



# DETERMINACIÓN DE RESPUESTA INMUNE CELULAR GENERADA POR PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv



ERIKA TATIANA TONGUINO QUIÑONEZ

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C 2018



# DETERMINACIÓN DE RESPUESTA INMUNE CELULAR GENERADA POR PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv



**DEISY CAROLINA RODRIGUEZ LANCHEROS, Msc**

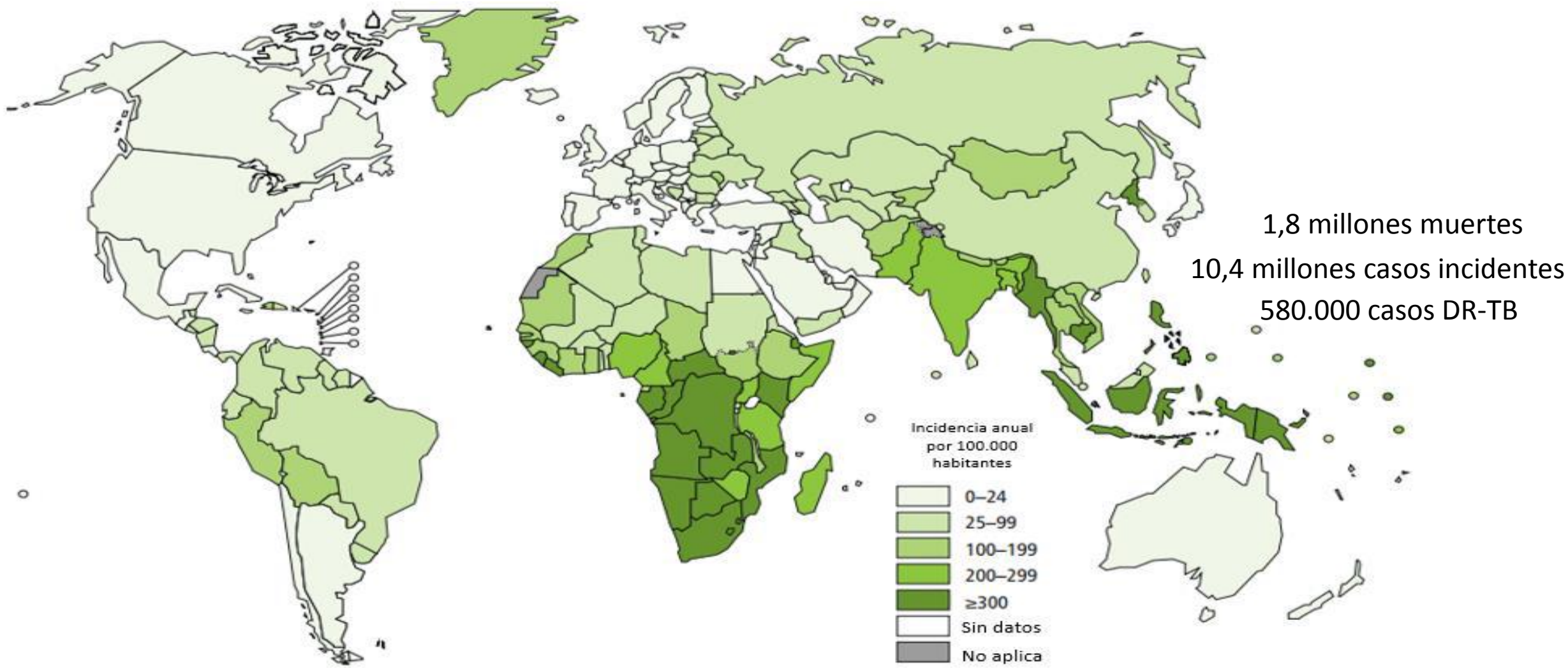
ASESORA EXTERNA, INVESTIGADORA FIDIC

**EDTIIH DEL CARMEN HERNANDEZ ROJAS, Msc**

ASESORA INTERNA, DOCENTE UCMC

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C 2018

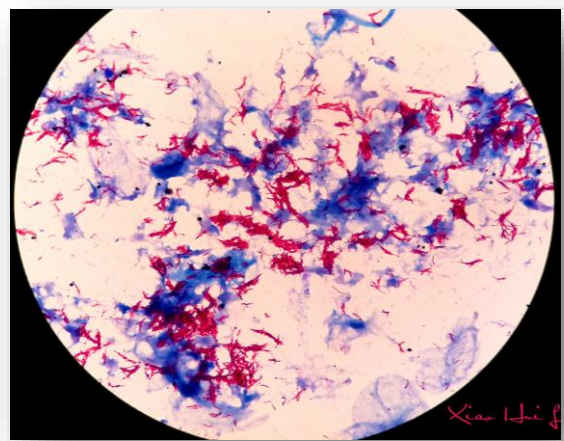
# TUBERCULOSIS



- WHO. Global Tuberculosis Report. Report. World Health Organization, 2017.
- SIVIGILA. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica 18, Abril 29 a mayo 05 de 2018

# *Mycobacterium tuberculosis*

- Bacilo ligeramente curvo
- Aerobio estricto
- No formador de esporas ni cápsulas
- Ácido alcohol resistente
- Inmóvil
- Crecimiento lento
- Colonias de aspecto granular, seco, rugoso, no pigmentado.
- Inactivación física con luz ultra violeta y temperaturas >60 °C



<https://fiestadelosmicroorganismos.wordpress.com/2016/12/15/practica-10-tincion-de-ziehl-neelsen/>

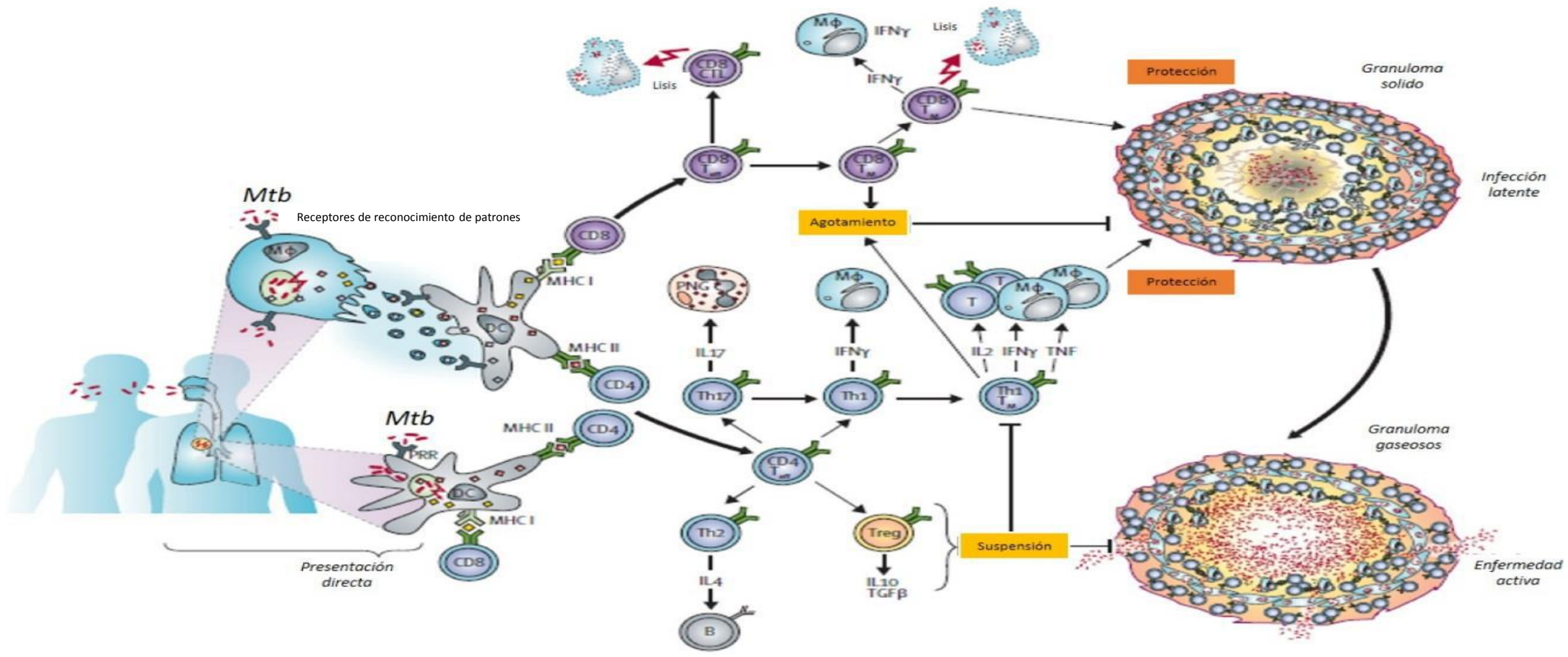


<http://gpdlab.com/servicios/mycobacterium-tuberculosis/>



[http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Myco\\_bacterium\\_tuberculosis.html](http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Myco_bacterium_tuberculosis.html)

# RESPUESTA INMUNE



Respuesta inmune en tuberculosis. Modificado de Kaufmann.

- Kaufmann SH, Hussey G, Lambert P-H. New vaccines for tuberculosis. The Lancet. 2010;375(9731):2110-9.

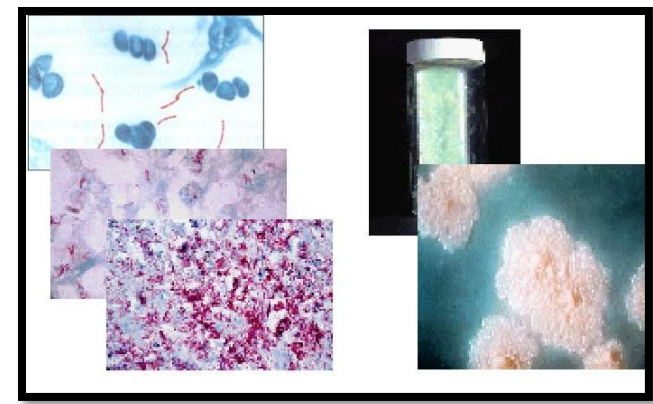
# DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

## CLÍNICO



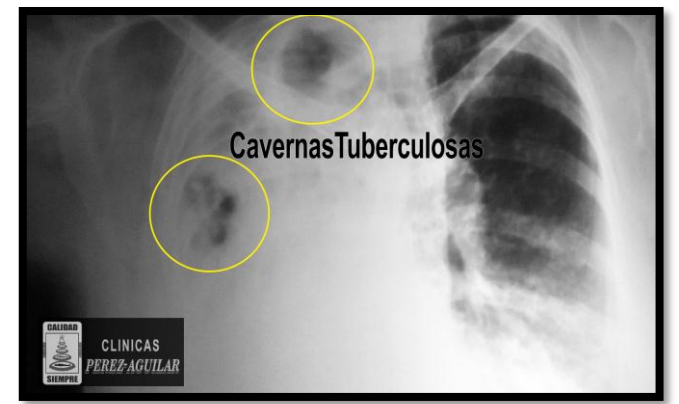
<http://fmdiabetes.org/diabetes-y-tuberculosis-personas-mas-propensas/tuberculosis1/>

## BACTERIOLÓGICO



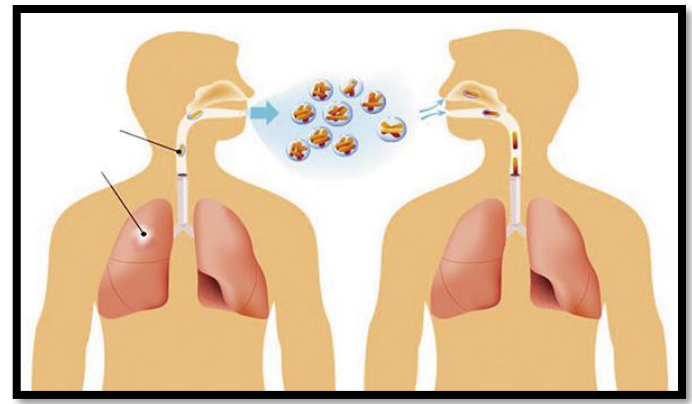
<http://slideplayer.es/slide/5543964/>

## RADIOLÓGICO



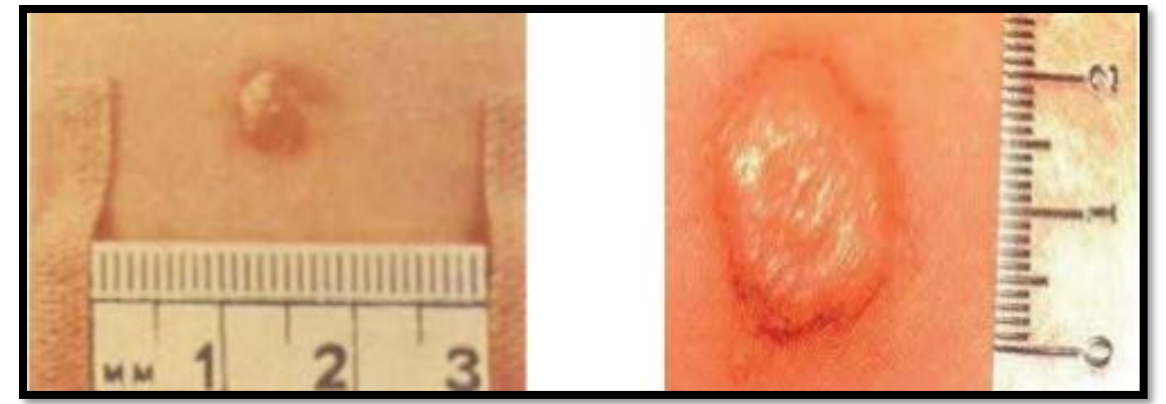
<http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-manifestaciones-radiologicas-tuberculosis-pulmonar-13029945>

