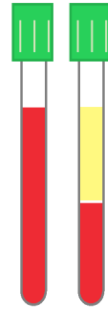
Centrifugando a
4000 rpm durante 30
minutos

$$\text{Concentración : Ac mg/L} = \text{Abs} \times 10000 \times \frac{13.7}{280}$$

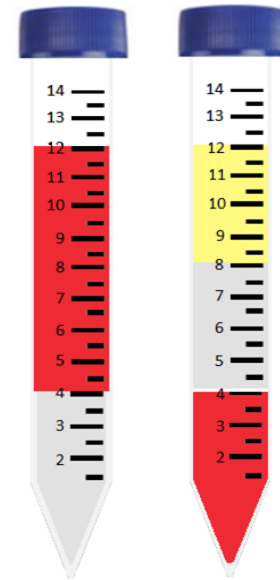
AISLAMIENTO DE NEUTRÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA



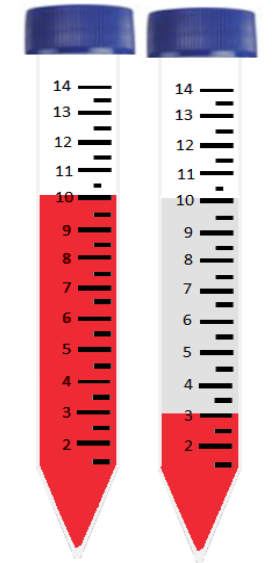
Se recolectó sangre periférica



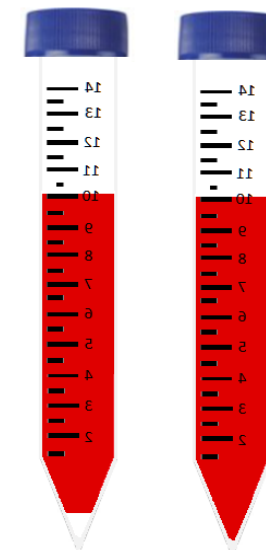
Se centrifugo las mx a 1700 rpm x 7 minutos



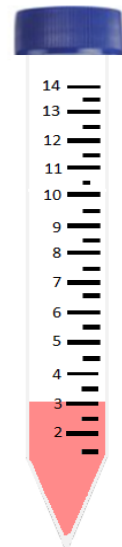
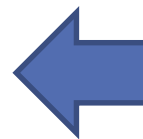
Gradiente de Ficoll-Histopaque
Se centrifugo a 550g durante 30 minutos



Lavados a 1800rpm durante 5 minutos

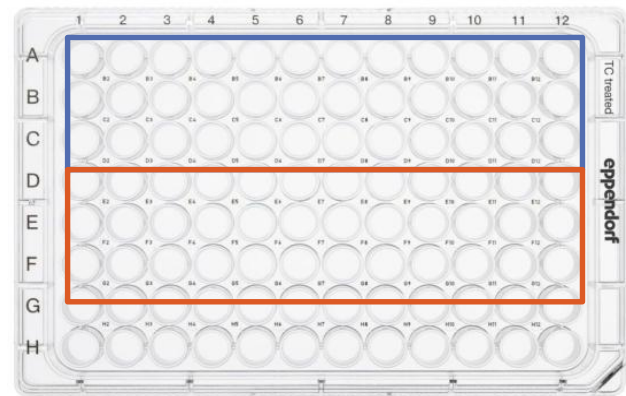


Lisis de Rojos (Sln hipotonica)
Y
Lavados a 1800rpm durante 5 minutos



Los PMNs se resuspendieron en medio RPMI suplementado con Suero Bovino al 10%

OPSONOFAGOCITOSIS

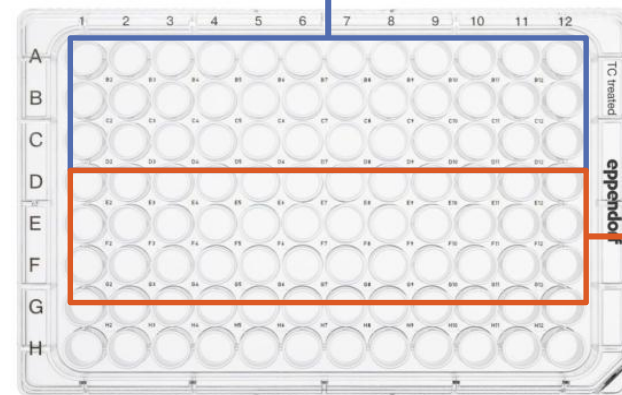


Se incubaron 100.000 células por pozo



- 31025
- 31039
- 30987
- 37964
- 37765
- 31107
- 37780
- 16300
- 38373

Se incubó la micobacteria con cada una de las inmunoglobulinas aisladas (Opsonización)

