

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL EFECTO ADYUVANTE DE CALRETICULINA SOBRE LA
INMUNOGENICIDAD DE LOS ANTÍGENOS Ag85B, ESAT-6, CFP-10 Y LA
PROTECCIÓN CONTRA EL DAÑO CAUSADO POR
*Mycobacterium tuberculosis***

Por:

M.C. SANDRA CECILIA ESPARZA GONZÁLEZ

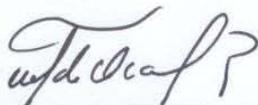
Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
Con Orientación Terminal en Morfología

Monterrey, N.L. Enero 2011

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y en el Departamento de Microbiología, Inmunología y Patología, CSU, bajo la dirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y la codirección del Dr. Ernesto Torres López y la Dra. Odila Saucedo Cárdenas.

**"ANÁLISIS DEL EFECTO ADYUVANTE DE CALRETICULINA SOBRE LA
INMUNOGENICIDAD DE LOS ANTÍGENOS Ag85B, ESAT-6, CFP-10 Y LA
PROTECCIÓN CONTRA EL DAÑO CAUSADO POR
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS"**

Aprobación de la Tesis:



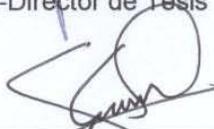
DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Director de Tesis



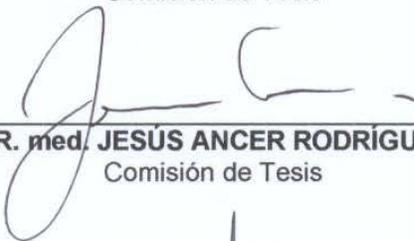
DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS
Co-Director de Tesis



DR. ERNESTO TORRES LÓPEZ
Co-Director de Tesis



DR. med. SANTOS GUZMÁN LÓPEZ
Comisión de Tesis



DR. med. JESÚS ANCER RODRÍGUEZ
Comisión de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
NOMENCLATURA	10
RESUMEN	12

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Incidencia de la Tuberculosis.....	14
1.2 Agente causal de la enfermedad.....	14
1.3 Patogénesis de la enfermedad.....	15
1.4 Respuesta Inmune.....	17
1.4.1 Respuesta Inmune Innata.....	17
1.4.2 Respuesta Inmune Adaptativa.....	19
1.5 Tratamiento.....	20

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1 Vacunas.....	21
2.2 Adenovirus.....	23
2.3 Calreticulina.....	24
2.4 Justificación.....	27
2.5 Hipótesis.....	28
2.6 Objetivo General.....	29
2.7 Objetivos Específicos.....	29

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estrategia Experimental para la obtención de los adenovirus recombinantes...	30
3.2 Transfección para la generación de los adenovirus recombinantes.....	32
3.3 Expresión de proteínas recombinantes.....	33
3.3.1 Inmunoelectrotransferencia (Western Blot).....	34
3.3.2 Inmunofluorescencia.....	34
3.4 Purificación de los adenovirus.....	35
3.4.1 Escalamiento de los adenovirus.....	35
3.4.2 Purificación con cloruro de cesio.....	35
3.4.3 Titulación viral.....	36
3.5 Respuesta inmune celular específica.....	37
3.5.1 Inmunizaciones.....	37
3.5.2 ELISPOT Interferón Gamma.....	37
3.5.3 ELISA Factor de Necrosis Tumoral.....	38
3.6 Infecciones con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Obtención de los vectores acarreadores pShuttle.....	39
4.2 Obtención de los vectores adenovirales.....	40

4.3 Transfección para la generación de los adenovirus.....	41
4.4 Evaluación de la funcionalidad de los adenovirus sintetizados.....	42
4.4.1 Expresión de proteínas recombinantes.....	42
4.4.1.1 Expresión de proteínas fusionadas a CFP10.....	42
4.4.1.2 Detección de proteínas mediante inmunofluorescencia.....	43
4.5 Evaluación de la inducción de la respuesta inmune generada por los adenovirus recombinantes.....	47
4.5.1 Titulación viral.....	47
4.6 Respuesta Inmune.....	48
4.7 Evaluación de la eficiencia de protección.....	53
CAPÍTULO V. DISCUSIONES.....	55
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	59
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Construcción de los vectores pShuttle.....	31
Tabla 2. Tratamientos empleados para los ensayos de respuesta inmune.....	37
Tabla 3. Títulos de los adenovirus recombinantes.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Participación de los Receptores en la infección de los adenovirus.....	24
2 Ensamblaje del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I.....	25
3 Esquema de la Construcción pAg85B-ESAT6-CFP10.....	30
4 Curva de Calibración de Estándares para la cuantificación de proteínas.....	33
5 Caracterización del vector pShuttle (pCRTAg85B-ESAT6-CFP10).....	39
6 Caracterización de los vectores acarreadores	40
7 Caracterización de los vectores virales	41
8 Identificación de la proteína CFP10 recombinante	42
9 Funcionalidad del virus recombinante AdCRTAg85B-ESAT6-CFP10.....	43
10 Funcionalidad de los virus recombinantes AdCRTAg85B-ESAT6, AdESAT-6 y AdCRT-ESAT6	44
11 Funcionalidad del virus recombinante AdCRTCFP10, AdCFP10 y AdCRTPSCFP10KDEL.....	45
12 Funcionalidad del virus recombinante AdCRTAg85B.....	46
13 Curva de Estándares de TNF- α	48
14 TNF- α producido en respuesta al reestímulo con ESAT-6.....	49
15 IFN- γ producido en repuesta al reestímulo con ESAT-6.....	50
16 TNF- α producido en respuesta al reestímulo con CFP10.....	51
17 IFN- γ producido en repuesta al reestímulo con CFP10.....	52
18 Niveles de UFC de <i>M.tuberculosis</i> en el bazo de ratones previamente inmunizados con adenovirus recombinantes.....	53
19 Niveles de UFC de <i>M.tuberculosis</i> en el bazo de ratones previamente inmunizados con adenovirus recombinantes.....	54

NOMENCLATURA

Ad	Adenovirus
Ag	Antígeno
BAAR	Bacilo ácido alcohol resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
°C	Grados centígrados
CAR	Receptor de Adenovirus coxsackievirus
CFP	Culture filtrate protein
CO ₂	Bióxido de carbono
CRT	Calreticulina
CsCl	Cloruro de Cesio
DDA	Dimethyldioctyldecyl Ammonium bromide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESAT	Early secreted antigenic target
FITC	Flourescein isothiocyanate
HEK	Human embryonary kidney
hr	Hora
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomanano
LB	Luria-Bertoni
MgCl	Cloruro de Magnesio
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ml	Mililitro
mg	Miligramo
µg	Microgramo
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ng	Nanogramo
NK	Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
OT	Tuberculina original
PA	Antígeno protector
pb	pares de bases

PBS	Amortiguador de fosfatos
PBT	Buffer de Fosfatos con Tritón
PPD	Derivado proteico purificado
RD	Región deletada
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
TAES	Tratamiento directamente supervisado
TB	Tuberculosis
TLR	Receptor de linfocitos T
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tris-HCl	Trizma-ácido clorhídrico
UFP	Unidades formadoras de placa
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

Sandra Cecilia Esparza González

Fecha de graduación, Enero 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del trabajo: ANÁLISIS DEL EFECTO ADYUVANTE DE CALRETICULINA SOBRE LA INMUNOGENICIDAD DE LOS ANTÍGENOS Ag85B, ESAT-6, CFP-10 Y SU PROTECCIÓN CONTRA EL DAÑO CAUSADO POR *Mycobacterium tuberculosis*

Número de Páginas: 50

Candidata para el grado de Doctor en
Ciencias con Orientación Terminal en Morfología

Área de estudio: Morfología

Objetivo y Método del estudio: Existe una necesidad por desarrollar una vacuna eficiente para controlar la diseminación de la infección de la Tuberculosis causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, debido a la protección ineficiente de la BCG. Se ha reportado que inmunizaciones con las proteínas inmunodominantes ESAT-6, CFP10 y Ag85B protegen contra la infección causada por *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo murino. Estudios previos han demostrado que Calreticulina incrementa la respuesta inmune mediada por células así como la respuesta humoral. En esta tesis se construyeron adenovirus deficientes en replicación que expresan las proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6, CFP10 y Ag85B fusionadas a Calreticulina. Inmunización de ratones con los adenovirus que expresan Calreticulina/ESAT-6 o la fusión de ESAT-6/CFP-10 mostraron una respuesta significativa de inducción de INF- γ y TNF- α específica de ESAT-6 en comparación con un adenovirus que expresa únicamente ESAT-6. Además se analizó la capacidad de estos adenovirus para proteger en contra de una infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo murino. Ratones inmunizados con los adenovirus que expresan Calreticulina/ESAT-6 o la fusión de ESAT-6/CFP-10 y retados con *Mycobacterium* mostraron un grado similar de infección que ratones inmunizados con un adenovirus que expresa únicamente ESAT-6 o un adenovirus control.

Contribuciones y Conclusiones: Se construyeron diferentes adenovirus recombinantes expresando antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* fusionados a calreticulina. Demostramos que la calreticulina ejerció un efecto adyuvante de la respuesta celular hacia dichos antígenos, sin embargo esta respuesta no fue suficiente para proteger contra la infección producida por *Mycobacterium tuberculosis*, bajo las condiciones que se describen en este trabajo de tesis.

DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Director de Tesis

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas que han afectado a la humanidad. Desde el siglo XVIII se logró identificar al bacilo de *M.tuberculosis* como el agente causal de esta infección. Este hallazgo permitió estudiar las características propias de la bacteria, así como su comportamiento en el transcurso de la enfermedad, permitiendo con ello desarrollar diferentes tratamientos para combatirla.¹

Un logro importante fue el desarrollo de la vacuna BCG (bacilo Calmette-Guerin) que desde 1921 ha sido utilizada como un método para prevenir la tuberculosis en niños. Su función se basa en establecer una respuesta inmune a través de la administración de *M.bovis* atenuado, el cual después de una serie de subcultivos perdió la región de su genoma que codifica para las proteínas que actúan como factores de virulencia.

Esta vacuna fue suficiente para controlar la tuberculosis en aquella época, sin embargo hoy en día se ha convertido en un problema de salud mundial. Una de las razones de esta problemática es debido a la variada eficiencia de la vacuna BCG que oscila entre 0 hasta 80%, esto dependiendo de diferentes factores tales como el tipo de cepa de *M.bovis* que se emplea para generar la vacuna, la aparición de cepas drogoresistentes o bien, si la persona vacunada ha tenido contactos previos con otras micobacterias no patógenas las cuales pueden bloquear la respuesta generada por la vacuna. Además, se han asociado algunos poliformismos y enfermedades como el VIH que hacen susceptibles a las personas a desarrollar este padecimiento. Por lo cual la incidencia de esta enfermedad ha ido en aumento y ahora se calculan alrededor de 8 millones de nuevos casos al año, teniendo una mortalidad de 2 millones de personas por año.^{2,3}

Debido al aumento de personas infectadas por *M.tuberculosis* la OMS declaró un estado de reemergencia de la enfermedad, razón por la cual diferentes fundaciones en todo

el mundo han subsidiado la investigación y el desarrollo de nuevas alternativas usando vacunas de DNA, proteínas recombinantes, adenovirus entre otras, en base a antígenos inmunodominantes para tratar la tuberculosis.^{4,5}

1.1 INDICENCIA DE TUBERCULOSIS

La tuberculosis es la segunda enfermedad infecciosa que causa la mayor mortalidad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima 80 millones de nuevos casos de tuberculosis en esta década. *M.tuberculosis* ha infectado a un total de 2 billones de individuos, los cuales representan una tercera parte de la población mundial. Presentando los países en desarrollo los mayores índices tanto de muertes así como de nuevos casos con alrededor del 95%.

La pandemia de tuberculosis continúa a pesar del programa que ha implementado la OMS para lograr la inmunización de la población con la vacuna de BGC y además del uso de quimioterapia una vez que se ha diagnosticado una tuberculosis activa.⁶

En México la tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública y es considerada como una zona endémica. Además se reportan aproximadamente 20,000 nuevos casos de tuberculosis al año que condicionan alrededor de 6,000 fallecimientos. En México se llevó a cabo un programa llamado tratamiento directamente supervisado (TAES) e internacionalmente DOTS (Directly Observed Treatment Short). Pero aún así han seguido reportando los decesos constantes debido a esta enfermedad. También ya se han reportado casos que presentan resistencia a algunos drogas por lo cual ha sido necesario realizar combinación de fármacos que se traduce en mayores gastos para el paciente así como el nivel de toxicidad en el tratamiento.³⁷

1.2 AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD

M.tuberculosis pertenece a la familia Mycobacteriaceae del orden de *Actinomycetales*. Es una bacteria que tiene forma de bacilo, no posee pigmentación y produce niacina y nitratos. Se caracteriza por dar positivo a la tinción de Gram, debido a la

gran cantidad de peptidoglicano presente en la pared celular. Además por su alta concentración de lípidos es clasificado como un bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR), puesto que no permite la decoloración con el alcohol-ácido.

Otra característica que presenta este patógeno es su propiedad de establecerse principalmente en los pulmones, esto a razón de que es una bacteria aerobia obligada, aunque también puede diseminarse en otras zonas del cuerpo como lo son hueso y las meninges pero son casos muy aislados. *M.tuberculosis* es un patógeno intracelular del cual ya se conocen algunos de los mecanismos que utiliza para penetrar a la célula huésped, donde lleva a cabo su duplicación. El crecimiento de esta bacteria es lento, dividiéndose solo cada 12 ó 24 horas, a esto se debe que las manifestaciones clínicas de la enfermedad tardan mucho tiempo en aparecer.⁷

La mayoría de la población que ha sido infectada por *M.tuberculosis* controla la infección y solo del 5-10% de esta población desarrolla una tuberculosis activa después de 2 años de haber sido expuesto. Sin embargo un alto porcentaje de individuos expuestos a la micobacteria son capaces de limitar su crecimiento pero no erradicándola por completo ya que debido a la necesidad de establecerse intracelularmente, la infección permanece en estado de latencia, manteniendo una propiedad de reactivación cuando haya una disminución en la repuesta inmune.

1.3 PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD

En base a estudios se sabe que la tuberculosis se desarrolla en las siguientes etapas: la primera etapa se inicia con la inhalación del bacilo de la tuberculosis, después los macrófagos alveolares ingieren al bacilo para destruirlo. La destrucción de las micobacterias depende de la propiedad microbicida de los fagocitos y además de la virulencia de la micobacteria ingerida. Cuando la micobacteria evade a este mecanismo, se multiplican hasta liberarse del macrófago.³⁸ En la segunda etapa monocitos y células inflamatorias son atraídos por liberación de factores quimiotácticos, a los pulmones donde permanece la infección. Las micobacterias empiezan a multiplicarse aritméticamente y ocurre un daño en el tejido pulmonar. Dos o tres semanas después de la infección se observa la participación de los linfocitos T antígeno-específico, los cuales al tratar de

erradicar a la micobacteria dan origen a las lesiones tempranas conocidas como granuloma. En la tercera etapa hay un crecimiento exponencial de las micobacterias, y para inhibir el crecimiento extracelular de la micobacteria hay necrosis en el granuloma. La cuarta etapa tiene lugar cuando la infección aún no ha sido controlada, con la formación del tejido fibroso alrededor del granuloma, esto con la finalidad de evitar que la infección sea diseminada a otros órganos.^{8,35}

Además en la patogénesis de la tuberculosis hay que considerar factores como la virulencia de *M.tuberculosis*, la inducción de la hipersensibilidad y la respuesta inmune entre otros. En cuanto a la virulencia de *M.tuberculosis*, posee un metabolismo lento ya que tarda en crecer de 7-15 días (debido a que su envoltura lipídica e hidrófoba dificulta la penetración de nutrientes) y esto se considera un factor de virulencia que les permite no ser detectadas por los macrófagos. Además no tiene o al menos no se le conocen factores clásicos de virulencia como la mayoría de las enfermedades causadas por patógenos bacterianos intracelulares, como por ejemplo la producción de exotoxinas, endotoxinas o enzimas necrosantes por lo que se considera que la respuesta inflamatoria del huésped tiene un papel fundamental en el daño tisular. La virulencia se determina en base a los estándares de mortalidad y morbilidad. Mortalidad es el porcentaje de animales infectados que muere y también se mide de acuerdo al tiempo que los animales tardan en morir una vez que son infectados. Morbilidad se mide a través de análisis histopatológicos, en estos estudios es importante determinar el tipo de cepa a tratar, puesto que se ha visto que algunas cepas mutantes como lo es *M.tuberculosis* sigH muestran un crecimiento y sobrevivencia normal en macrófagos, pero induce lesiones mucho menores en los pulmones comparada con las producidas por *M.tuberculosis* silvestre. Otro parámetro que usualmente se asocia a la virulencia de *M.tuberculosis* es la carga bacteriana que se localiza en pulmones y bazo, después de haber sido infectado con *M.tuberculosis*.⁹

Con respecto a la hipersensibilidad, ésta aparece entre la segunda y cuarta semana después de la infección. La hipersensibilidad causa el daño al tejido cuando no se ha logrado controlar la infección. La sensibilidad se mide a través de la prueba de la tuberculina. La prueba se puede aplicar utilizando el filtrado completo (OT) de medio de cultivo con crecimiento de *M.tuberculosis* ó bien con antígenos purificados (PPD). La inyección intradérmica conteniendo 1 µg/0.1 ml de la solución OT o PPD, respectivamente,

induce la migración de células sensibilizadas en el área de la inyección, donde se observará una lesión de induración de no menos de 1 cm de diámetro en un lapso de 48 hrs, en el caso de estar presente la infección. La hipersensibilidad controla el número de bacilos en el huésped, no los erradica y favorece la necrosis caseosa como un mecanismo de defensa, para inhibir el crecimiento bacilar.

La sensibilidad deriva en la respuesta inmune contra el bacilo de la tuberculosis y la evolución de la infección dependerá de la interacción entre éstas. La respuesta inmune humoral genera anticuerpos para múltiples antígenos, presentes en bajos títulos y estos no parecen influenciar en el curso de la enfermedad. En contraste con las células T sensibilizadas que proporcionan un incremento en la resistencia a la infección, en parte mediada por la liberación de citocinas que atraen a macrófagos y la activación de éstos al sitio de la infección.