## EPIDEMIOLOGICO



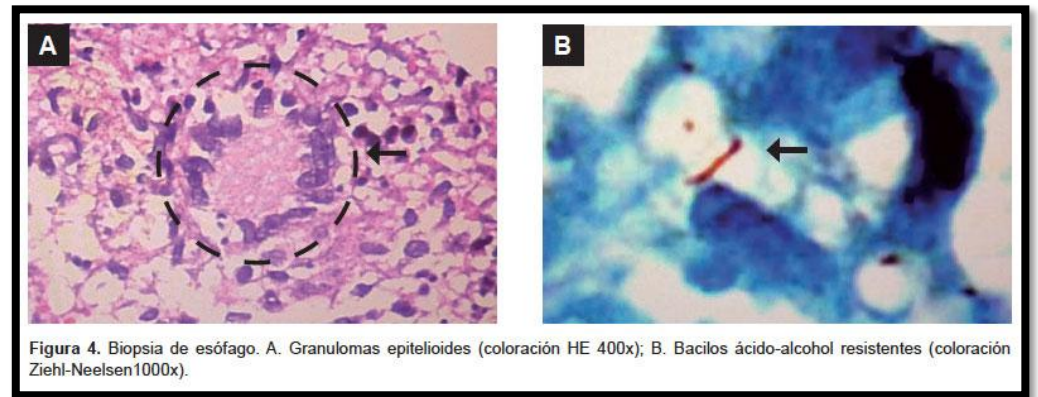
<http://slideplayer.es/slide/10259715/>

## TUBERCULÍNICO

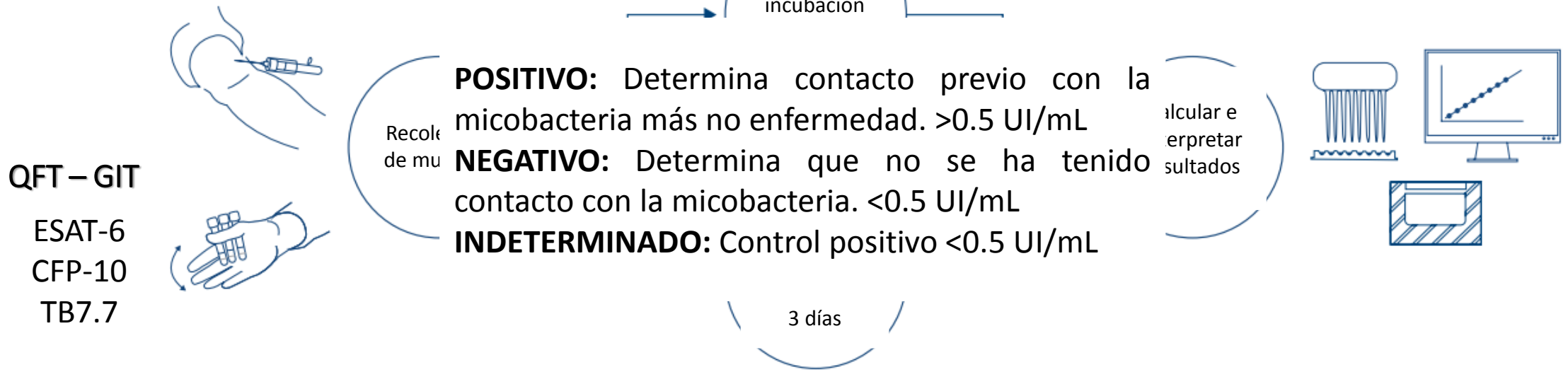


[http://printer-friendly.adam.com/content.aspx?productId=118&pid=5&gid=003839&c\\_custid=802](http://printer-friendly.adam.com/content.aspx?productId=118&pid=5&gid=003839&c_custid=802)

## HISTOPATOLÓGICO



## LIBERACIÓN IFN- $\gamma$



# *Mycobacterium bovis BCG* *Bacilo Calmette-Guerin*

Desarrollada en el año 1921.

TB meníngea – TB diseminada en lactantes y niños.

Protección parcial sobre TB pediátrica.

No evita infección ni reactivación de TBL

4 mil millones de dosis administradas en todo el mundo.

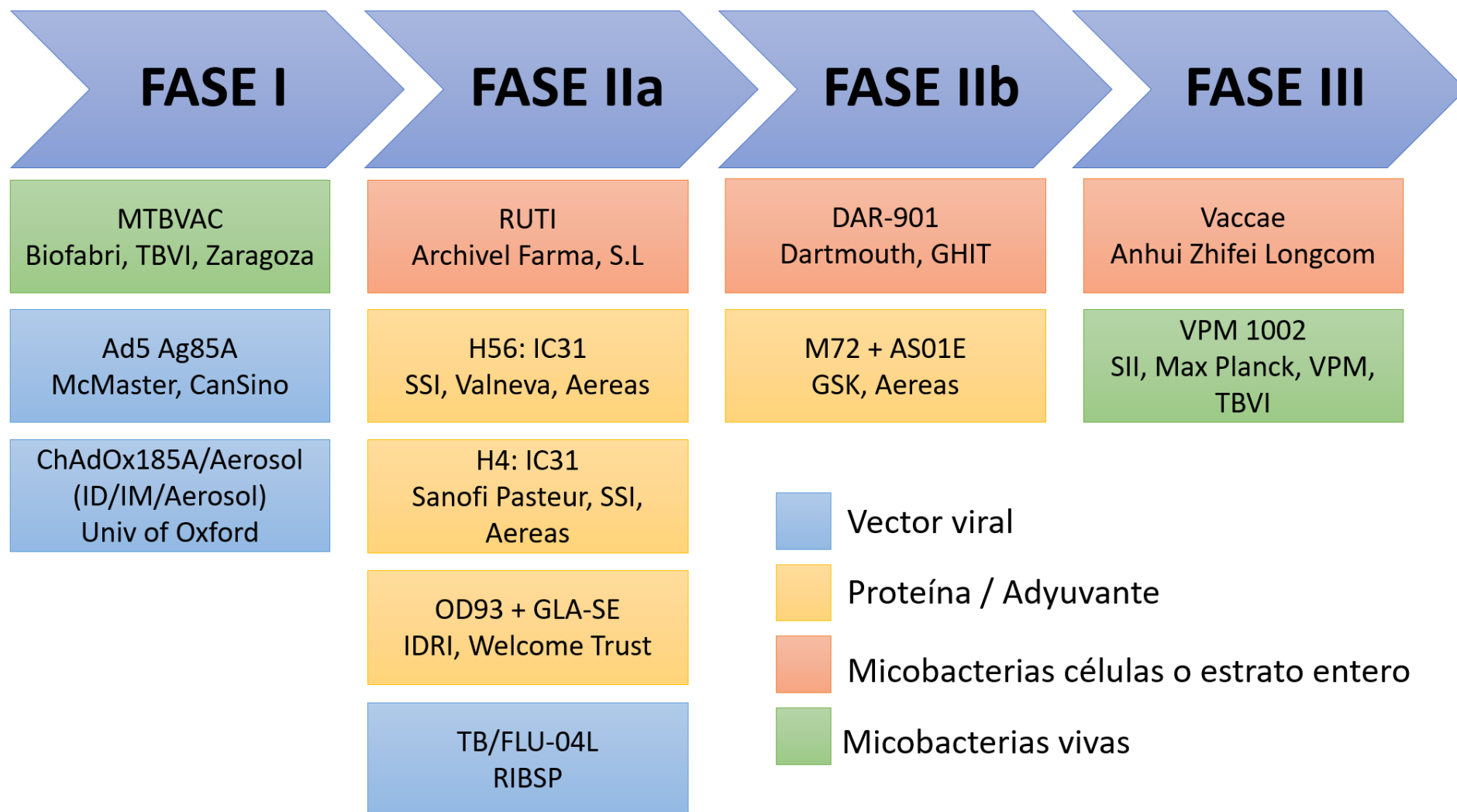
**Eficacia variable contra TB pulmonar (0% - 80%).**



<https://www.aidepharmacien.ma/actualite/item/12069-vaccin-bcg-ssi-remise-a-disposition-progressive-apres-3-mois-de-rupture-de-stock>

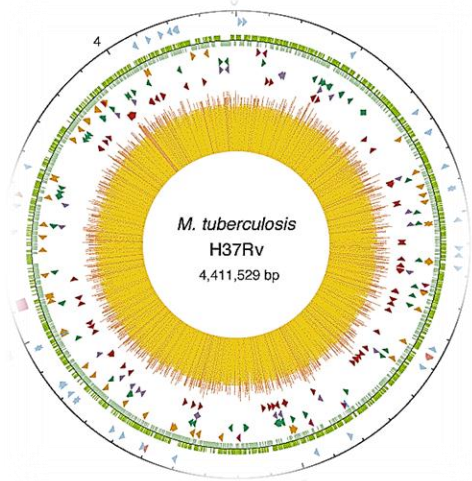


# DESARROLLO DE VACUNAS

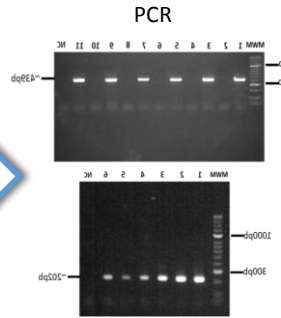
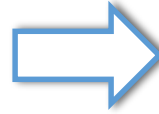


*Nuevas vacunas para prevenir la tuberculosis, tomado y modificado de AEREAS, 2017*

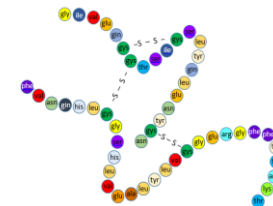
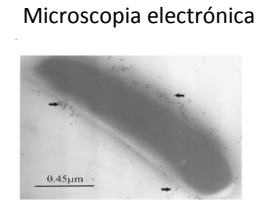
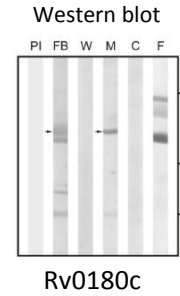
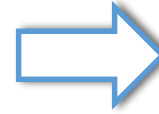
# METODOLOGÍA IMPLEMENTADA POR FIDIC



Cole S, et al. Nature. 1998;396(6707):190

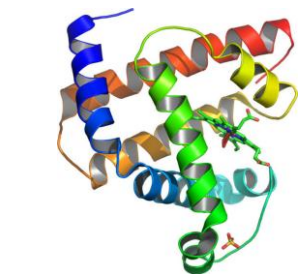
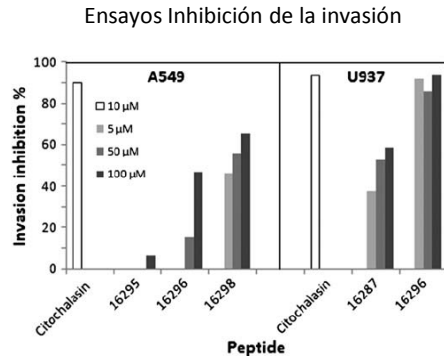