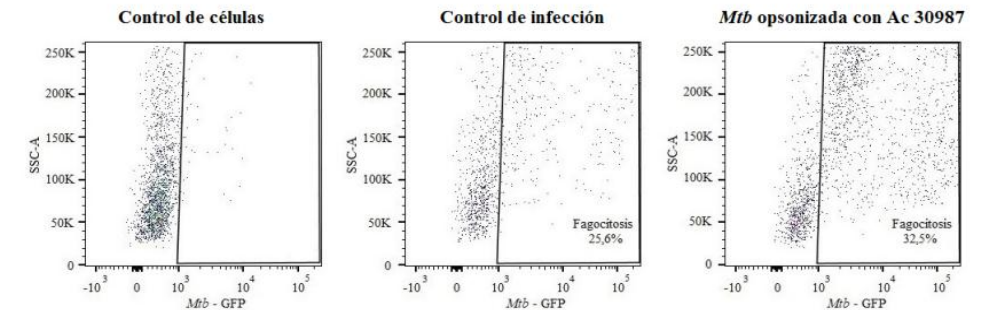


Se incubó 18h los neutrófilos con micobacteria pre-opsonizada



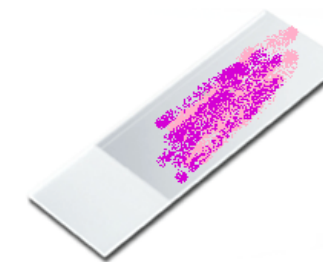
Las células se fijaron con paraformaldehído 4% y glutaraldehído al 0.5%

Citometría de flujo



Extendido en lamina y tinción con Giemsa

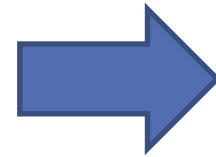
Microscopía



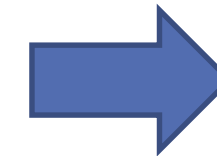
CULTIVO DE *Mtb* H37Rv



Medio Middlebrook 7H9,
suplementado con OADC e
higromicina.

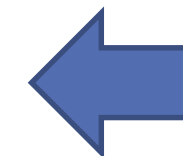


Hasta obtener una densidad óptica a
600nm entre 0.5 – 1.0



COSECHA:

Se centrifuga a 13000 rpm durante
20 minutos a 20°C



SIEMBRA:

El pellet se resuspende en PBS 1x y se
guarda a -20°C hasta su uso

LISADO DE *Mtb* H37Rv



A partir de una cosecha de *Mtb* H37Rv

Buffer de lisis

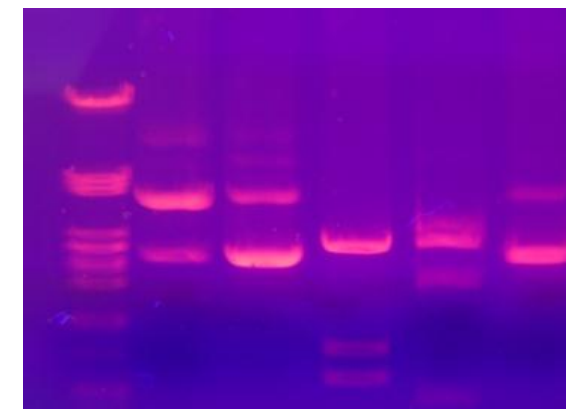
- Pepstatina
- Leupeptina
- fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)
- Dnasa
- Rnasa
- Lisozima