1.4 RESPUESTA INMUNE

1.4.1 Respuesta Inmune Innata (no específica)

La inmunidad innata comprende mecanismos de defensa bioquímicos y celulares presentes incluso antes de que se produzca la infección. Las células del espacio alveolar que participan en la inmunidad innata son macrófagos alveolares, células dendríticas, células epiteliales, células alveolares del tipo I y II y factores solubles como mucina, lisozima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A2, inmunoglobulina (IgA) y proteínas del complemento (C3b), cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y la eliminación de partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio.

La presencia de *M.tuberculosis* en el espacio alveolar nos indica que ha superado la barrera mucociliar del tracto respiratorio; sin embargo, es aquí cuando se enfrenta a los macrófagos que constituyen la primera línea de defensa y este primer contacto es crucial ya que va definir el control de la infección o el desarrollo de la enfermedad. La fagocitosis de *M.tuberculosis* es principalmente llevada a cabo por los macrófagos a través de diversos mecanismos y es favorecida por el surfactante A producido por las células epiteliales alveolares tipo II ya que aumentan la interacción con la micobacteria.⁷

M.tuberculosis utiliza diferentes mecanismos para entrar a los macrófagos, empleando diferentes receptores como son: 1) CD14; 2) receptores para Fc cuando la micobacteria ha sido opsonizada con anticuerpos; 3) receptores de complemento, ya que *M.tuberculosis* puede activar la vía alterna del complemento y si la superficie de las micobacterias ha sido completamente cubierta con los factores C3b y C3bi puede ser fagocitada por los macrófagos a través de los receptores CR1 y CR3/CR4 (en ausencia de estos factores, un componente de la superficie de *M.tuberculosis* muy parecido a C4 puede unirse directamente a C2a para formar C3 convertasa que actúa sobre C3 y produce C3b que se une a la superficie de la micobacteria y facilita la unión con CR1); 4) receptores de manosa que interaccionan con lipoarabinomanana, que es un abundante componente de la pared celular de la micobacteria; 5) receptores scavengers se unen a *M.tuberculosis* a través de sus sulfatidos y 6) receptores para el surfactante A, ya que la proteína surfactante A se une a otra proteína presente en la pared celular de la micobacteria.

Algunos componentes de la micobacteria (arabinogalactanas, peptidoglicanos, LAM, proteínas) pueden interaccionar con los Receptores Toll/TLR2/TLR4 de los macrófagos e inducir la producción de IL-1b y TNF- α .¹⁰

La ingestión de *M.tuberculosis* por los macrófagos activa la vía NF- κ B, esta vía promueve la activación transcripcional de numerosos genes del macrófago, incluyendo aquellos que codifican para citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 y IFN- γ así como también quimiocinas entre las cuales se encuentran IL-8, MCP-1 y RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted). Los macrófagos responden a la infección iniciando una respuesta inflamatoria necesaria para el reclutamiento de leucocitos en el sitio de la infección. Esta respuesta es generada con la finalidad de controlar el crecimiento de la micobacteria.

Durante la fagocitosis, la micobacteria es incluida en un fagosoma que a su vez se fusiona con los lisosomas para formar un fagolisosoma, en donde enzimas lisosomales son las encargadas de destruir y delimitar la duplicación bacteriana. Algunos de sus antígenos son procesados y presentados a linfocitos T CD4+ (MCH II) y CD8+ (MCH I), por lo que los macrófagos además de ser células efectoras funcionan como células presentadoras de antígenos y pueden definir el curso de la respuesta de inmunidad celular (Th1 o Th2). La activación de inmunidad adaptativa es determinante, ya que *M.tuberculosis* tiene la

propiedad de evadir la digestión enzimática ejercida por el lisosoma evitando la formación del fagolisosoma y así mantener su supervivencia.¹¹⁻¹³

1.4.2 Respuesta Inmune Adaptativa (específica)

La respuesta inmune de adaptación se caracteriza por su especificidad establecida por distintas células que liberan moléculas con la propiedad de inducir memoria inmunológica para responder con más intensidad a la exposición a repetidas exposiciones de un mismo microorganismo. El desarrollo de una inmunidad adaptativa depende de la eficiencia de los macrófagos para controlar la infección, puesto que si no es así, se favorece a la respuesta inmune humoral, desarrollando una respuesta timo independiente, esto es en ausencia de la participación de los linfocitos T. La respuesta humoral esta mediada por anticuerpos, que reconocen mecanismo extracelulares y sus toxinas, por esta razón no es protectora contra la tuberculosis. La reactivación de macrófagos y células dendríticas por micobacterias, inducen síntesis de citocinas como la IL-12, TNF- α , IL-18 y la IL-15 que activan a los linfocitos T para desencadenar una respuesta inmune celular con el objetivo de destruir patógenos intracelulares como lo es *M.tuberculosis*.

La IL-12 es de suma importancia en el control de la infección, ya que se le considera que es la clave que conecta a la inmunidad innata y la celular. Esto es en base a las diferentes funciones que desempeña, tales como: inducir la producción de IFN- γ por los linfocitos T CD4+, CD8+ y las células NK, incrementar la proliferación de linfocitos T CD4+, y aumentar la citotoxicidad de los linfocitos CD8+ y las células NK.

La inmunidad celular es inducida cuando los linfocitos T CD4+ reconocen los determinantes antigénicos de *M.tuberculosis* presentados por los macrófagos en el contexto de las moléculas MHC II. Estos determinantes antigénicos provienen de la degradación proteolítica que precedió en el fagosoma, el cual constituye el hábitat favorable a la micobacteria, al mismo tiempo que tienen fácil acceso a la vía de las moléculas MHC II, de manera que pueden ser acoplados y presentados a los linfocitos T CD4+. Finalmente los linfocitos TCD4+ al activarse inician la fase inductora, la cual es la liberación de moléculas inmunoregulatoras de la infección, en el cual una de ellas y de gran importancia es la síntesis de IFN- γ , una citocina que tiene la propiedad de incrementar la función microbicida de los macrófagos.

Por otra parte y como mecanismo de amplificación de la respuesta inmune celular, los linfocitos CD4+ y las células NK, forman una fuente importante de IFN- γ la cual constituye los linfocitos T CD8+, y reconocen antígenos micobacterianos en el contexto de moléculas MHC I. Los linfocitos T CD8+ contribuyen para controlar la infección a través de diferentes mecanismos; el primero debido a que tienen funciones citotóxicas sobre las células infectadas dependiente de sus gránulos, como primer paso se lleva a cabo el reconocimiento entre los receptores de las células CD8+ y los antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos a través de las moléculas MHC I lo que lleva a la activación del linfocito, que desencadena la producción de IFN- γ , además la síntesis y producción de gránulos que son secretados al espacio intercelular y que, posteriormente, entran a la célula infectada para ejercer su acción citolítica. En los gránulos se encuentran proteínas importantes como las perforinas, las cuales forman trímeros que se insertan en la membrana y facilitan la entrada de las granzimas y granulinas; a estas últimas se les ha asignado el rol de ser las responsables de la muerte de *M.tuberculosis* al actuar directamente sobre los lípidos en la pared de la micobacteria.^{8,13,14,36}

1.5 TRATAMIENTO

Los tratamientos que son empleados en la actualidad para combatir esta enfermedad son en base a las combinaciones de medicamentos como rifampicina, isoniazida y pirazinamida, esto es debido a la múltiple resistencia que presentan las micobacterias a las drogas y que algunas de estas resistencias han sido adquiridas por mutaciones como es el caso de *kat-G*. Por otro lado estos tratamientos son indicados por períodos muy largos de hasta 6 meses, porque así como la micobacteria presenta un crecimiento lento desafortunadamente su muerte también se rige bajo este parámetro.³⁴ Existen algunos estudios donde el empleo de fármacos aunado a quimioterapia es efectivo para curar la enfermedad, pero desafortunadamente el tratamiento es caro y muy largo, además de favorecer a mutaciones las cuales pueden generar nuevas cepas resistentes a otros fármacos. Por esta razón se han desarrollado nuevas vacunas para tratar de disminuir los índices de mortalidad a causa de esta enfermedad.¹⁵

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 VACUNAS

El bacilo de Calmette-Guérin (BCG) se obtuvo a partir de una cepa virulenta de *M.bovis* aislada de una vaca con mastitis tuberculosa. Calmette y Guérin subcultivaron el organismo cada semana en un medio de papa glicerinada. La cepa que creció en ese medio se inyectó con regularidad en animales; para su sorpresa, la cepa perdió su virulencia luego del décimo quinto pasaje y no provocó lesiones en los conejos, cobayos y terneros en quienes se administró.

En 1921 después de 13 años del cultivo inicial y con 230 pasajes, BCG había perdido su virulencia en animales. La primera que se aplicó en humanos fue en julio de 1921, en un recién nacido cuya abuela padecía tuberculosis. Desde entonces se han administrado más de 3,000 millones de dosis en el mundo. La cepa original de BCG ha producido cientos de cepas “hijas” y es el progenitor de las vacunas mayormente empleadas. Esta repetición de subcultivos mostró el mismo comportamiento inicial de mutaciones, las cuales generaron marcadas diferencias entre ellas y con esto una variabilidad en su eficiencia.¹⁶

Una de las hipótesis que se han propuesto para explicar los diferentes niveles de eficacia de esta vacuna, es que una infección con una micobacteria no inductora de tuberculosis, confiere una respuesta inmune que interfiere disminuyendo la respuesta inmune desarrollada por la vacuna BCG. Esto se demostró en pruebas realizadas en áreas

donde las micobacterias no inductoras de TB eran prevalentes, dando como resultado una baja eficacia de la vacuna.