Presencia y transcripción



Ensayos unión específica

Peptide	Sequence	Specific Binding Activity (%)
36046	1 M YGTF LKGSIF YLC I F P P F F	20
36047	21 S C E C N N I K L N D K E N I F F E S Y	40
36048	41 F N K R T N E E N V L N K N S K E M G Y	90
36049	61 D T F V A H K A I E L N I H H V N V N Y	80
36050	81 D K E F N N N N N K H Q P Y Y H N E H	100
36051	101 D K K F S E S L K A H M D H L K I L N N Y	120
36052	121 D L K Q T I D K K E R N E I Y E N D L	140
36053	141 K K Y I I K E I Q N N K Y L N K E K K S	160
36054	161 S E D I Q I L E E H S K K L Q K E I H E Y	180
36055	181 W L E S V N N I E E K S N I L K N I K S Y	200
36056	201 Q L L N N I A S L N H T L S E E I K N I Y	220
36057	221 N D I K E L Q K Q N D L F S E N N L Y	240
36058	241 F I P S S S Y L L N E K K N L Y D N	260
36059	261 Q D N S M K D D I N N D K Y N I F N Y	280
36060	281 L Q N V Q K D N Q Y E V M K Q D N N N	300
36061	301 I H S G S S T H N H L L L T C I I F L L Y	320
36062	308 S T H N H L L L T C I I F L L L L L L Y	320



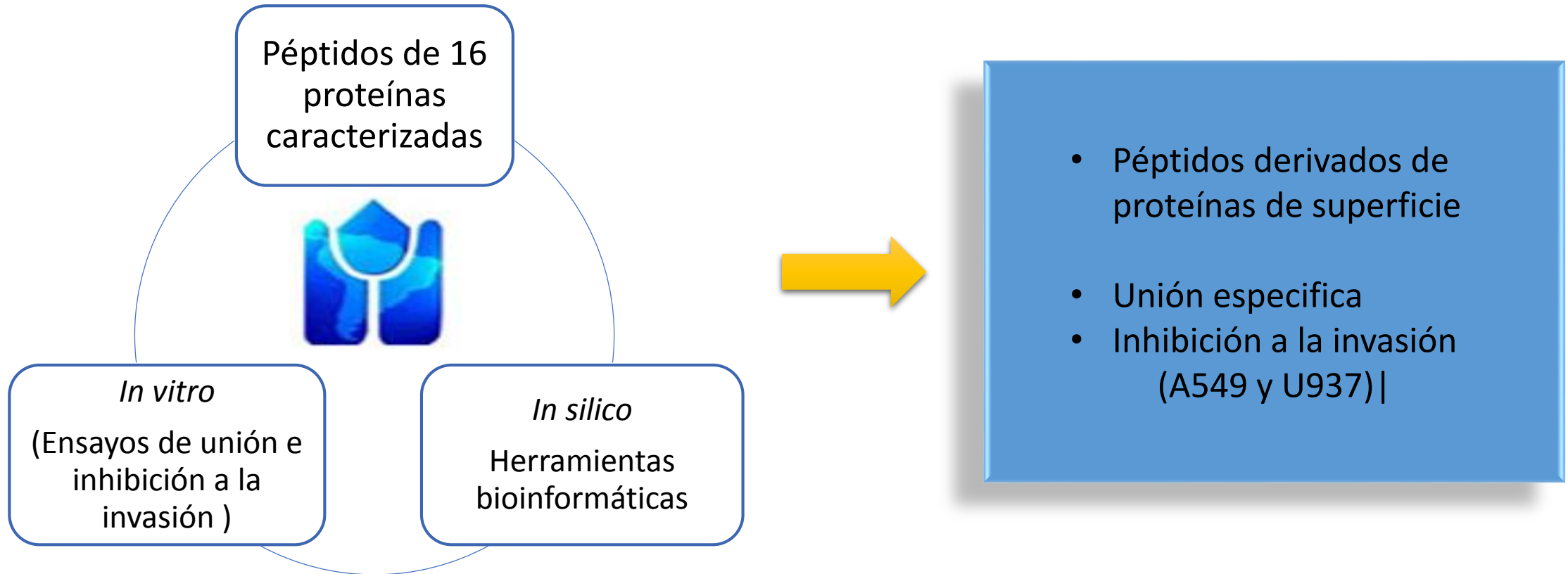
# GENERAL

Determinar la respuesta inmune celular a partir de ensayos de linfoproliferación de células mononucleares humanas generada por péptidos sintéticos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv.

# ESPECÍFICOS

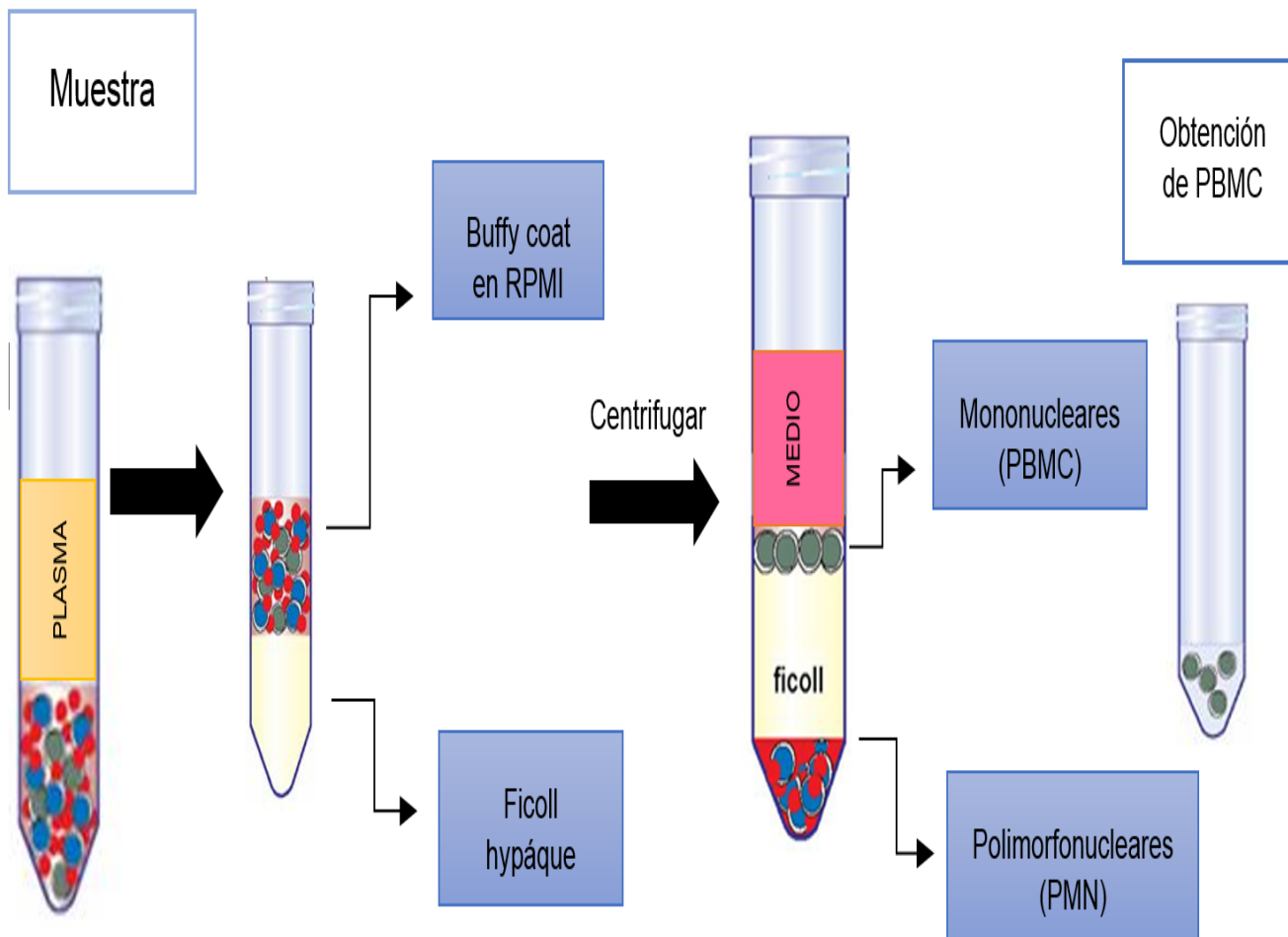
- Seleccionar péptidos sintéticos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* que hayan sido reportados como de alta unión específica y a su vez inhiban la invasión a líneas celulares A549 y U937.
- Evaluar la división celular inducida por péptidos sintéticos en linfocitos T derivados de PBMC de donantes sanos clasificados por prueba de Quantiferon.

# SELECCIÓN PÉPTIDOS PARA ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN



# ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN

8 donantes clasificados previamente por prueba Qf

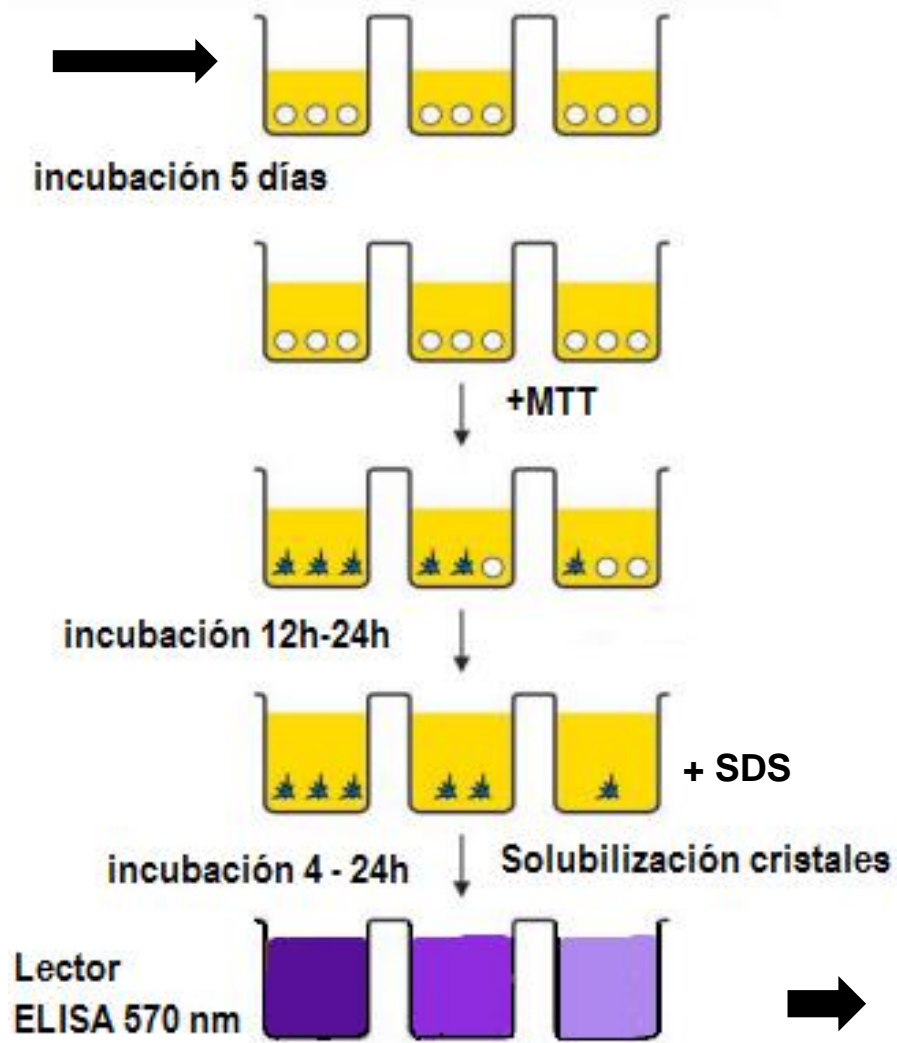


[http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_counts\\_SPA.pdf](http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf)