Se centrifuga 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C

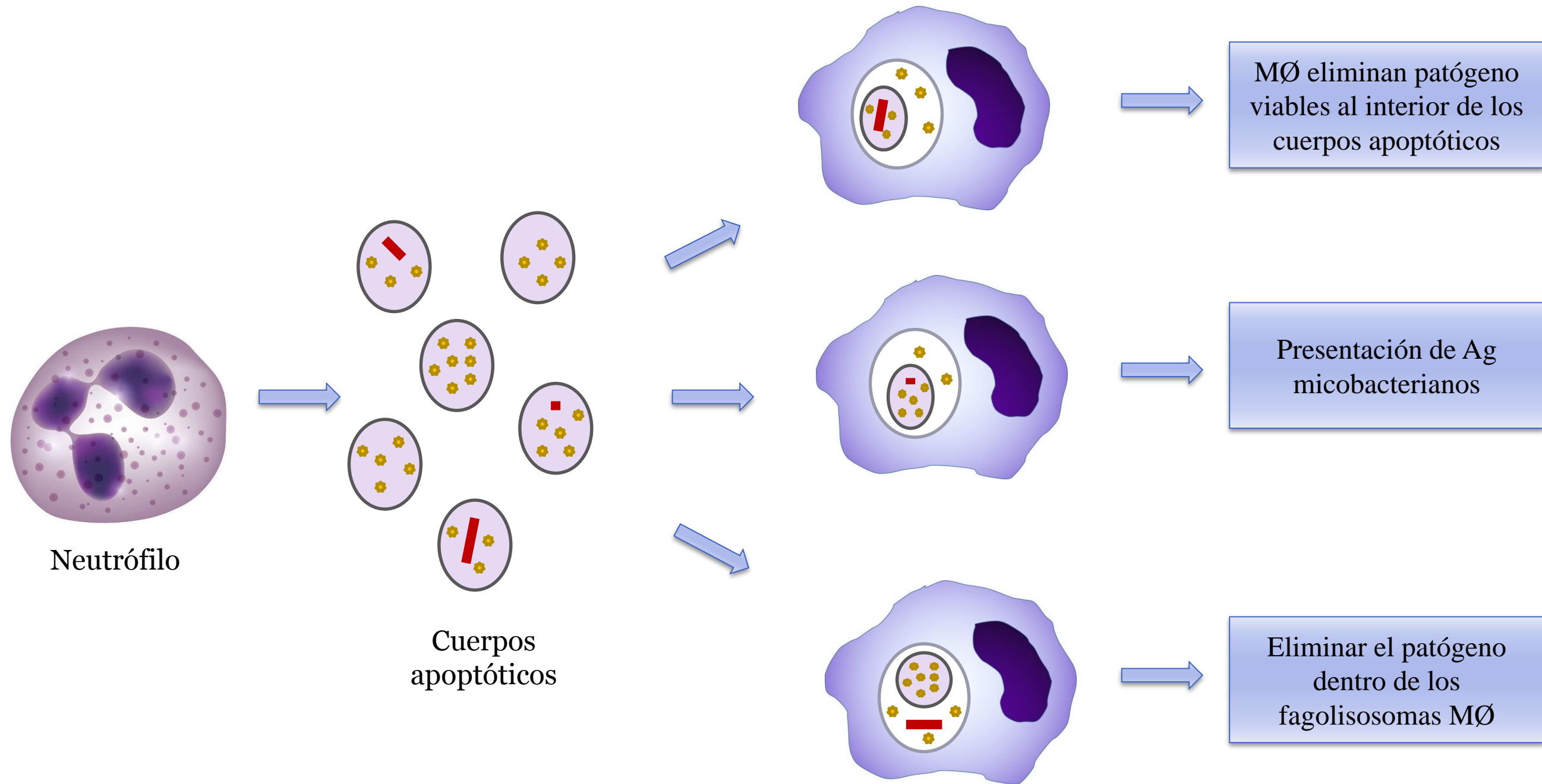