Aunado al fenómeno de eficiencia de la vacuna, el problema se agudiza puesto que la vacuna está contraindicada en pacientes con HIV/SIDA, recién nacidos con peso menor de dos kilogramos, pacientes inmunocomprometidos que presenten alguna afección cutánea grave, aquellos que estén sometidos a algún tratamiento prolongado con esteroides o drogas inmunodepresoras y enfermedades infecciosas, como sarampión y varicela, además de embarazadas y personas con la prueba PPD positivo, como es el caso de los pacientes con problemas neumológicos.

Debido al aumento en el índice de personas infectadas con tuberculosis así como a la variada eficiencia que se reporta de la vacuna BCG y a sus contraindicaciones, se presenta la necesidad del desarrollo de nuevas vacunas más efectivas.

La nueva generación de vacunas se ha diseñado en base antígenos inmunodominantes de *M.tuberculosis*. Entre los más utilizados son el complejo Ag85, ESAT-6, TB10.4, Mtb39 y Mtb32.¹⁷

ESAT-6, CFP-10 y TB10.4 son miembros de la familia ESAT-6, la cual está formada por pequeñas proteínas de secreción que se encuentran en los filtrados de cultivo de *M.tuberculosis*. Estas proteínas son antígenos inmunodominantes que reaccionan con el suero de la mayoría de los pacientes con tuberculosis. En los análisis genómicos comparativos entre *M.tuberculosis* y *M.bovis* avirulento, se muestra que ESAT-6, CFP-10 y TB10.4 se encuentran en una región llamada RD1, la cual está ausente en *M.bovis* avirulento, por lo cual se ha asociado la expresión de estos genes con la virulencia de *M.tuberculosis*. Se ha probado que estos antígenos tienen un efecto de protección contra la tuberculosis estimulando una respuesta inmune. En esta protección se han visto involucrados los linfocitos T CD8+ como los CD4+.¹⁸

Otro de los antígenos inmunodominantes que han sido empleado para promover una respuesta inmune contra la tuberculosis, es el complejo Ag85 que está formado por 3 genes (Ag85A, Ag85B, Ag85C) que codifican para enzimas micolil-transferasas, cuya función es transferir cadenas largas de ácidos micólico a derivados de trehalosa, además de que estas proteínas pueden también unirse a la fibronectina de la matriz celular.¹⁹ Utilizando estos

antígenos de *M. bovis* como vacuna se observa una limitada o parcial protección contra la tuberculosis en modelos animales.²⁰⁻²²

La fusión de los antígenos Mtb39 y Mtb32, generando la proteína recombinante Mtb72F, que también ha sido probada como vacuna, tiene un efecto de protección por inducción de la respuesta inmune. Actualmente el recombinante Mtb72F preparado con el adyuvante AS02A está propuesto como un candidato en inmunoterapia de fase clínica I, haciendo de éste la primera vacuna recombinante contra la tuberculosis probada en humanos, a la fecha no se reportaron eventos adversos en la aplicación de ésta.^{23,24}

Así mismo se han creado BCG recombinantes que expresan algunos de los antígenos de *M.tuberculosis*.

Las vacunas que han presentado los mejores resultados en modelos animales son la fusión de las proteínas Ag85B y ESAT-6 teniendo varias presentaciones de esta vacuna ya en evolución en fases clínicas. Se han utilizado diferentes sistemas para la generación de vacunas mediante la expresión de los antígenos descritos, esto a través de vectores adenovirales, cepas recombinantes que sobreexpresan los antígenos, proteínas recombinantes y vacunas de DNA entre otros.

Los vectores adenovirales son un sistema ampliamente utilizado para la generación de vacunas contra diferentes padecimientos. Por ejemplo contra la tuberculosis, actualmente se encuentra en fase clínica I la vacuna Aeras 402, la cual se basa en la expresión de los antígenos Ag85A, Ag85B y TB10.4 a través del adenovirus tipo35.²⁵⁻²⁷

2.2 ADENOVIRUS

Los adenovirus son virus no envueltos con un genoma de DNA de doble cadena, de los cuales se conocen al menos 50 serotipos de adenovirus. Estos se han asociado con diferentes enfermedades oculares, digestivas y del tracto respiratorio.

Los estudios que se han realizado de la estructura, biología celular y molecular de los adenovirus han permitido el desarrollo de vectores adenovirales recombinantes, utilizados en la terapia génica *in vivo*. Para tener un control sobre estos adenovirus recombinantes se les han quitado los genes de replicación. Las ventajas que ofrecen estos vectores son: eficiencia para infectar células animales, la expresión de múltiples genes,

permitir una alta expresión de la proteína recombinante (arriba del 35% de la producción total de proteínas).

Para expresar la proteína recombinante, primero necesita el adenovirus entrar a la célula. Ya se han descritos algunos de los mecanismos que utiliza el adenovirus para internalizarse en la célula, en este proceso participan receptores celulares como CAR (Receptor de Adenovirus coxsackievirus) que tiene afinidad por las proteínas IV (fibra) del adenovirus. Las integrinas son otro método de internalización del adenovirus, ya que se unen a las proteínas RGD que se localizan en la base del penton del adenovirus (Figura 1).

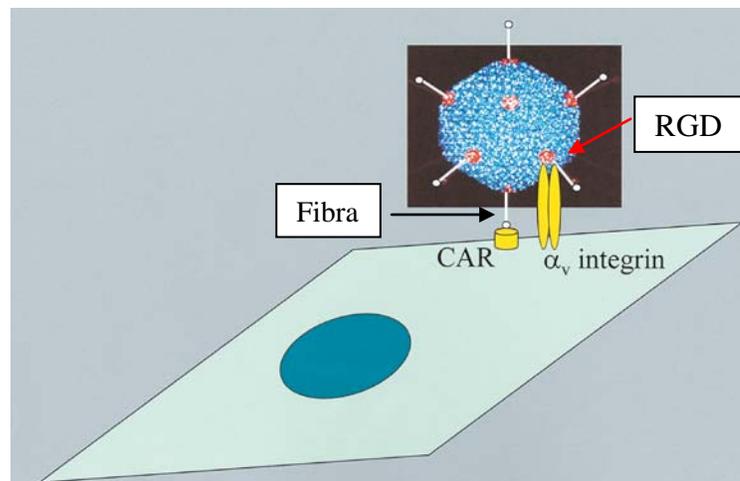


Figura 1. Participación de los receptores en la infección de los adenovirus.

Ya se tienen vacunas de adenovirus recombinantes contra diferentes padecimientos como lo es el SIDA, cáncer cérvico uterino, malaria, incluso la misma tuberculosis como previamente se mencionó.

Sin embargo en un afán por mejorar la eficiencia de estas vacunas, se han realizado estudios utilizando diferentes potenciadores de la respuesta inmune entre los más comunes, la interleucina 12 (IL-12), DDA, AS02A, AS01B y la fusión de genes a calreticulina. Como es en el caso de estudios del cáncer cérvico uterino, donde se ve un efecto de regresión tumoral usando una vacuna adenoviral que expresa E7 siempre y cuando esté fusionada a calreticulina.

2.3 CALRETICULINA

El gen de calreticulina consiste en 9 exones y 8 intrones, mide aproximadamente entre 3.6 kb y 4.6 kb en el genoma de humano y ratón. En el humano se localiza en el cromosoma 19. La proteína pesa 40 kDa, teniendo en su extremo amino un péptido señal y una señal de retención a retículo endoplásmico (RE) en el carboxilo terminal, las cuales son responsables de que la calreticulina se dirija y sea retenida en el lumen del RE. A este dominio se le une calcio, el cual impide la interacción de calreticulina con algunas chaperonas.³⁰

Calreticulina participa en diversas funciones celulares, entre las más destacadas se encuentra la de mantener en homeostasis los niveles de calcio y su función como chaperona. Como chaperona ayuda al ensamblaje correcto de las proteínas entre las cuales se encuentran las moléculas de clase I (Figura 2).³¹

La calreticulina ha cobrado gran importancia en la generación de vacunas, la cual se ha demostrado que es un potenciador de la repuesta inmune, esto a través de su interacción con las moléculas de clase I.