**Obtención de células mononucleares (PBMC)**

# ENSAYOS PRELIMINARES UTILIZANDO MTT

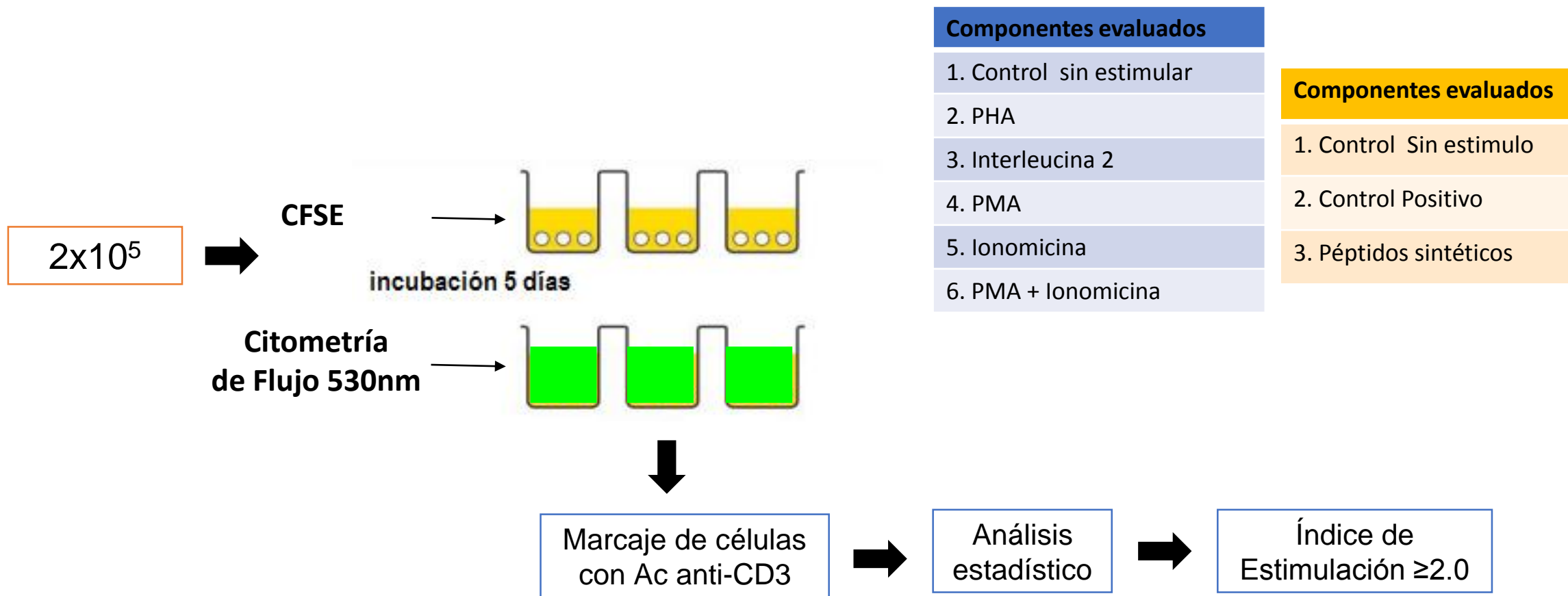
$2 \times 10^5$



## Componentes evaluados

1. Control sin estimular
2. PHA
3. Interleucina 2
4. PMA
5. Ionomicina
6. PMA + Ionomicina

# ENSAYOS UTILIZANDO CFSE



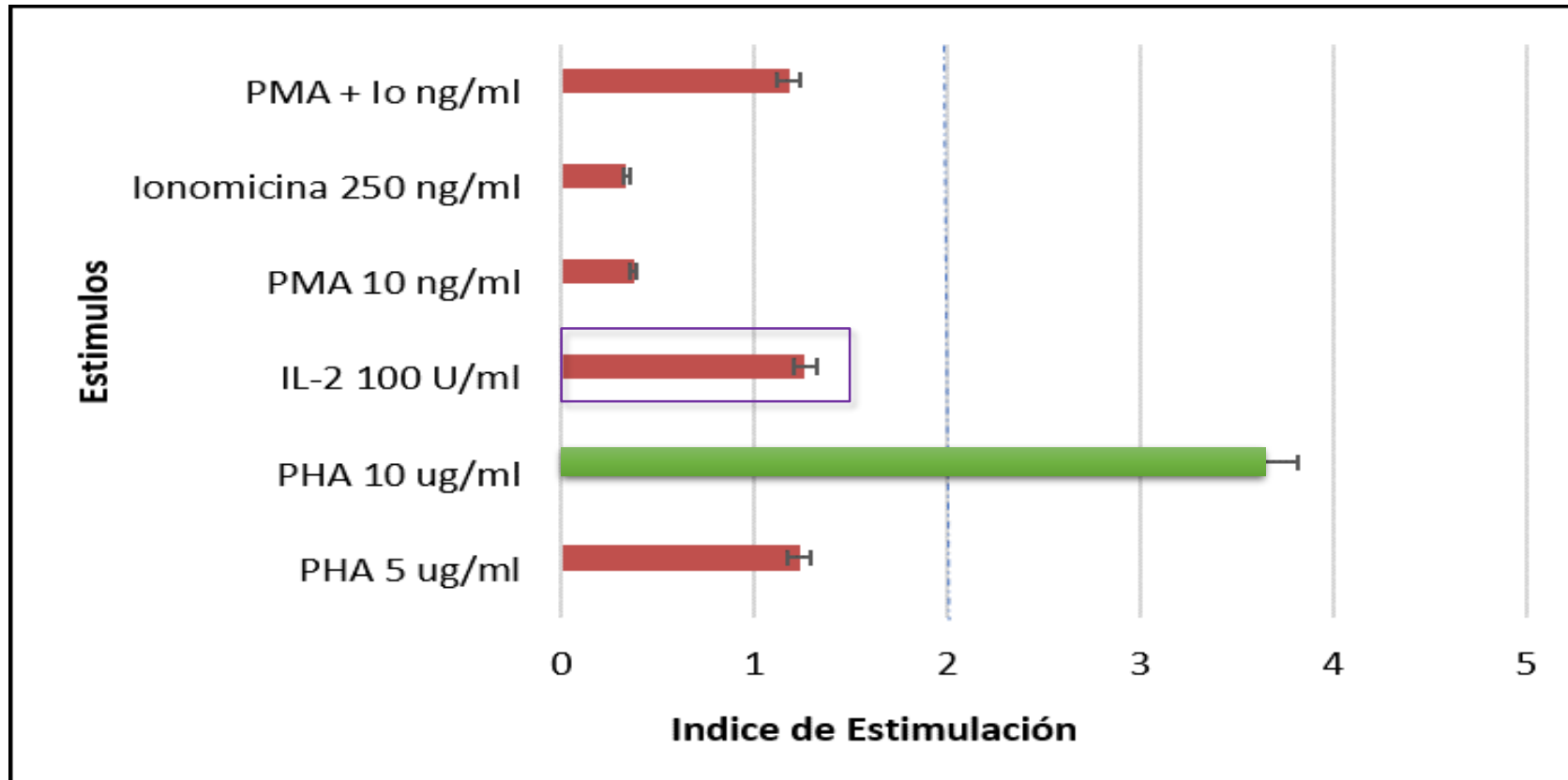


# PÉPTIDOS ENSAYOS DE LINFOPROLIFERACIÓN

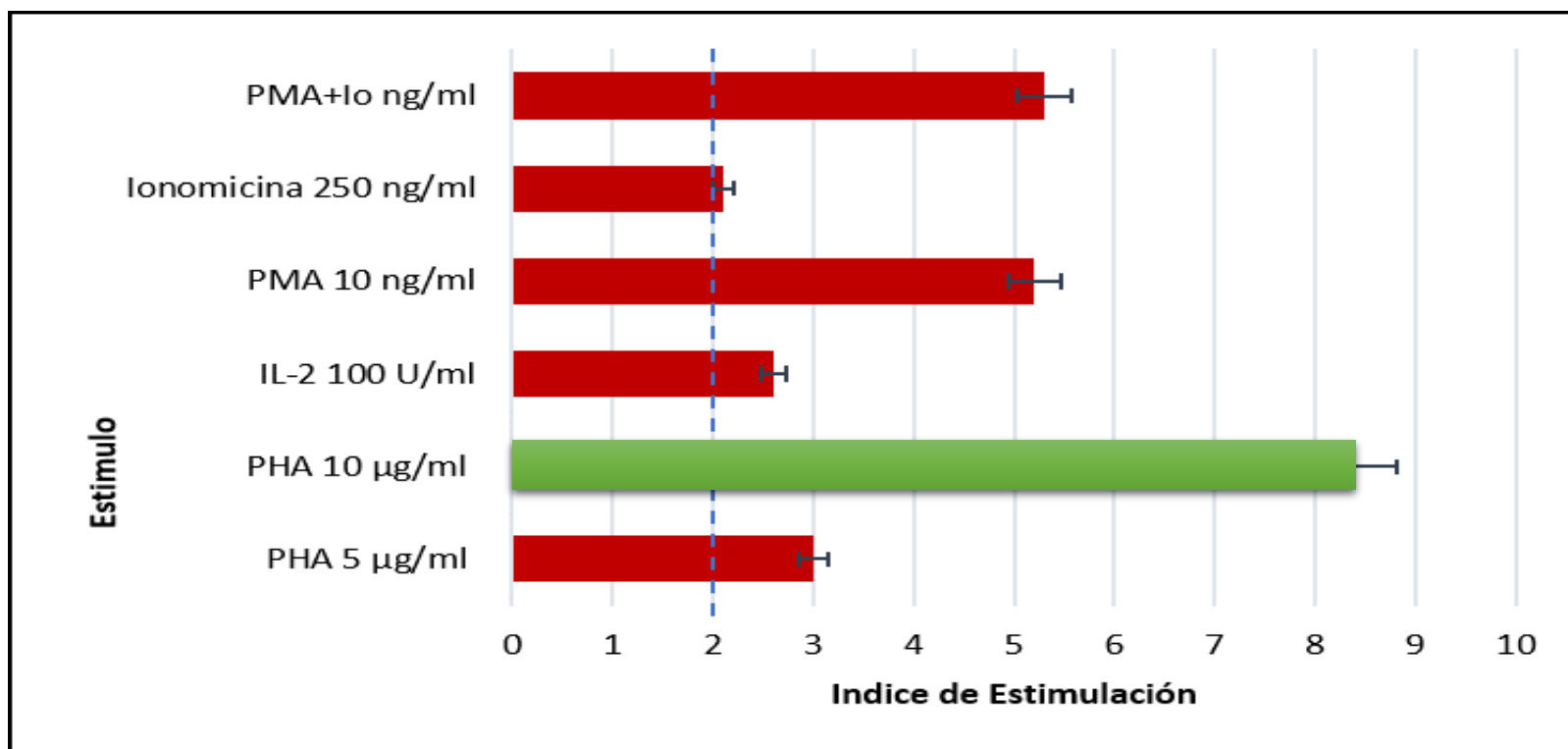
PROTEINA	PEPTIDO	SECUENCIA
Rv0180c	31024	<sup>41</sup> AALYLGGILNPMTNLRHFPI <sup>60</sup>
	31025	<sup>61</sup> ALVNEDAGPAGQQMDGLVSY <sup>80</sup>
	31028	<sup>121</sup> RDFGASAVTPTRTRDRPATI <sup>140</sup>
	31032	<sup>201</sup> KSTAYNPLPNGTGNGLSAFY <sup>220</sup>
	31039	<sup>341</sup> LGLPSAGATVPLEAVPAFFRY <sup>360</sup>
	31044	<sup>433</sup> EHQAQYQARQSARESSEQP
Rv0227	16945	<sup>281</sup> LKPEVTFADYQVTSTEETVE <sup>300</sup>
	16951	<sup>402</sup> AQPPPPPDAGHPDPGPPERRY <sup>421</sup>
Rv0679c	30987	<sup>146</sup> YKNGDPTIDNLGAGNRINKE <sup>165</sup>
Rv1268c	37964	<sup>21</sup> ANALGLASPADAAAGIMYGD <sup>40</sup>
Rv1411c	37096	<sup>181</sup> APPFATQVPVATWVQETGY <sup>200</sup>
Rv1490	11073	<sup>282</sup> FGRVESHADYHDWVCEHVP <sup>300</sup>
Rv1911c	37763	<sup>1</sup> MESPMTSTLHRTPLATAGLAY <sup>15</sup>
	37765	<sup>37</sup> YVPKATTVDATTPAPAAEPL <sup>56</sup>
	37767	<sup>77</sup> GANVAPPLTWSSPAGAAELAY <sup>95</sup>
Rv1980c	36827	<sup>42</sup> TQIQMSDPAYNINISLPSYY <sup>60</sup>
	31101	<sup>41</sup> CQIQMSDPAYNINISLPSYY <sup>60</sup>
	31107	<sup>161</sup> MQGELSKQTGQQVSIAPNAY <sup>180</sup>
Rv2004c	9111	<sup>261</sup> AGYAVRSGDTAPASLRDFYI <sup>280</sup>
Rv2270	37775	<sup>22</sup> TSSNGARGGIASSTNMNPTNPY
	37777	<sup>61</sup> ETWINLQVGDTLADLPPADLY <sup>80</sup>
	37780	<sup>121</sup> GFAPYTGQSVDTSPYSVAYL <sup>140</sup>
Rv2301c	30960	<sup>112</sup> CPNTRLVPGGYSLGAAVTDV <sup>131</sup>
Rv2560	11024	<sup>121</sup> VWALSDRATTAYTNTSGVSS <sup>140</sup>
Rv2707	16084	<sup>301</sup> RIGVGTTTYSSSTAQHSAAVAY <sup>320</sup>
Rv3166c	16295	<sup>181</sup> LITRRQRKSAPARISGORIY <sup>200</sup>
	16298	<sup>241</sup> MERELSHVPGVAPQDFDTPY <sup>260</sup>
	16300	<sup>281</sup> VSLFAEARFSPHMNEEHREY <sup>300</sup>
Rv3494c	38373	<sup>81</sup> HMRLNSGTAIPSNVTATVRSY <sup>100</sup>
Rv3629	16645	<sup>81</sup> VFPLAIMTTAGLDPVRAE <sup>100</sup>
	16646	<sup>101</sup> LALRPPAHGALEFADGSPSY <sup>120</sup>