Se calienta el sobrenadante en ebullición durante 90 minutos

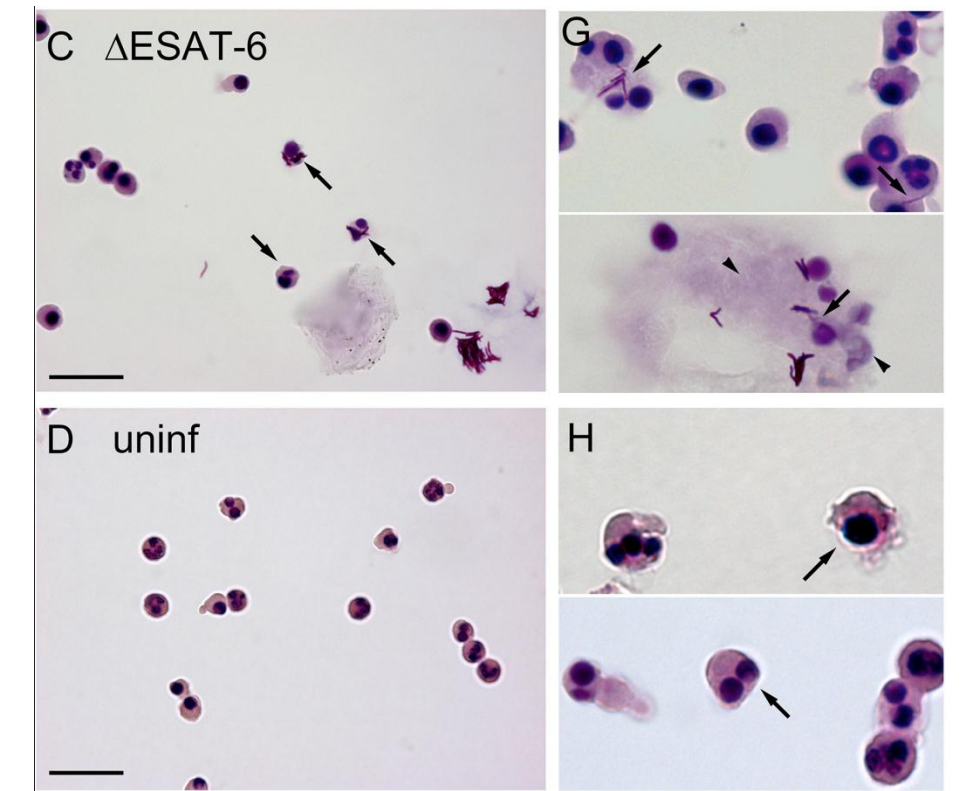