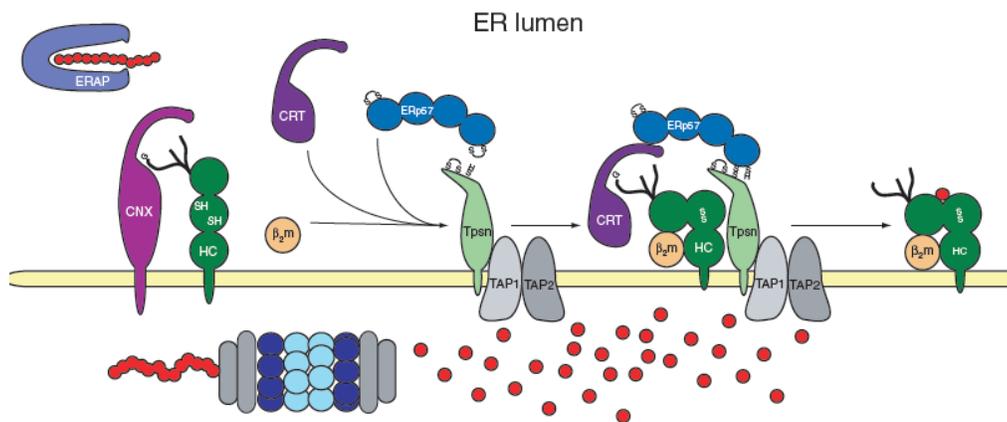


Figura 2. Ensamblaje del complejo mayor de histocompatibilidad clase I.

La propiedad de calreticulina para potenciar la respuesta inmune ha sido ampliamente estudiada en el desarrollo de una vacuna contra el cáncer cérvico uterino

mostrando excelentes resultados para impedir el desarrollo tumoral en un modelo murino. Así mismo se ha tratado de aprovechar esta propiedad de calreticulina como potenciador de la respuesta inmune humoral para combatir otras enfermedades como la producida por el *Bacillus anthracis*. En este caso se fusionó a calreticulina una secuencia que codifica para el dominio IV del llamado Antígeno protector (PA), el cual ya se ha reportado que es vital para el desarrollo de la enfermedad y bloqueándolo se evita la infección (este dominio ha sido blanco del desarrollo de diferentes terapias). Se demostró que ratones previamente inmunizados con vacunas de DNA que portan la fusión de calreticulina y PA incrementaron la respuesta inmune humoral y con ello un aumento del tiempo de supervivencia en comparación de ratones que solo fueron expuestos a la toxina. Por esta razón nosotros decidimos evaluar esta propiedad de calreticulina para incrementar tanto la respuesta inmune celular como la humoral en un modelo de tuberculosis.^{32,33}

JUSTIFICACIÓN

Debido a la problemática para controlar y erradicar la tuberculosis, infección causada por *M.tuberculosis*, y a la deficiencia de la BCG como vacuna para el tratamiento de esta infección, nosotros consideramos de suma importancia desarrollar un recombinante adenoviral que porte información de los antígenos relacionados con la virulencia de *M.tuberculosis* en presencia de información génica con potencial de adyuvante (Calreticulina) que nos permita establecer una respuesta inmune protectora eficiente contra los antígenos inmunodominantes de esta bacteria.

HIPÓTESIS

La calreticulina fusionada con antígenos inmunodominantes de *M.tuberculosis* potencia el efecto de protección contra la infección por *M.tuberculosis* a través de la inducción del sistema inmune.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la fusión de calreticulina a antígenos inmunodominantes de *M.tuberculosis* mejoran la estimulación de la respuesta inmune aunado al efecto de protección contra la infección de tuberculosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construir vectores adenovirales que expresen los antígenos inmunodominantes de *M.tuberculosis* fusionados y sin fusionar a calreticulina.
2. Evaluar la funcionalidad *in vitro* de los adenovirus sintetizados.
3. Evaluar la activación de la respuesta inmune *in vivo* que generan los adenovirus.
4. Evaluar el efecto de protección que ofrecen los adenovirus recombinantes en un modelo animal murino de tuberculosis.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estrategia Experimental para la obtención de los adenovirus recombinantes

Primero se diseñó un plásmido con la fusión de los tres genes de *M.tuberculosis* en fase de lectura (Ag85B, ESAT-6, Cfp-10) conteniendo sitios de restricción entre ellos con la finalidad de obtener todas las posibles combinaciones de genes tanto fusionados como individuales (Figura 3). Posteriormente se mandó sintetizar el plásmido a la compañía geneArt.

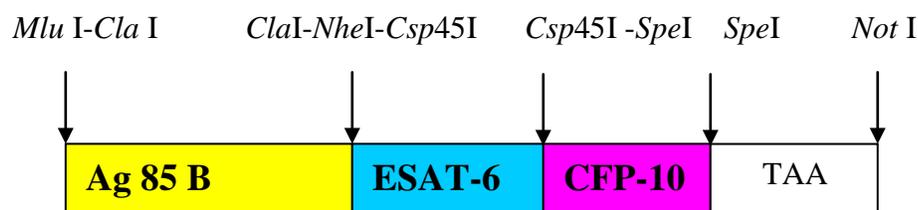


Figura3. Esquema de la Construcción pAg85B-ESAT6-CFP10. Estrategia empleada para la generación de los vectores acarreadores.

A partir de este plásmido se liberó la fusión de los genes Ag85B, ESAT-6 y CFP-10 con las enzimas *Mlu I* y *Not I*, se checó la digestión completa en un gel de agarosa al 0.8%, con esta digestión esperábamos una banda de 1.6Kb la cual nos estaría indicando la liberación de los genes de interés, esta banda fue purificada con el kit de purificación de Fermentas. Este fragmento fue clonado en el plásmido pShuttle calreticulina-E7.

Para construir los vectores adenovirales es necesario clonar los genes de interés en el vector pshuttle (acarreador) el cual posteriormente se recombinará con el plásmido pAdeasy (contiene el genoma viral para originar el virus recombinante).

El plásmido pShuttle CRT-E7 tiene clonada la secuencia de calreticulina-E7; primero este plásmido también fue digerido con la enzimas *MluI* y *NotI*, con esta digestión se liberó el gen de E7 para ser sustituido por los genes fusionados anteriormente purificados. Una vez que obtuvimos tanto el vector pShuttle-CRT purificado como el inserto de interés, y ya que ambos tenían extremos compatibles hicimos una clonación

dirigida utilizando la enzima ligasa de Fermentas. Después con esta ligación se transformaron bacterias de la cepa de *E.coli* DH5a previamente tratadas con calcio para lograr hacerlas competentes. Se transformaron 50 µl de bacterias con 20ng de la ligación y se sembraron en cajas con agar LB con kanamicina como gen de selección, ya que el pShuttle contiene la secuencia génica de resistencia a este antibiótico. Las clonas positivas se crecieron en 3 ml de medio LB y se les hizo una extracción de DNA plasmídico en pequeña escala utilizando la técnica de la lisis alcalina con SDS. Una vez obtenido el DNA fueron digeridas con las enzimas *Bgl*III, *Eco*RV, *Nhe*I para checar el patrón de restricción. Para la obtención de los vectores con los diferentes genes se hicieron las siguientes digestiones:

Tabla1. Construcciones de vectores pShuttle con genes de calreticulina y *M.tuberculosis*

Vector inicial	Enzimas utilizadas	Vector a Obtener
pshuttle CRT/Ag85B/ESAT-6/CFP-10	<i>Spe</i> I	pshuttle CRT/Ag85B/ESAT-6
pshuttle CRT/Ag85B/ESAT-6/CFP-10	<i>Csp</i> 45I	pshuttle CRT/Ag85B/CFP10
pshuttle CRT/Ag85B/ESAT-6/CFP-10	<i>Cl</i> aI	pshuttle CRT/ESAT-6/CFP-10
pshuttle CRT/Ag85B/ESAT-6	<i>Csp</i> 45I	pshuttle CRT/Ag85B
pshuttle CRT/ESAT-6/CFP-10	<i>Spe</i> I	pshuttle CRT/ESAT-6
pshuttle CRT/ESAT-6/CFP-10	<i>Csp</i> 45I	pshuttle CRT/CFP-10

Una vez obtenidos estos vectores se caracterizaron con diferentes enzimas de restricción (*Bgl* II y *Eco*RV). Para obtener los adenovirus, bacterias de *E.coli* BJ5183 se trataron con calcio para hacerlas competentes y poder transformarlas. Primero se transformaron con el plásmido pAdeasy el cual contiene la información necesaria para generar los adenovirus. Se checó por restricción con *Hind* III y *Sal* I que fueran clonas transformadas con el plásmido pAdeasy posteriormente se creció la clona en 50ml de medio LB y se trataron nuevamente con calcio para volverlas competentes, después se transformaron con cada una de las construcciones anteriormente obtenidas dejando menos de 15 hrs de crecimiento en la placa con agar LB. Las colonias resultantes se crecieron en tubos de ensayo conteniendo 3ml de

medio LB con resistencia a kanamicina (100mg/ml), ya que una vez ocurrida la recombinación el gen de resistencia a ampicilina que contiene el plásmido pAdeasy es reemplazado por el de kanamicina del plásmido pShuttle. Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico y se checó por restricción la autenticidad de las clonas con las enzimas de restricción *MluI* y *SpeI* ya que al lograr la recombinación se introduciría un sitio cambiando el patrón de restricción. También fueron digeridas con la enzima *PacI* para determinar el sitio de recombinación.

Las clonas positivas fueron transformadas en la cepa de *E.coli* DH5 α para obtener DNA y hacer un stock de las clonas ya sin propiciar la recombinación. Posteriormente se realizó la purificación de los plásmidos por columna (kit Fermentas) para eliminar la mayor cantidad de toxinas y poder transfectar estos plásmidos con éxito en las células HEK293. Una vez purificado el plásmido, 4mg de cada plásmido fueron digeridos con *PacI* para dejar al vector lineal y liberar el gen de selección; la digestión se checó en gel de agarosa al 0.8% después de una hora, una vez que se observó la digestión completa se procedió a precipitar el DNA con 1 volumen de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol, se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Después se resuspendió en 20 μ l de agua.