*Péptidos sintéticos derivados de proteínas de M. tuberculosis H37Rv usadas en el estudio.*

# ENSAYOS PRELIMINARES UTILIZANDO MTT



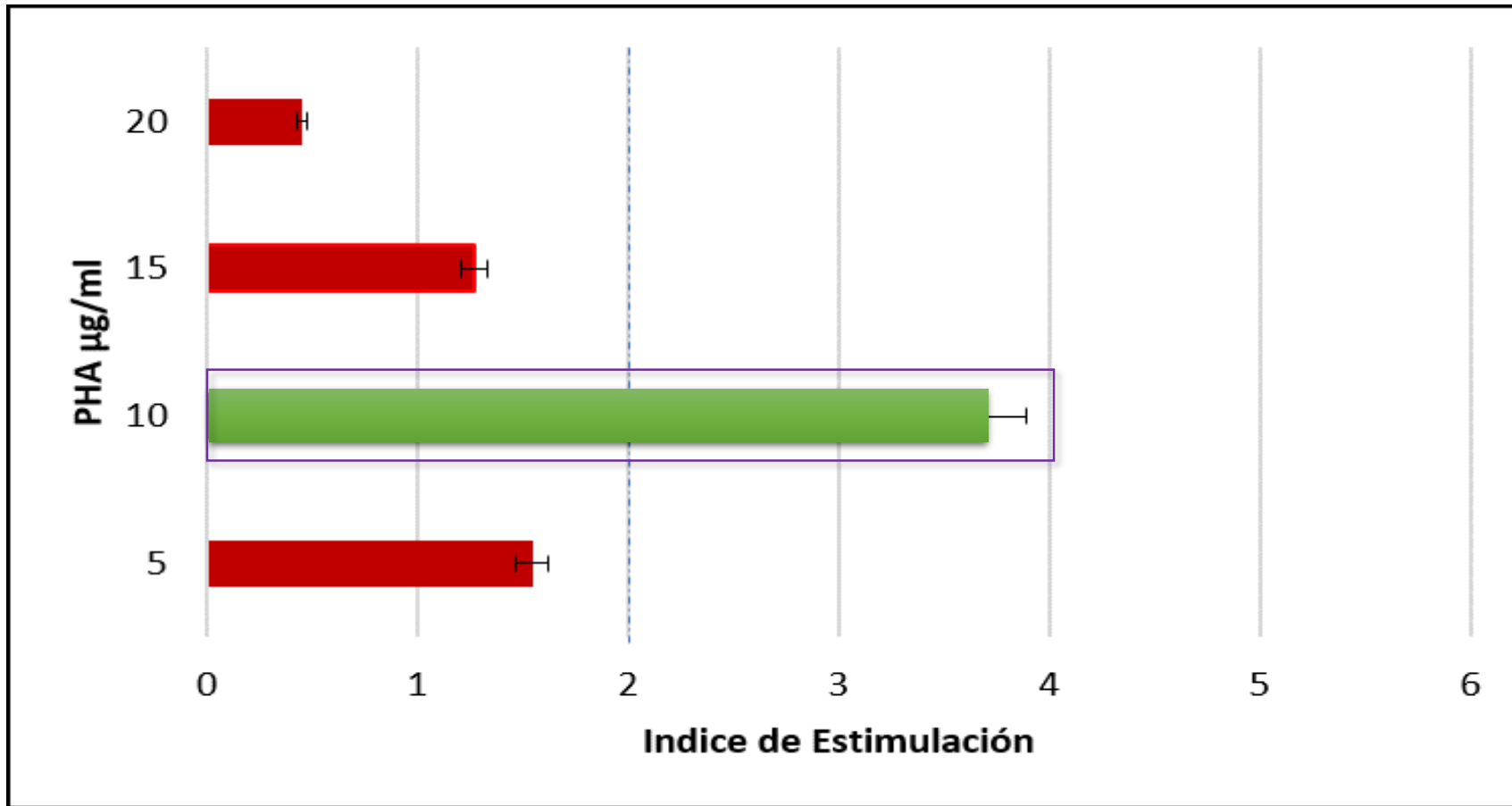
# ENSAYOS UTILIZANDO CFSE



Nguyen y col. 2003

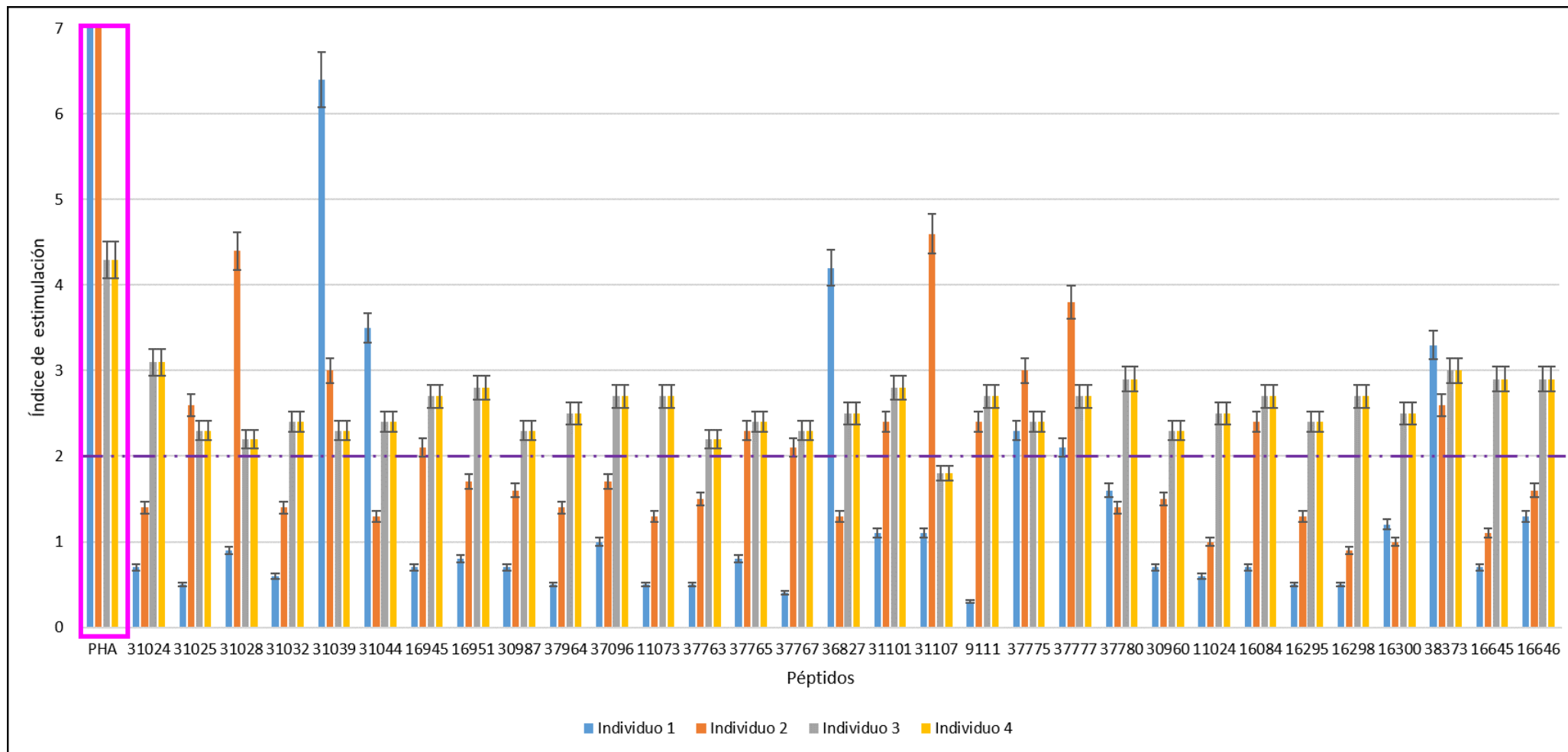
Quah y col. 2010

# ENSAYOS UTILIZANDO CFSE

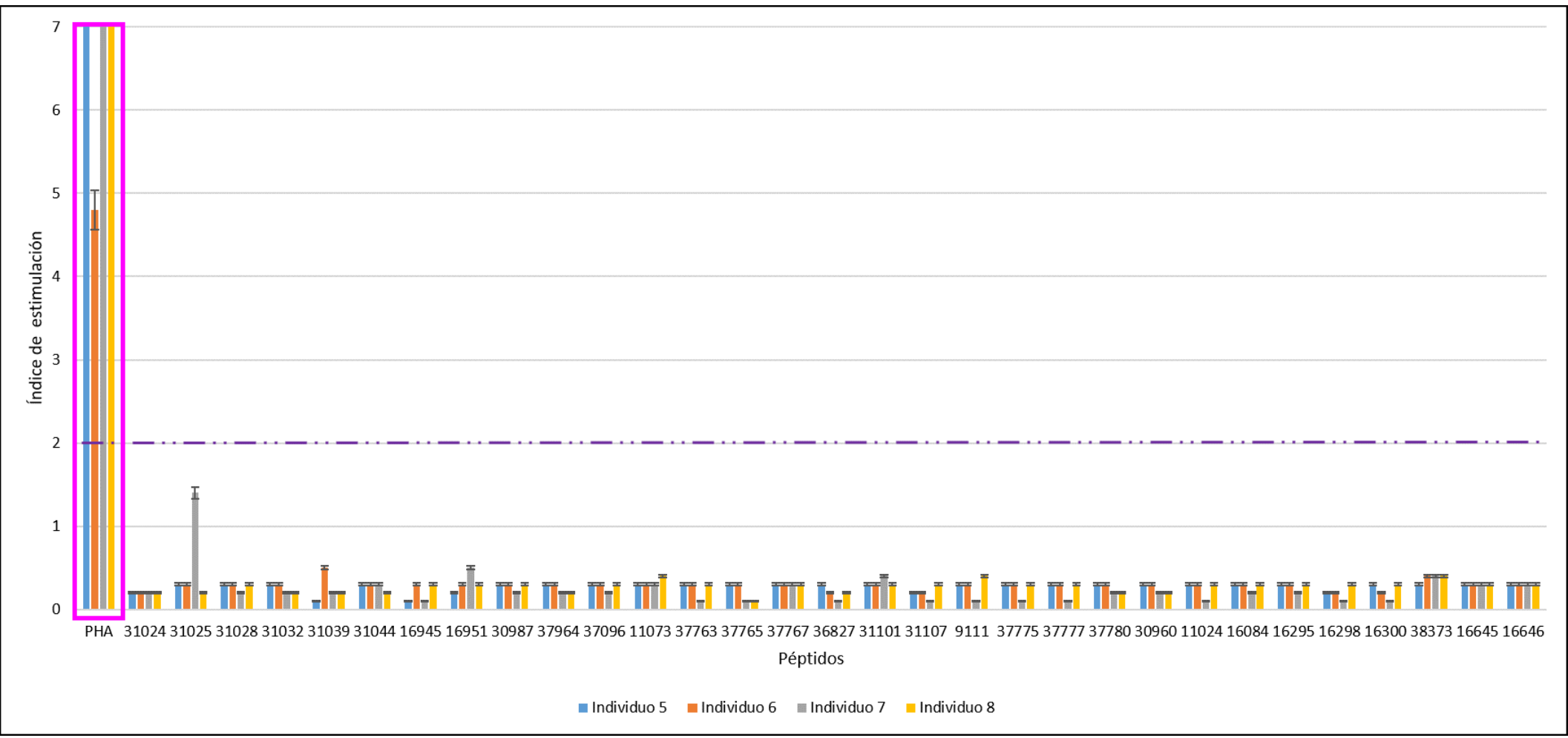


Ruiz y col. 2005

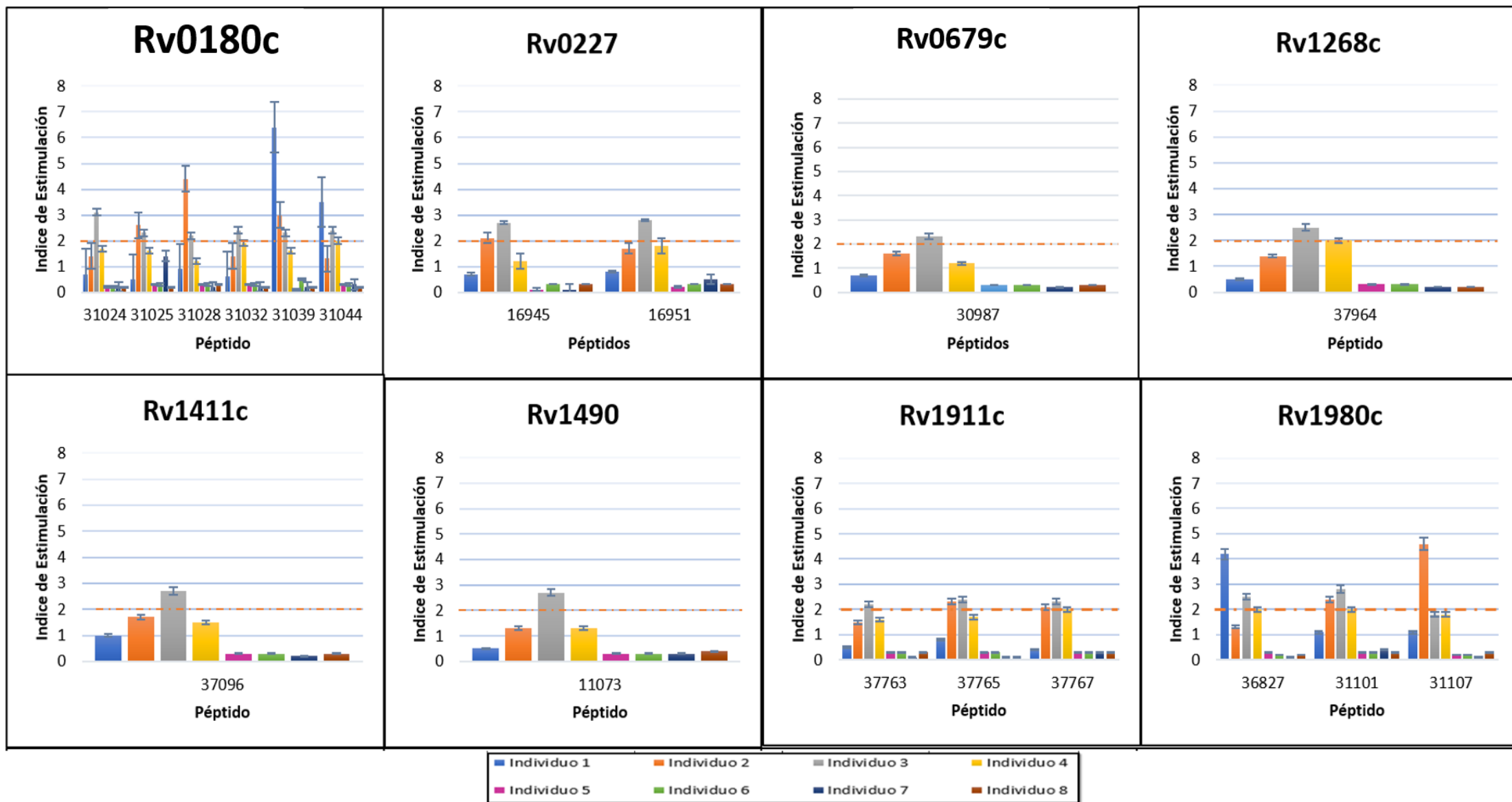
# RESPUESTA INMUNE ANTE ESTÍMULO DE PÉPTIDOS EN PBMC DE INDIVIDUOS SANOS QF+



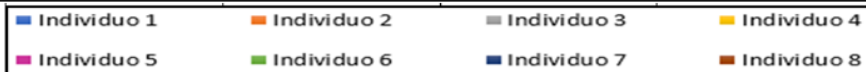
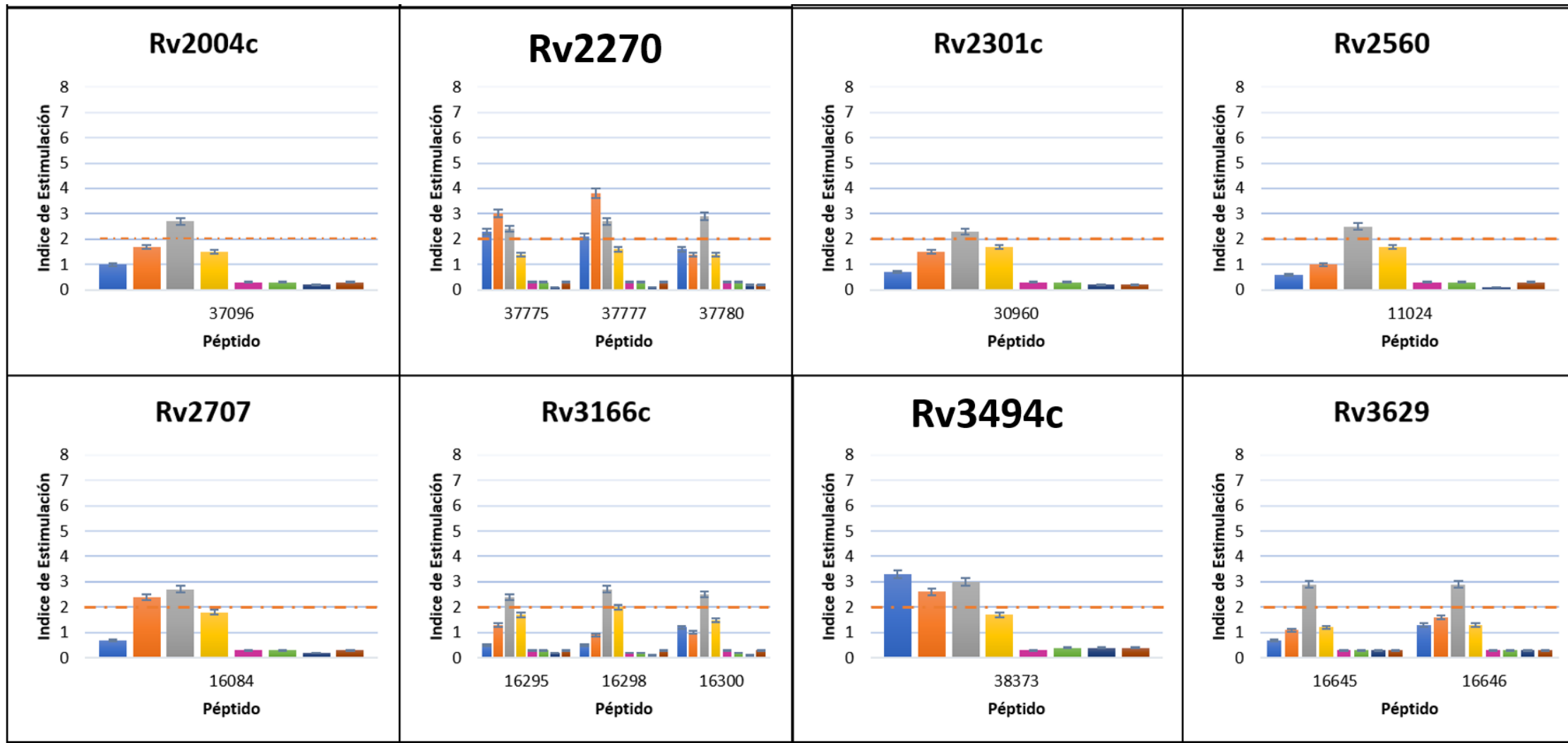
# RESPUESTA INMUNE ANTE ESTÍMULO DE PÉPTIDOS EN PBMC DE INDIVIDUOS SANOS QF-



# RESPUESTA INMUNE ANTE ESTÍMULO DE PÉPTIDOS



# RESPUESTA INMUNE ANTE ESTÍMULO DE PÉPTIDOS





De las 16 proteínas caracterizadas por la FIDIC, 31 péptidos sintéticos derivados de estas son de unión específica y a su vez tienen capacidad de inhibir la invasión a células blanco.