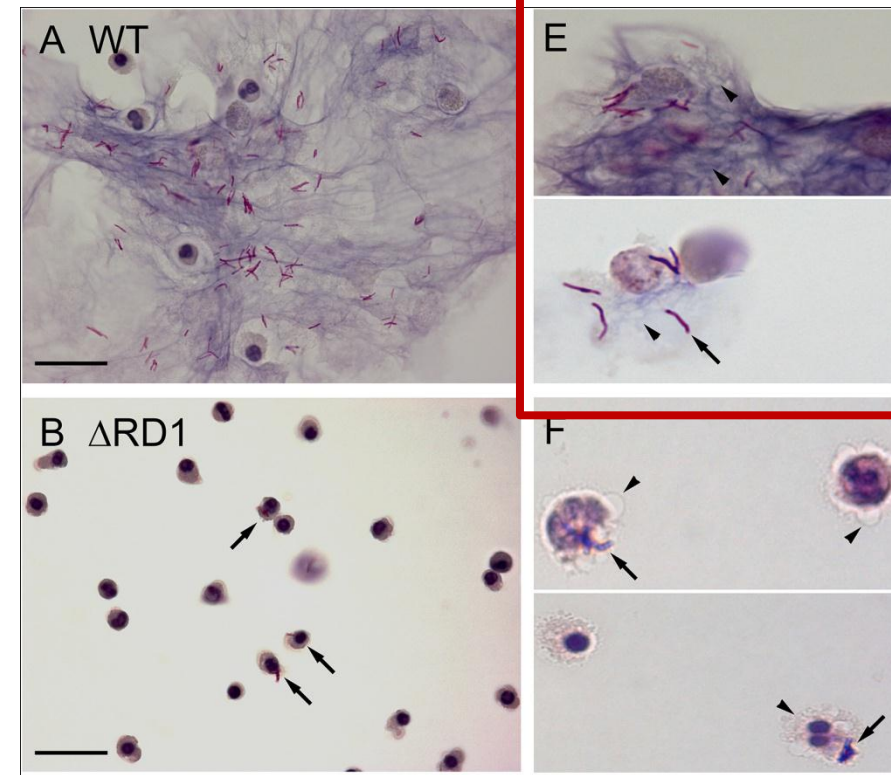
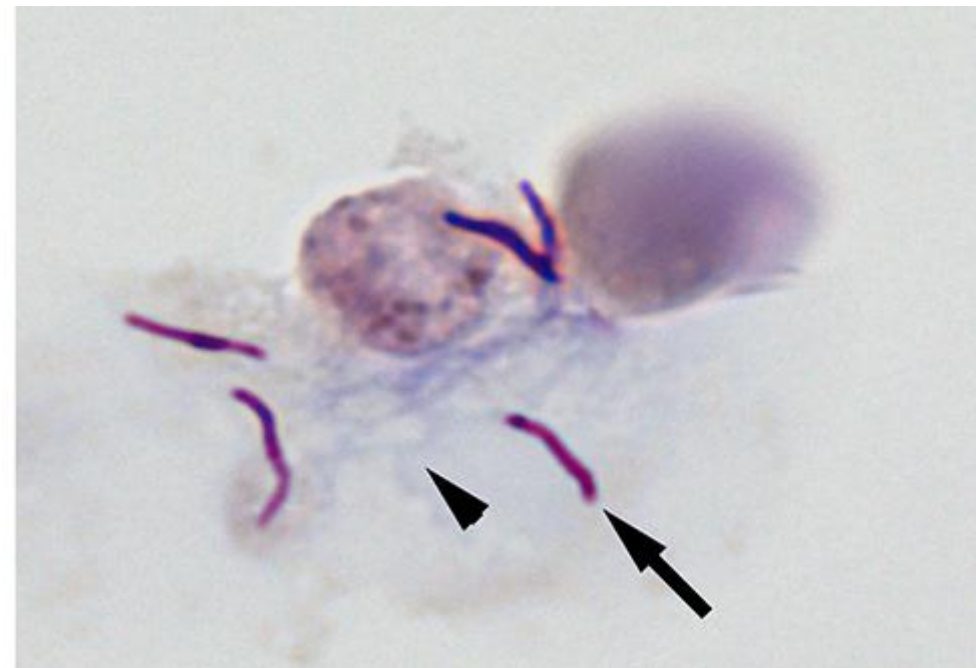
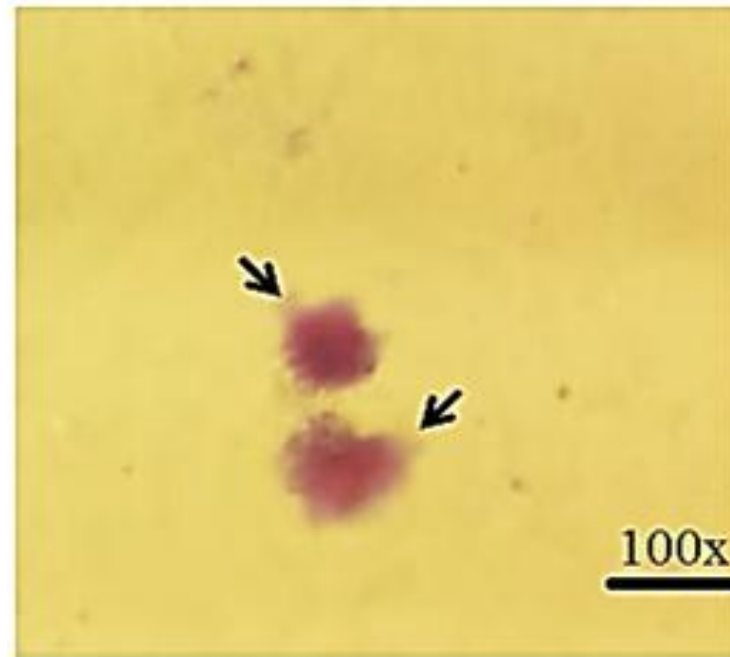