3.2 Transfección para la generación de los adenovirus

Posteriormente para generar los adenovirus recombinantes, el DNA fue introducido en las células HEK293 utilizando el método químico de lipofección. Primero 500,000 células fueron sembradas en una placa de 6 pozos, cuando alcanzaron un 70% de confluencia fueron transfectadas con los vectores purificados. Los 4 mg de DNA se mezclaron con 250 μ l de medio Optimen. Por otro lado se mezclaron 10 μ l de lipofectamina en 250 μ l de medio Optimen. Posteriormente se mezclaron ambos medios y se dejó reposar por 20 min para lograr la formación de los complejos entre los lípidos y el DNA para permitir la entrada al interior de la célula por la afinidad que presenta el lípido por la membrana celular. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a agregar la mezcla a las células y se llevaron a la incubadora.

Diariamente se monitorearon las células para observar sus cambios. Cuando se observó el efecto citopático, el cual se caracteriza por redondear las células, se procedió a

desprenderlas de las placas y se llevaron al ultracongelador. Después para liberar las partículas virales se hicieron 4 ciclos de congelación (-80°C) y descongelación (37°C), y para separar las partículas virales de los restos celulares se centrifugó a 1400rpm durante 10 minutos. Estos virus se utilizaron para infectar otras células, y poder checar la expresión de las proteínas recombinantes.

3.3 Expresión de Proteínas Recombinantes

Para comprobar que los adenovirus recombinantes expresaban las proteínas de *M.tuberculosis*, se plaquearon 100,000 células en las placas de 12 pozos y con cada virus a probar se infectó un pozo. Después de que se observó el efecto citopático, a las células se les quitó el medio de cultivo y se lavaron con PBS para eliminar el medio restante, se añadió 50 ml del buffer de lisis (kit de Fermentas), con el cual se resuspendieron las células que estaban adheridas a la placa, posteriormente se agitó con vortex y se dejaron en agitación (900-1200 rpm) a temperatura ambiente por 10 min. Para separar las proteínas de los restos celulares se centrifugó a 20,000 rpm a 4°C por 15 min. Después se realizó una curva para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Lo primero fue realizar una dilución del reactivo de Bradford en relación 1:4 con agua destilada. Se prepararon los siguientes estándares de la proteína IgG I (bio-Rad) mostrados en la Figura 4.

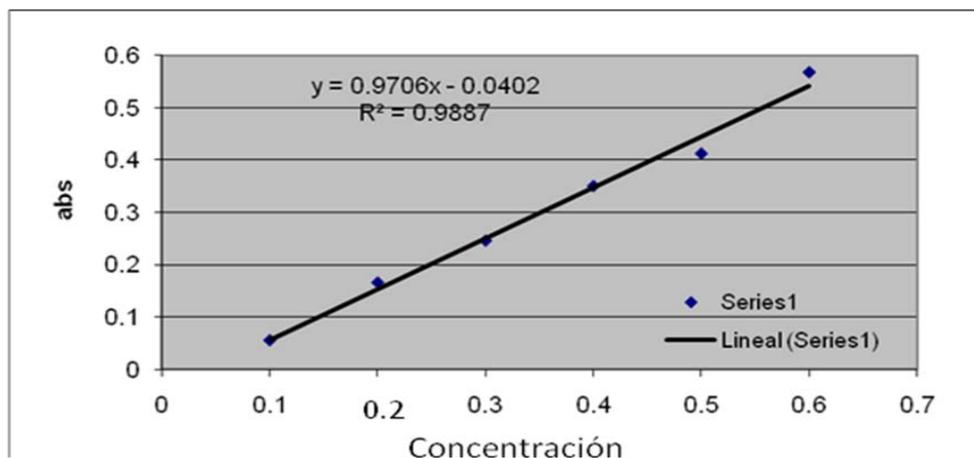


Figura 4. Curva de Calibración de Estándares para la cuantificación de proteínas. Concentraciones conocidas de la proteína IgG I fueron empleadas para construir una curva de calibración.

3.3.1 Inmunoelctrotransferencia (Western Blot)

Una vez obtenidos los extractos se corrieron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 8% por 2 hrs. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nylon la cual se incubó con leche descremada al 2.5%, como solución bloqueadora, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario CFP-10 por una hora, al término de este tiempo se hicieron 3 lavados con PBT (Buffer de Fosfatos con Tritón), para después ser incubada con el anticuerpo secundario durante toda la noche en agitación constante. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 15 min con PBT, para posteriormente revelar la membrana con un kit de quimioluminiscencia, y utilizando un film de radiografía para identificar la señal emitida por ésta.

3.3.2 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se aplicó para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes en los adenovirus *in vitro*. Para realizar esta técnica primero plaqueamos 600,000 células HEK293 por pozo en placas especiales con fondo plano para que las células se adhieran con el 10% de suero bovino fetal, posteriormente cuando se obtuvo una confluencia del 70% se infectaron con 200 microlitros del extracto crudo de los adenovirus, posteriormente se monitorearon diariamente hasta observar un efecto citopático en la mayoría de las células. Para iniciar con la técnica se eliminaron los restos de medio lavando las células 2 veces por 3 min con PBS 1X (triton 1X), se fijaron en metanol-acetona (1:1), se dejaron 10min a -20°C. Para quitar los restos del metanol y la acetona se realizaron 3 lavados por 5 min con PBS 1X (triton 1X), se procedió a bloquear con suero bovino fetal al 1% diluido en PBS 1X (triton 1X) durante 1 hora. Una vez bloqueadas las zonas donde se pudiera pegar el anticuerpo inespecíficamente, colocamos el anticuerpo primario utilizado para cada proteína correspondiente al antígeno a identificar, en una dilución 1:200 esto durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación realizamos 3 lavados con PBS 1X para eliminar el anticuerpo. Posteriormente revelamos las proteínas con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (FITC y Alexa) en este caso Alexa 488 para detectar la presencia de la proteína recombinante, a una dilución de 1:50; la incubación se realizó durante 2 horas en completa oscuridad.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 5 min cada uno. Después se secaron las laminillas y se montaron utilizando el vectorshield y se observaron el microscopio de fluorescencia.

3.4 Purificación de los adenovirus

3.4.1 Escalamiento de los adenovirus

Una vez que se confirmó la expresión de la proteína por las técnicas anteriormente descritas, se procedió a incrementar el número de partículas adenovirales para purificarlas a través de un gradiente de cloruro de cesio.

Primero se inició con la infección de una botella T-25, posteriormente se esperó a observar un efecto citopático, después se recolectaron y fueron lisadas tras ciclos de congelación y descongelación, y posteriormente se clarificó el sobrenadante centrifugándolo a 1500 rpm por 5 minutos para eliminar los restos celulares. El proceso de reinfectar una placa del mismo tamaño se realizó hasta observar que en un lapso de 24hrs posterior a la infección todas las células de la placa presentarían un efecto citopático completo, después se procedió con este extracto a infectar 5 botellas T-25, y se repitió el mismo proceso para lisar las células. Estos extractos se utilizaron para infectar una placa de 150 mm, posteriormente con este extracto se infectaron 5 placas de 150 mm, y se dimensionó a 10 placas de 150 mm para finalmente infectar 35 placas de 150 mm. Al observarse un efecto citopático evidente se recuperan en un volumen no mayor a 20 ml y se almacenó a -80°C hasta su purificación con cloruro de cesio.

3.4.2 Purificación con Cloruro de Cesio

Una vez obtenidos los extractos de 35 placas de 150 mm en un volumen de 20 ml se procedió a lisarlos y posteriormente clarificados para colocarlos en el tubo donde se realizó el gradiente de cloruro de cesio.

Para formar el gradiente utilizamos 8 ml de una solución de CsCl 1.4 (53gr + 87ml de TRIS-HCl 10mM pH7.9) posteriormente sobre éste se colocó 6 ml de la solución CsCl 1.2 (26.8gr + 92 ml de TRIS-HCl 10mM pH7.9). En la superficie del gradiente se colocó el extracto del virus. Y para sellar el tubo se agregó aceite mineral estéril, con el cual también

se ajustó el peso de cada tubo. Después se centrifugaron en una ultracentrífuga a 28,000 rpm por 90 min a 4 grados.

Una vez concluido este tiempo se sacaron los tubos, en la campana de flujo laminar se recolectó la banda de los adenovirus puros infectivos, agregándole un volumen de TE 1X para colocar la mezcla en la parte superior de otro tubo que contenía un gradiente igual al anterior, después se centrifugó a 28,000 rpm por 20 hrs, posteriormente se recuperó la banda de los adenovirus purificados.

Para eliminar las sales de cloruro de cesio se realizó el proceso de diálisis en el cual los adenovirus obtenidos se colocaron en un casset de diálisis (20k Pierce) y posteriormente se colocaron dentro de un matraz de un litro con una solución de diálisis (10mM Tris-HCl y MgCl 2mM) por una hora, este proceso se repitió por 3 veces solo que en el último cambio se le agregó glicerol 10%. Finalmente se extrajo con una jeringa los adenovirus purificados y se almacenaron a -80 hasta su uso.