A pesar de que los 31 péptidos sintéticos derivados de las proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv inducen respuesta linfoproliferativa en PBMC de donantes sanos clasificados como QF+, solo los péptidos 31039 (Rv0180c), 37777 (Rv2270) y 38373 (Rv3494) presentan un IE  $\geq 2$  en PBMC de por lo menos 3 de los 4 individuos.

Ninguno de los péptidos seleccionados induce linfoproliferación en PBMC de ninguno de los donantes clasificados como Qf-, por lo cual se establece una posible técnica de diagnóstico para diferenciar pacientes que hayan tenido contacto con *M. tuberculosis* de pacientes que no.



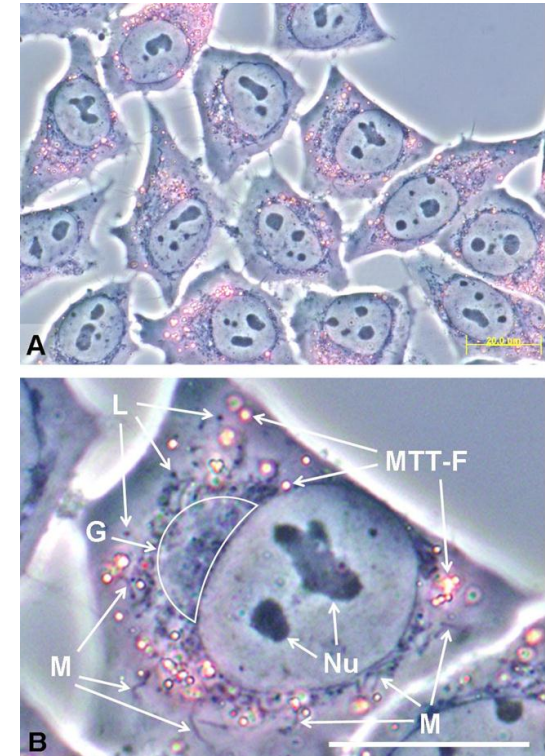
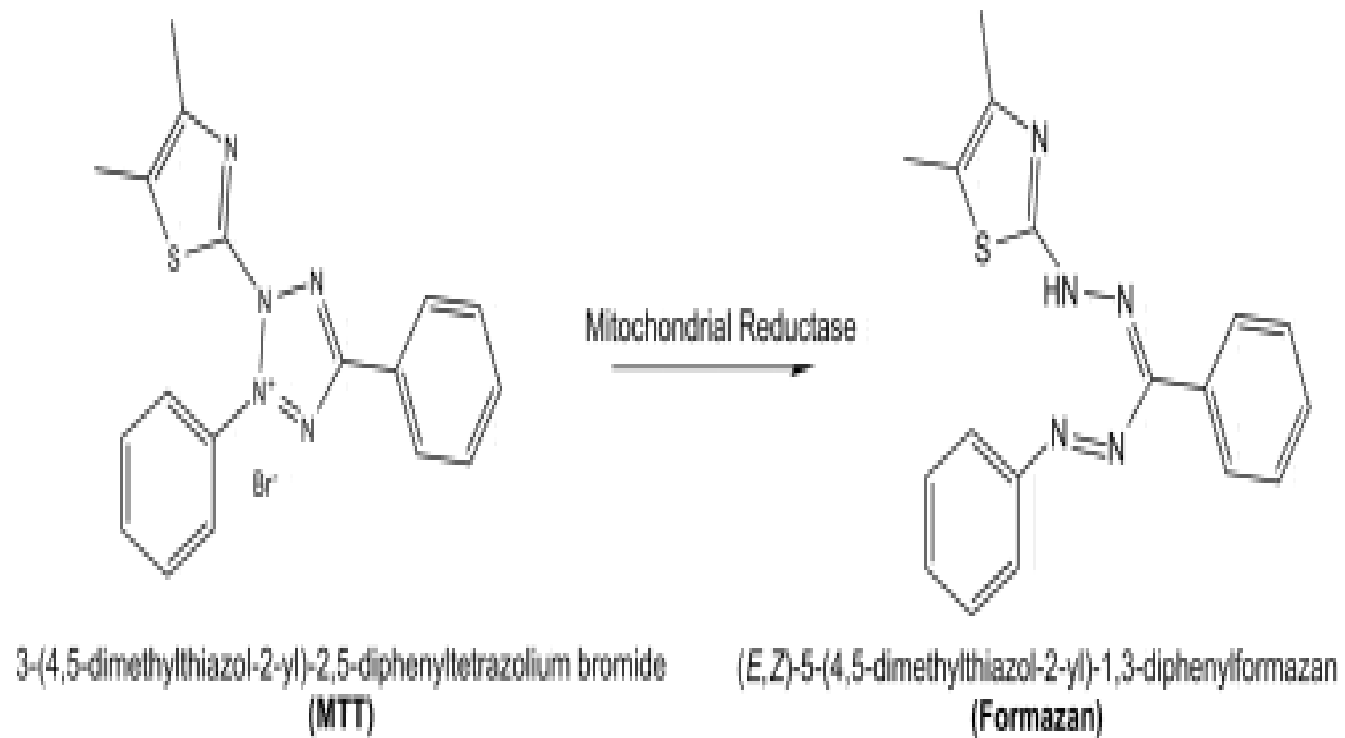
Determinar la respuesta inmune con la técnica de CFSE empleando como estímulo los péptidos 31039, 37777 y 38373 con una corte más grande de pacientes para corroborar su uso como posible técnica de diagnóstico la cual permita diferenciar pacientes que hayan tenido contacto con *M. tuberculosis* de aquellos pacientes que no.