Se verifica por electroforesis

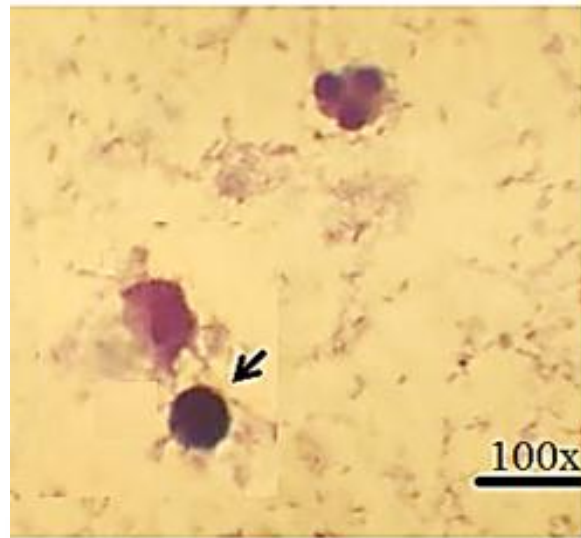
Apoptosis de neutrófilos y macrófagos



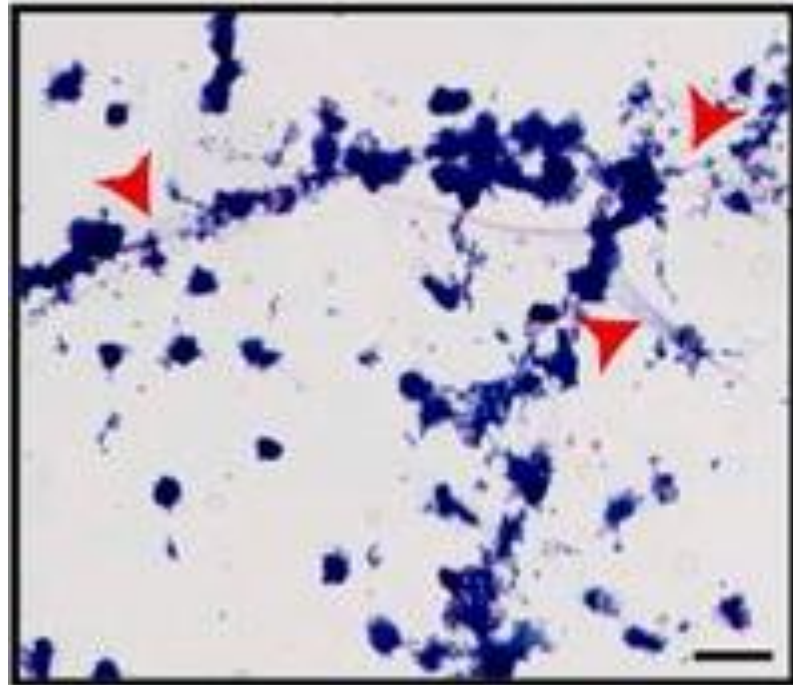
Necrosis neutrófilos



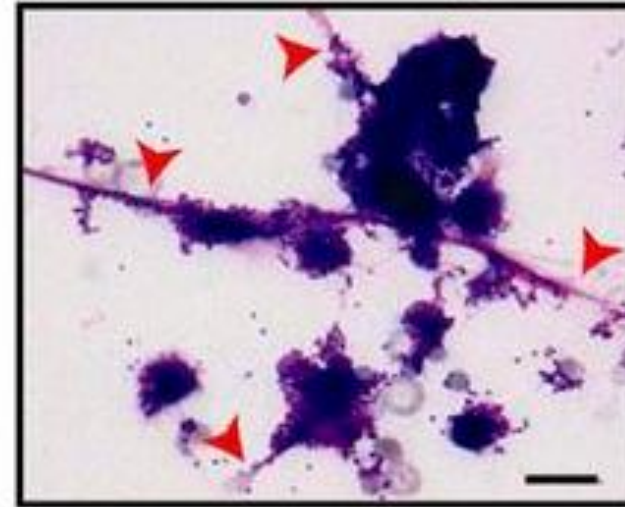
NETs



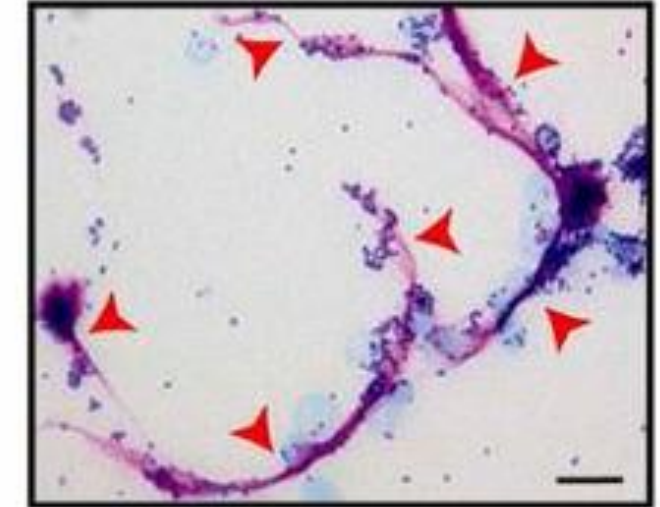
S. aureus+IgA



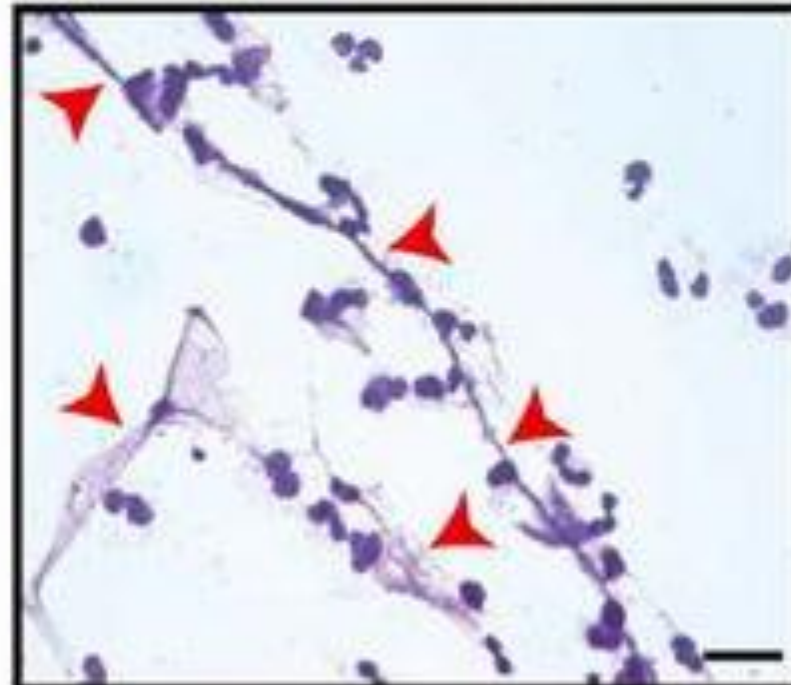
HI *S. aureus*+IgA



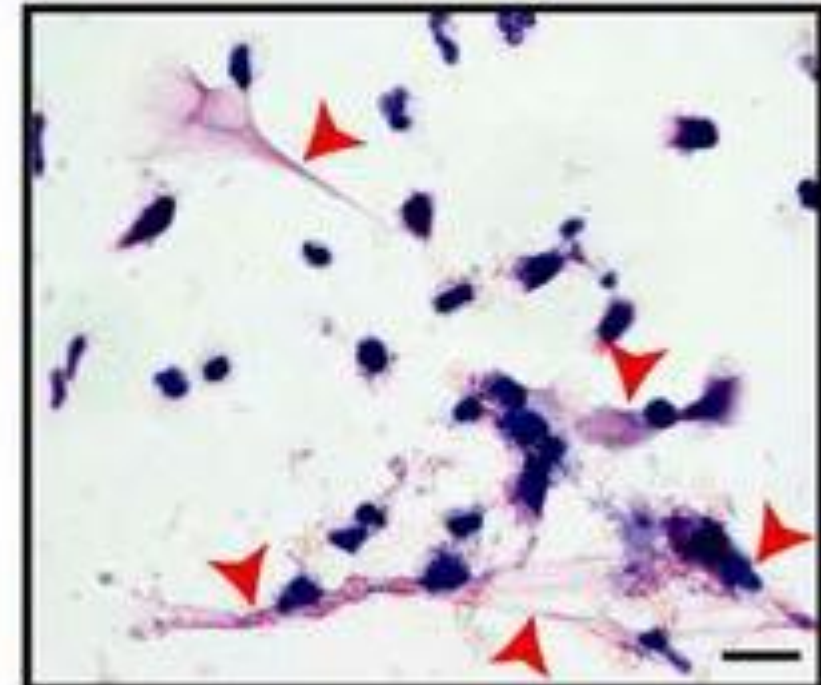
S. aureus+IgA



E. coli+IgA



S. typhimurium+IgA