3.4.3 Titulación viral

Para conocer la concentración de los virus obtenidos después de ser purificados se realizó un ensayo de titulación viral. Inicialmente se sembraron 3 placas de 96 pozos con las células HEK 293 y se hicieron diluciones del virus en relación 1:10 hasta $1:1 \times 10^{11}$, después con cada una de las diluciones se infectaron 10 pozos. Se monitorearon todos los días hasta observar el inicio del efecto citopático; pero sin ser presentado en los pozos no infectados.

Posteriormente haciendo uso de la fórmula:

$$T=10^{1+d(S-0.5)}$$

d= Log 10 de la dilución

S= la suma de los radios

Así se logró determinar la cantidad de partículas infectivas por mL de cada adenovirus utilizado.

3.5 Respuesta inmune celular específica

3.5.1 Inmunizaciones

Ratones hembras de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas fueron inmunizados vía intranasal con una dosis adenoviral de 5×10^7 ufp (PFU), se utilizaron 3 ratones por grupo para determinar la respuesta inmune realizando ensayos de ELISPOT para Interferón γ y la técnica de ELISA para la determinación del TNF- α (Factor de Necrosis tumoral), además a la par se inmunizaron la misma cantidad de ratones por cada grupo, los cuales posteriormente fueron infectados con la bacteria.

Tabla 2. Tratamientos empleados para los ensayos de respuesta inmune en ratones.

Solución salina estéril	AdLac Z
AdESAT6	AdCRT-ESAT6
Ad-CFP10	AdCRT-CFP10
AdCRT-ESAT6-CFP10	AdCRTAg85B-ESAT6-CFP10
AdPSCFP10KDEL	

3.5.2 ELISPOT Interferón Gamma (IFN γ)

Una vez que habían transcurrido las 4 semanas, los ratones fueron sacrificados y se recolectaron los bazos, estos fueron colocados en hielo hasta su uso. Se trataron los bazos de cada ratón por separado para obtener las células del bazo y posteriormente colocarlas en las placas previamente cubiertas con el anticuerpo que captura el interferon producido por las células. Para este método se utilizó el kit de la marca BD, se colocaron 1×10^6 células por pozo, se incubó a 37°C y 5% de CO_2 por 24 hrs con la proteína adecuada para estimular a las células, después se hicieron lavados con PBS 1X para retirar las células, posteriormente se agregó el anticuerpo que detecta el interferón secretado y finalmente se revela con diaminobencidina.

3.5.3 ELISA Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α)

Se utilizaron las células restantes del ensayo de elispot, se colocaron 1×10^6 células por pozo, se incubaron durante 24 hrs con la proteína adecuada para estimular a las células, posteriormente se recolectó el sobrenadante y se adicionó 50 μ l de éste en las placas recubiertas con el anticuerpo anti-TNF y se utilizó el kit para poder cuantificar con el espectrofotómetro la concentración de TNF- α en cada uno de los casos, en base a una curva de estándar realizada.

3.6 Infecciones con *Mycobacterium tuberculosis*

Ratones C57BL/6 hembras fueron inmunizados vía intranasal con una dosis adenoviral de 5×10^7 ufp (PFU), posteriormente a las 4 semanas se les infectó en un área de bioseguridad nivel III por medio de inhalación con la bacteria *M.tuberculosis* de la cepa H37Rv en una dosis de 100 bacterias aproximadas por ratón.

Posterior a las 4 semanas se recolectó el bazo y los pulmones para hacer un homogenizado y se plaqueó en 7H11 agar diferentes diluciones de los homogenados, se incubaron a 37°C al 5% de CO₂, posteriormente a las dos semanas se cuantificó las unidades formadoras de colonias.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Obtención de los vectores acarreadores (pShuttle)

Para obtener los adenovirus recombinantes se utilizó la estrategia descrita en materiales y métodos. Para confirmar cada una de las construcciones de la tabla 1, se realizaron las caracterizaciones correspondientes utilizando las enzimas de restricción que se mencionan posteriormente. Para la construcción principal pCRT-Ag85B-ESAT6-CFP10 se caracterizó utilizando las enzimas empleadas para realizar la clonación sitio dirigida (*MluI* y *NotI*) liberando una banda de alrededor de 1,500 pb, así como la de un sitio único específico del fragmento clonado (*NheI*), *EcoRV* y *BglIII* que cortan en el esqueleto del plásmido.

Para la caracterización de las demás construcciones obtenidas a partir de la principal se utilizaron las enzimas específicas que se describen al pie de la Figura 5.

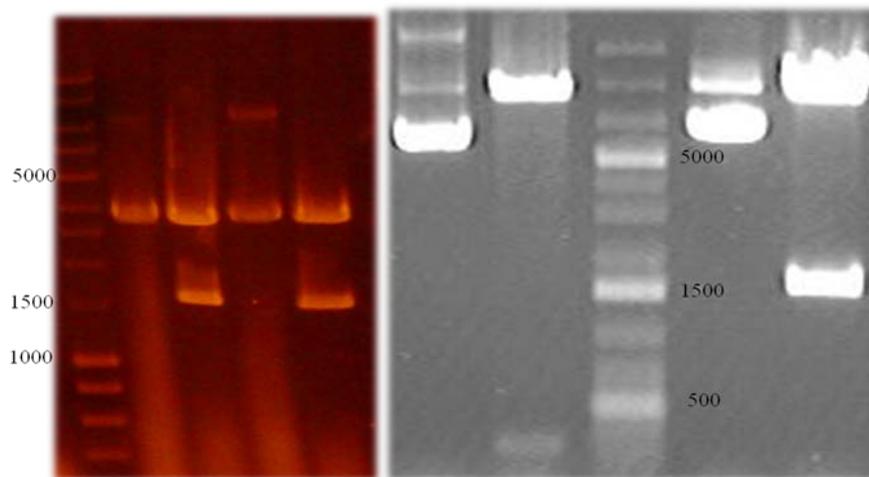


Figura 5. Caracterización de la clonación del cassette de los antígenos Ag85B-ESAT6-CFP10 fusionados a Calreticulina en el vector pShuttle (pCRTAg85B-ESAT6-CFP10). Gel izquierdo: carril 1 marcador de peso molecular; carriles 2 y 4 pAg85B-ESAT6-CFP10 sin digerir; carriles 3 y 5 pAg85B-ESAT6-CFP10 digerido. Gel derecho: carril 1 pShuttleCRTE7; carril 2 pShuttleCRTE7 digerido; carril 3 marcador de peso molecular; carril 4 pShuttleCRTAg85B-ESAT6-CFP10 sin digerir, y carril 5 pShuttleCRT Ag85B-ESAT6-CFP10 digerido. Se purificó DNA plasmídico y posteriormente se digirió con las enzimas *MluI* y *NotI*.

Una vez obtenida la clona pCRT-Ag85B-ESAT6-CFP10 se realizaron las siguientes deleciones para obtener diferentes combinaciones de los genes utilizados como lo muestra la tabla 1.

Una vez obtenidas estos vectores todas las clonas fueron caracterizadas por restricción utilizando diferentes enzimas. Entre las cuales se usaron *MluI* y *NotI* que flanquean a los genes de *M.tuberculosis*. Para la clona que expresa Ag85B su peso es de alrededor de 1000 pb, ESAT-6 300 pb y CFP10 300 pb; éstas fueron las bandas que tomamos en cuenta para identificar cada clona (Figura 6).

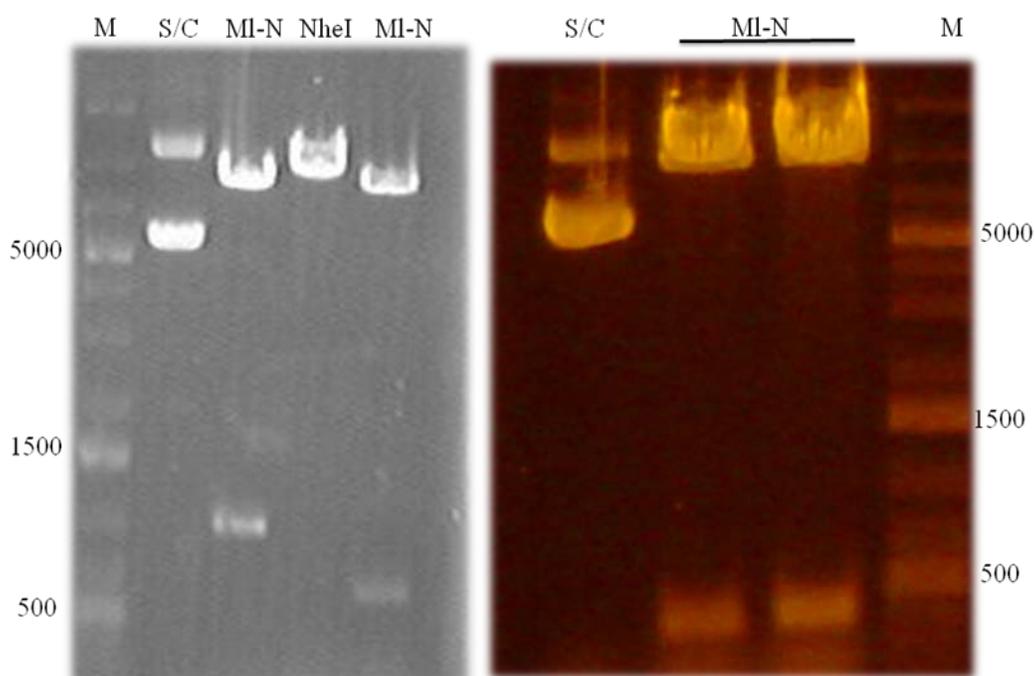


Figura 6. Caracterización de los vectores acarreadores. Gel izquierdo: carril 1 marcador de peso molecular; carriles 2, 3 y 4 pShuttleCRT Ag85B, y carril 5 pShuttleCRT-ESAT6-CFP10. Gel derecho: carriles 1 y 2 pShuttleCRT-ESAT6; carril 3 pShuttleCRT-CFP10, y carril 4 marcador de peso molecular. Se obtuvo DNA plasmídico y se digirió con las enzimas como se indica en la parte superior de la imagen.