Cuantificar las citocinas secretadas de sobrenadantes de ensayos con estímulo de péptidos sintéticos para determinar si existe un perfil relacionado con la linfoproliferación.

- *A Dios y la vida por las oportunidades, dificultades y bendiciones del día a día que hicieron de mí una mejor persona.*
- *A mi familia por su constante apoyo para mi crecimiento personal y profesional.*
- *A las Msc. Deisy Carolina Rodríguez y Msc. Edith del Carmen Hernández por su apoyo, confianza, sus sugerencias, correcciones, comentarios y valiosos aportes en el desarrollo de mi trabajo, por enseñarme no solo a ser profesional sino también a ser una mejor persona.*
- *A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia por abrir sus puertas y permitir que conociera el camino de la investigación.*
- *Al grupo funcional Tuberculosis, a la Dra. Marisol Ocampo Cifuentes, por ser mi ejemplo a seguir, Alejandra, Christian, Kewin y Mary por su acogida, apoyo y fomentar en mí el proceso interminable de la investigación.*
- *A los docentes de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, mi alma mater por el conocimiento adquirido, y la formación profesional y personal.*

# LINFOPROLIFERACIÓN MTT



# CALCULO INDICE DE ESTIMULACION CFSE

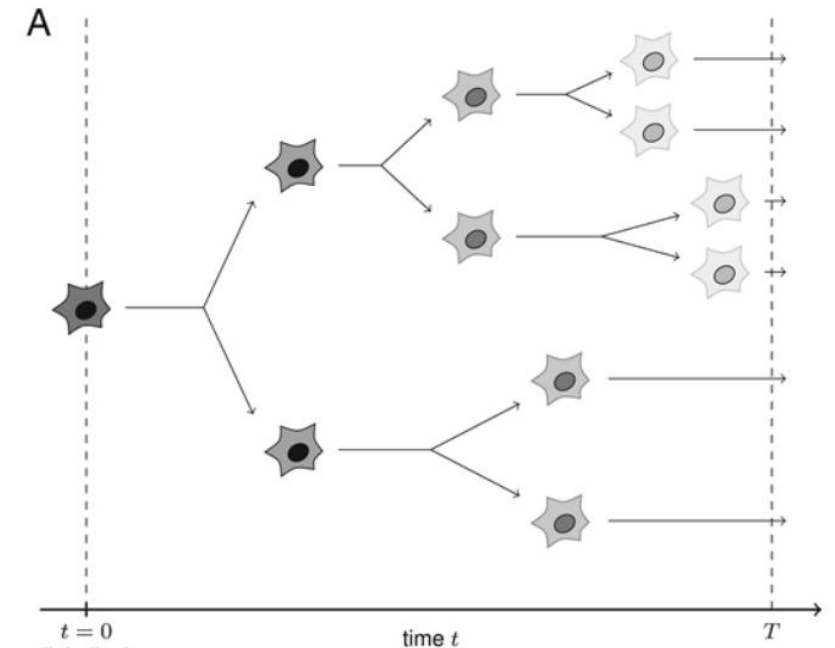
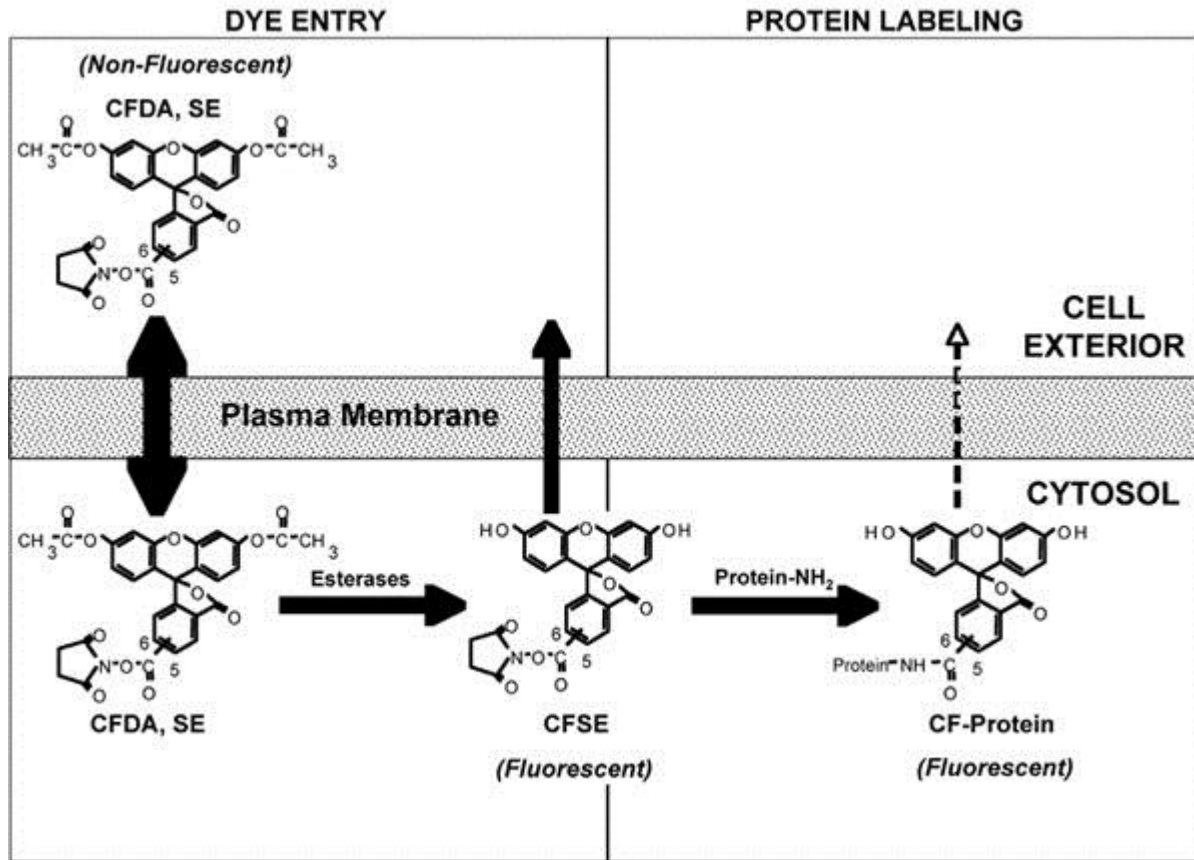
El porcentaje de proliferación de células T CD4+, se midió mediante la dilución del marcador CFSE, es decir que el índice de estimulación (SI), se determinó por la pérdida relativa de intensidad de fluorescencia, utilizando la siguiente fórmula:

**IF= (% de intensidad de fluorescencia de células con CFSE co-cultivadas con antígeno) / (% de intensidad de fluorescencia de células con CFSE co-cultivadas sin antígeno).**

La proliferación de linfocitos, se analizó en 7 picos o generaciones de células. G = generación. Se determinó un IS positivo igual o mayor a 2.0 (43). Para obtener el porcentaje de intensidad de fluorescencia de las células se calculó como:

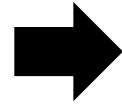
**IS=(Células diluidas (Generación1-Generación7)) / (Recuento de células totales (G0-G7)) \* 100**

# LINFOPROLIFERACIÓN CFSE



# Citometría de flujo

- Técnica
- Análisis celular individualizado
- Multiparamétrico



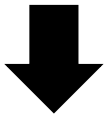
Partículas en suspensión



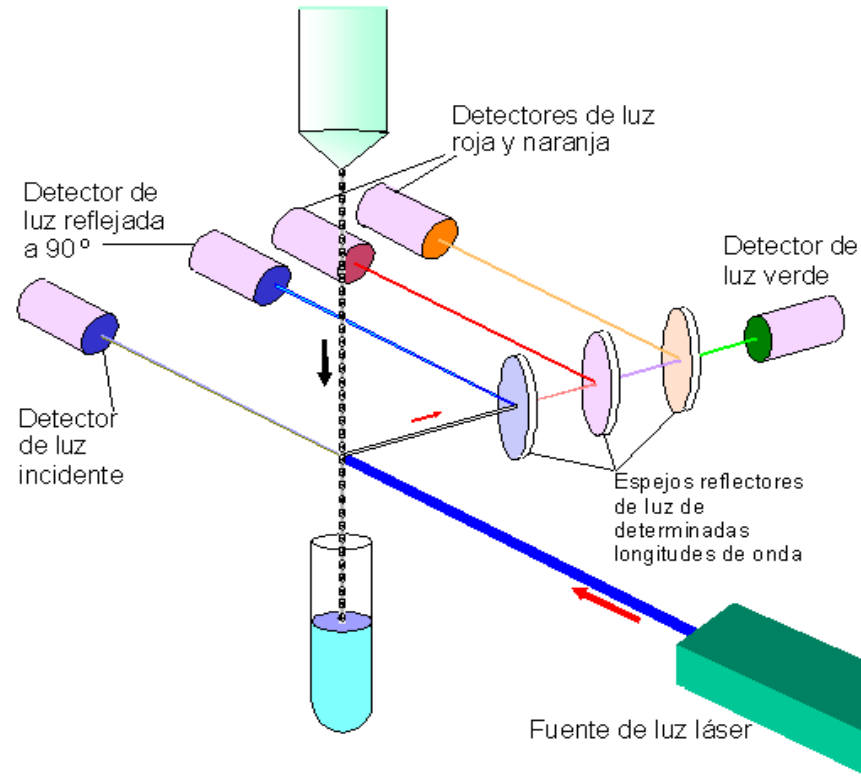
Parametros de medición



1. Sistema de fluidos
2. Óptica
3. Eléctrica
4. Software

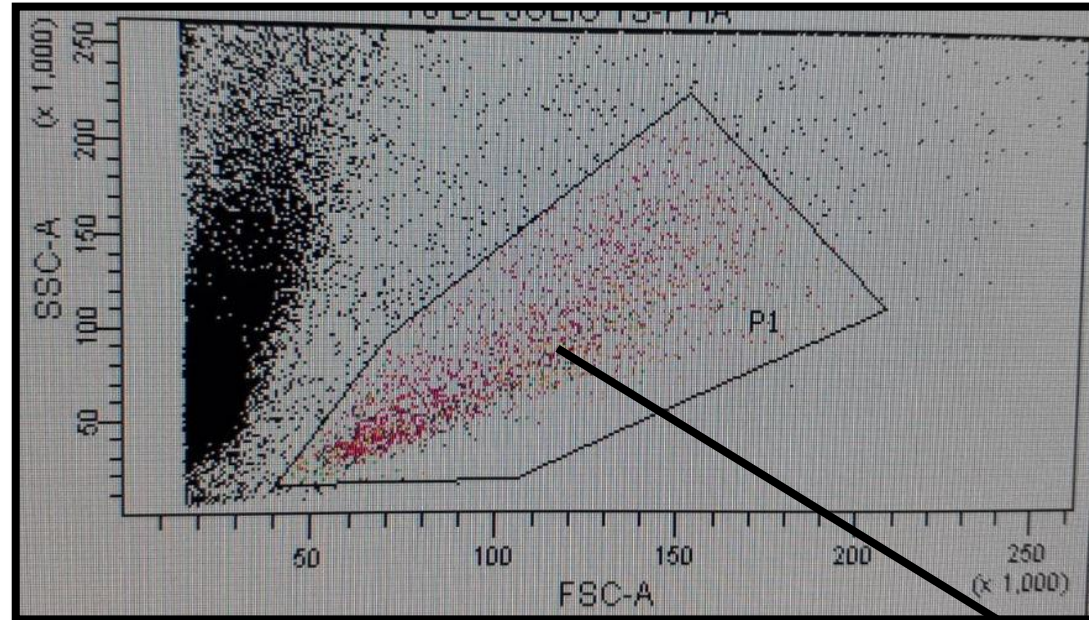


1. Tamaño (Forward scatter)
2. Complejidad (Side scatter)
3. Fluorescencia



# SELECCIÓN GATE POR CFSE

Es una técnica que permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células (habitualmente entre 5000 y 10000) que por tanto serán una muestra lo suficientemente representativa del conjunto poblacional. La suspensión de células en solución isotónica se hace pasar a través de un pequeño orificio de modo que cuando salen lo hacen una a una (en fila india) formando parte de una corriente continua o flujo cilíndric