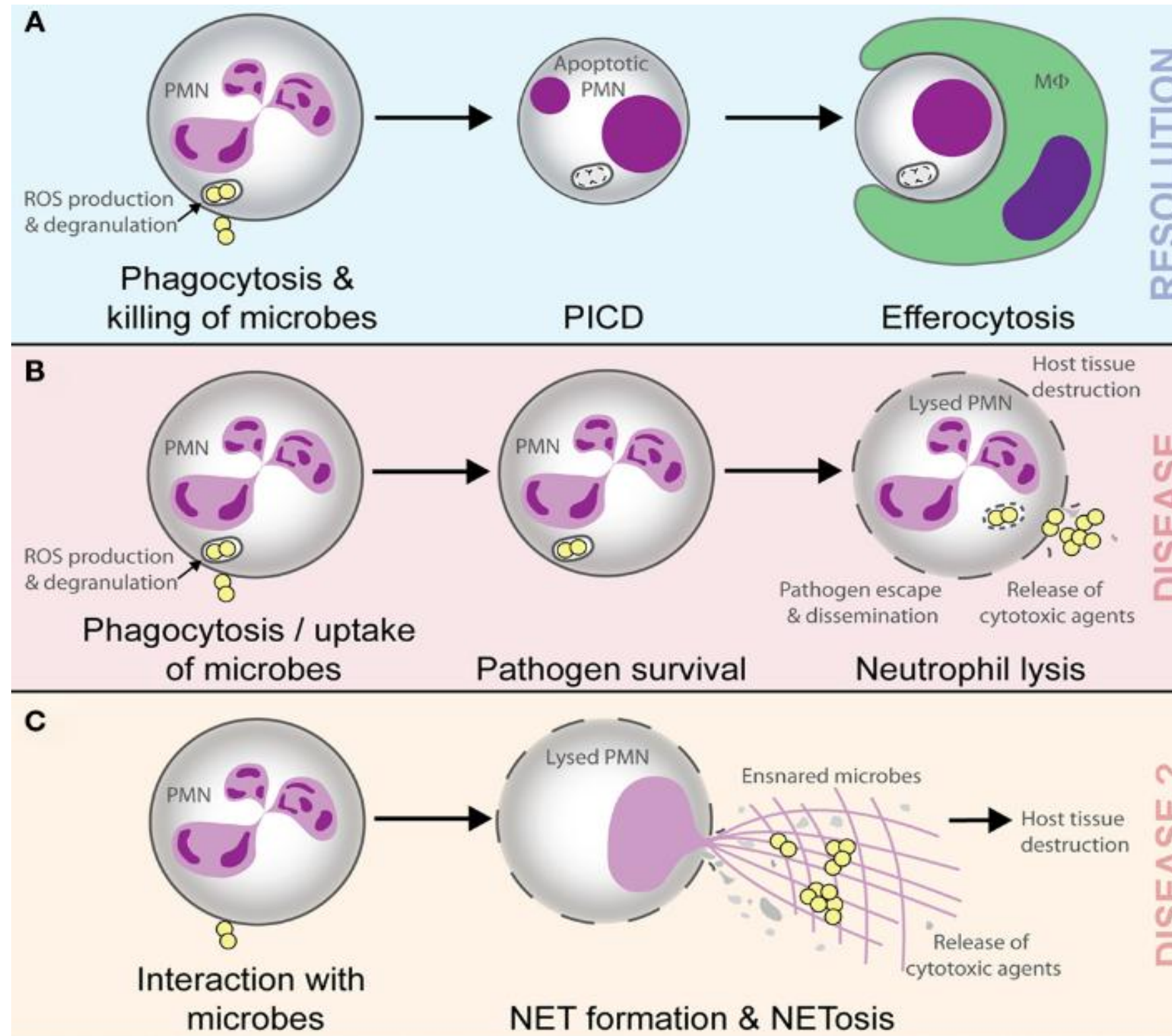
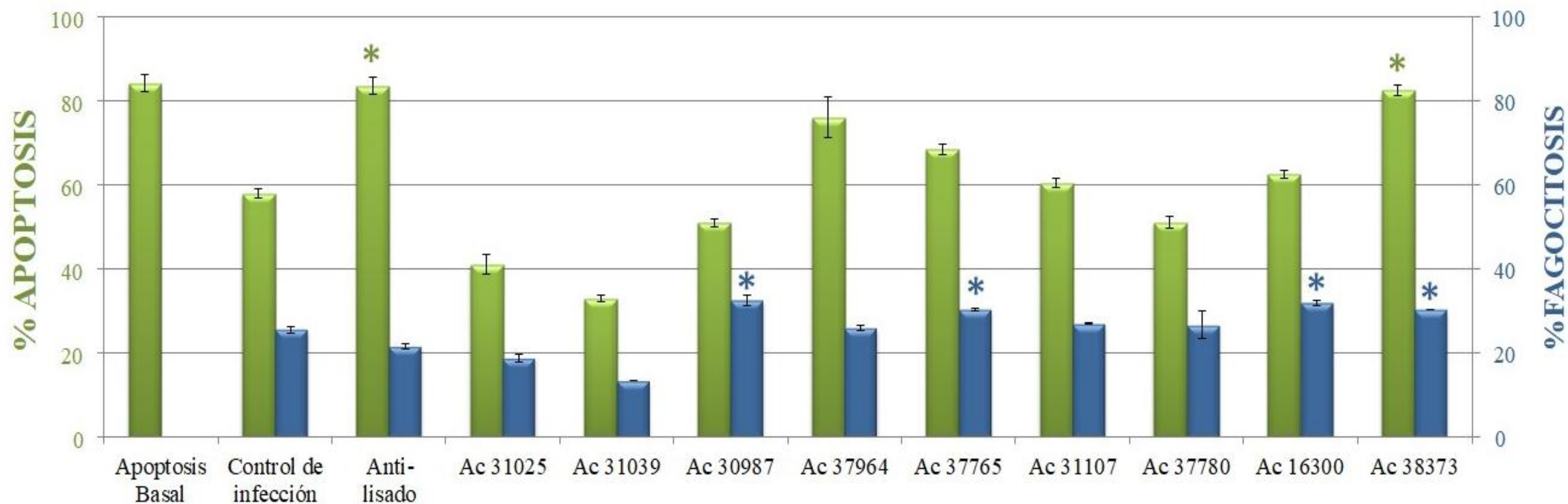


Table I. *Effect of the NADPH oxidase inhibitor DPI on spontaneous and Mtb-induced apoptosis in human neutrophils^a*

Treatment	Apoptotic Cells (%)	
	Morphology	Annexin V
Medium alone	28 ± 6.2	26 ± 4.1
+DPI	24 ± 5.0	23 ± 2.8
H37Rv	70 ± 6.0	72 ± 5.3
+DPI	32 ± 9.0	24 ± 3.2

^a DPI-treated or untreated neutrophils were cultured for 18 h in medium alone or stimulated with H37Rv. The percentage of cells displaying apoptotic morphology and exposing PS were evaluated as outlined in the legend to Fig. 1. Each value represents the mean ± SD of four independent experiments.

Perskvist N, Long M, Stendahl O and Zheng L. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol.* 2002; 168: 6358-65.



CONCENTRACIÓN IgG (µg/mL)	23.0	19.8	16.9	32.9	20.8	16.1	30.1	25.4	63.0
	0.69	0.59	0.50	0.98	0.62	0.48	0.90	0.76	1.89