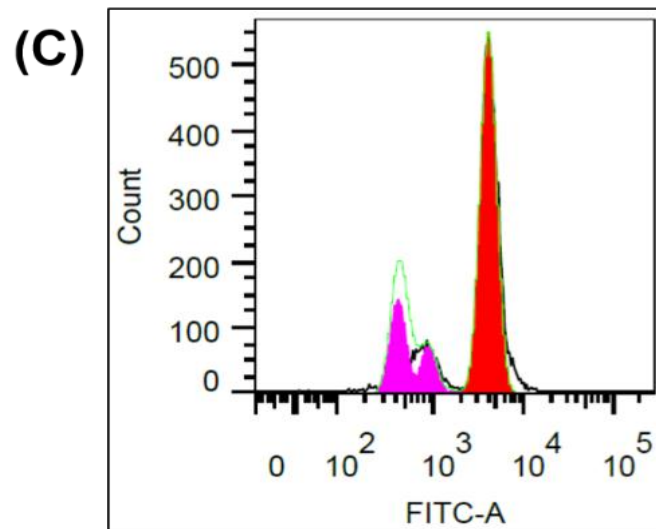
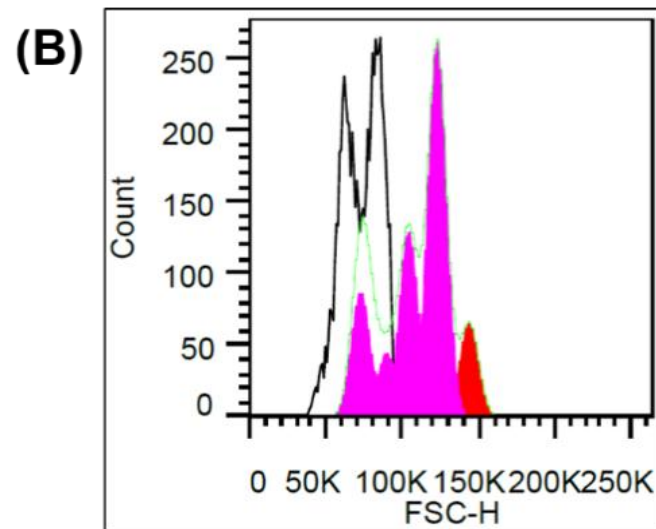
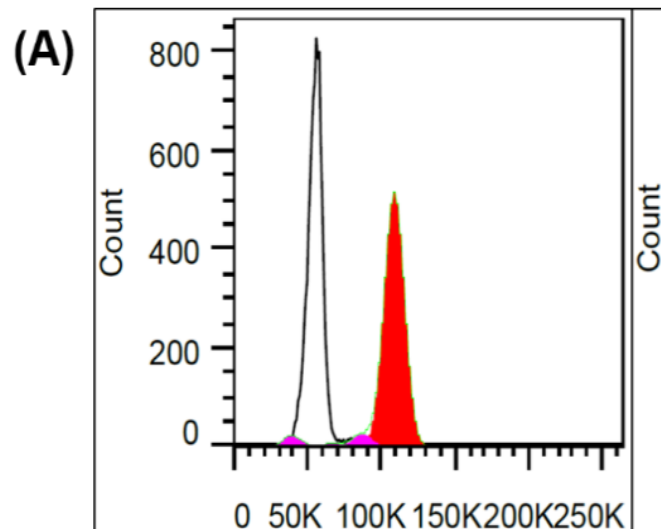
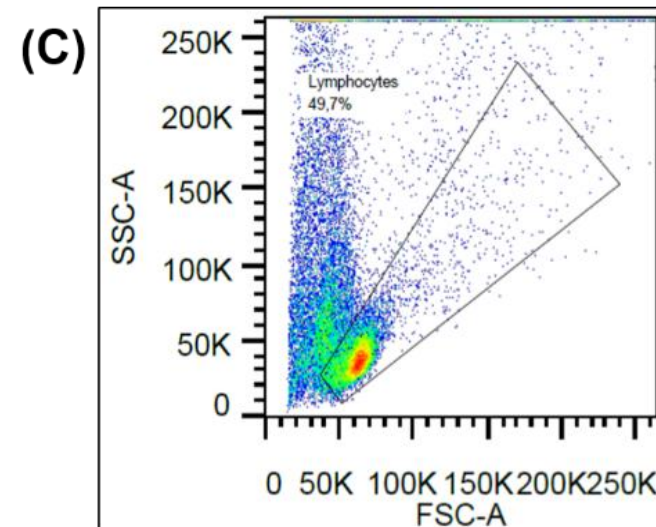
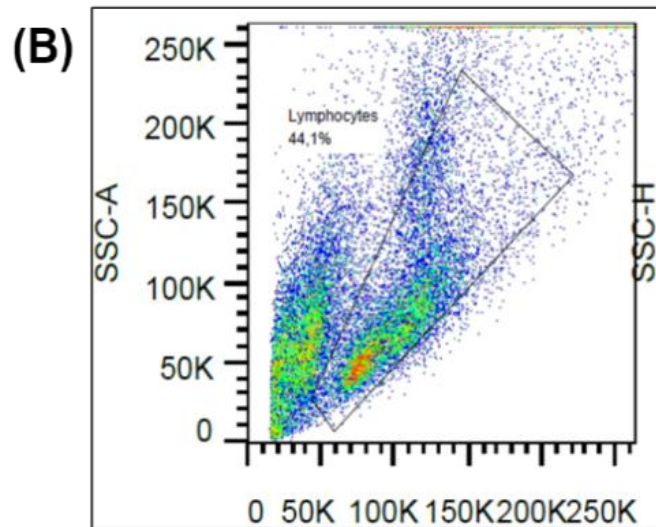
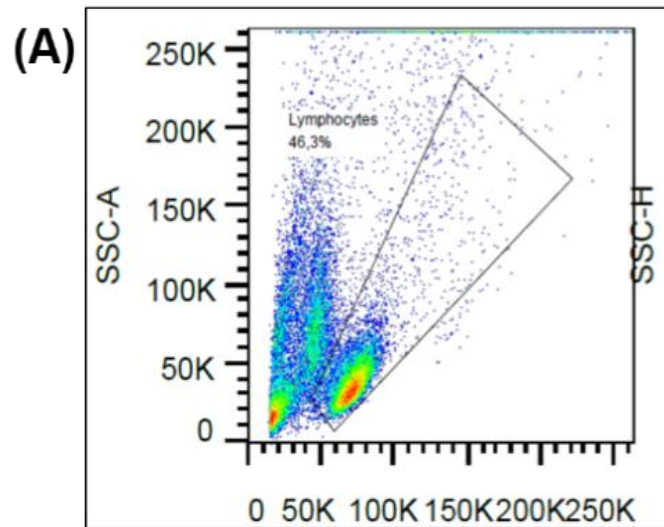
**Gate  
Linfocitos T**



# CONTROL CFSE

# PHA

# PÉPTIDO



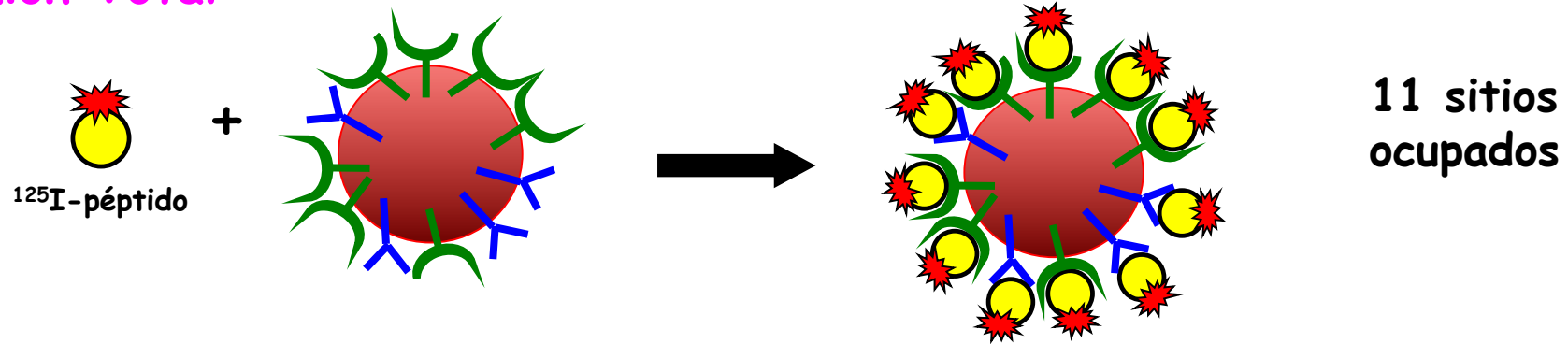


FIDIC

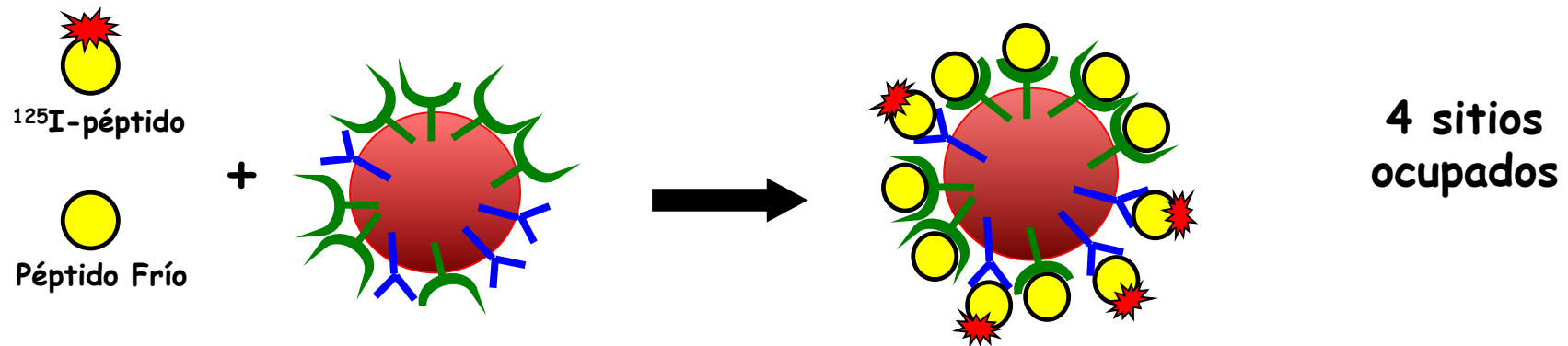
# GRUPO FUNCIONAL RECEPTORES

## Ensayo de unión

### Unión Total



### Unión Inespecífica



$$\text{Unión específica} = \text{Unión Total} - \text{Unión Inespecífica} = 7$$