4.2 Obtención de los vectores adenovirales

Una vez obtenidas las construcciones acarreadoras, se recombinaron con el genoma viral para dar origen al vector adenoviral expresando la proteína de interés. Una vez obtenidas estos plásmidos se caracterizaron con las enzimas de restricción *MluI* y *SpeI*

entre otras, como se muestra en la Figura 7, ya que nos permiten diferenciar los plásmidos recombinantes puesto que al llevarse a cabo el evento de recombinación se introduce un sitio de corte para ambas enzimas y comparado con el silvestre se observa una banda adicional en las restricciones con estas enzimas. Observando dos bandas en las clonas recombinantes al digerir con la enzima *SpeI*, y observando una banda extra alrededor de 8,000 pb variando de acuerdo al gen o genes clonados (Figura 7). Además se ser digeridas con *PacI* para determinar el sitio de recombinación.

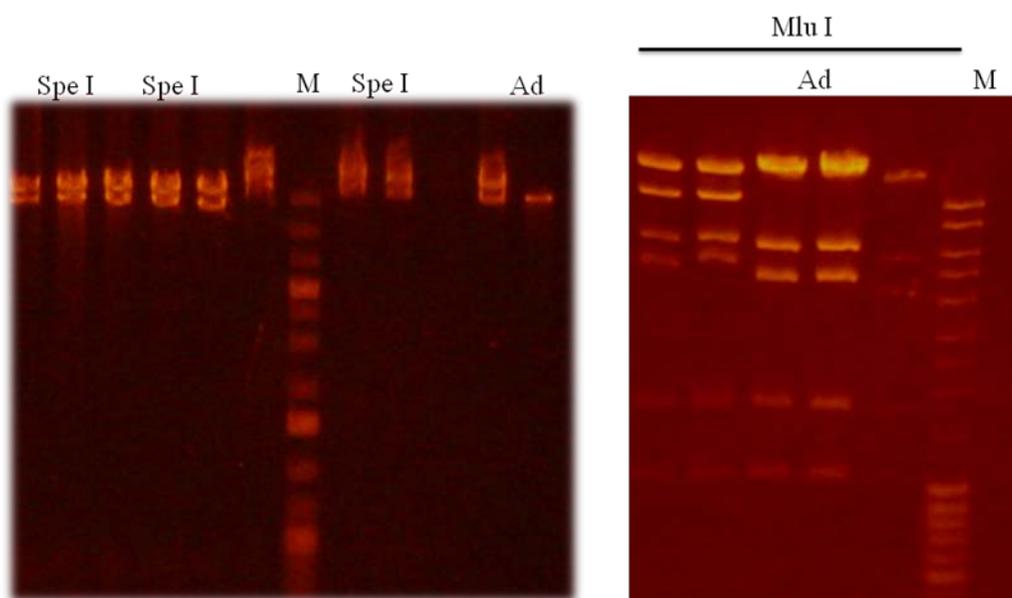


Figura 7. Caracterización de los vectores virales. Gel izquierdo: carril 1 AdCRTAg85-ESAT6, carril 2 AdCRTAg85B-CFP10, carril 3 AdCRTAg85B, carril 4 AdCRT-ESAT6, carril 5 AdCRT-CFP10, carril 6, 8,9 y 11 AdCRTAg85B-ESAT6-CFP10 carril 7 marcador de peso molecular, carril 12 Adeasy. Gel derecho: carril 1 y 2 AdCRTAg85B-ESAT6-CFP10, carril 4, 5 y 6 AdEasy, carril 7 marcador de peso molecular. Se obtuvo DNA de las clonas obtenidas mediante recombinación y posteriormente se digirió con las enzimas *Mlu I* y *Spe I*.

4.3 Transfección para la generación de los adenovirus

Posteriormente para generar los adenovirus recombinantes, el DNA fue introducido en las células HEK293 utilizando el método químico de lipofección. Puesto que esta línea celular expresa los genes E1 y E3, necesarios para el ensamblaje y replicación adenoviral, se monitorea el cultivo para observar un efecto citopático que nos indica la generación de partículas adenovirales dentro de las células.

Una vez obtenidas las partículas adenovirales, con éstas re infectamos nuevas células para así lograr un aumento de títulos de adenovirus y facilitar el proceso de detección de proteínas.

4.4 Evaluación de la funcionalidad de los adenovirus sintetizados.

4.4.1 Expresión de Proteínas Recombinantes

4.4.1.1 Expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a CFP10

Una vez determinada la concentración de los extractos, se usó 1mg/ml de proteínas totales obtenidas de cada adenovirus recombinante, para corroborar mediante un Wb (Western-blot) la expresión de las proteínas recombinantes. En la Figura 8 se observa el resultado que nos indica la presencia de las proteínas recombinantes CFP-10, que se detectaron usando un anticuerpo policlonal antiCFP10, en los extractos de las células infectadas con los diferentes adenovirus. En los carriles 1, 4 y 5 se observan bandas a diferentes alturas que concuerdan con el tamaño de la proteína de fusión expresada que de mayor a menor tamaño corresponden a: CRT-Ag85B-CFP10 (113 kDa), AdCRT-ESAT6-CFP10 (90kDa) y CRT-CFP10 (80kDa).

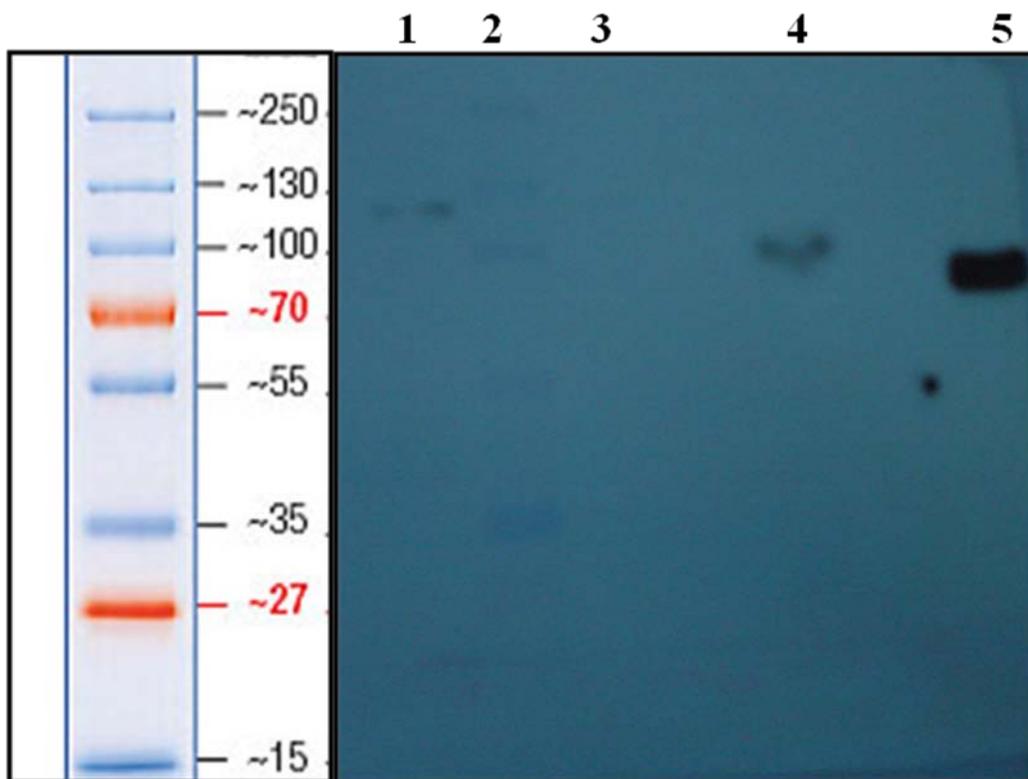


Figura 8. Identificación de la proteína CFP10 recombinante. Carril 1 AdCRT-Ag85B-CFP10 (113 kDa), carril 2 marcador de peso molecular, carril 3 HEK 293, carril 4 AdCRT-ESAT6-CFP10 (90 kDa), carril 5 AdCRT-CFP10 (80 kDa). Células HEK 293 fueron infectadas con los adenovirus recombinantes respectivamente, posterior al efecto citopático se extrajeron las proteínas totales y se analizó la expresión de las proteínas recombinantes mediante la técnica de WB.

4.4.1.2. Detección de proteínas mediante Inmunofluorescencia

Otro método que utilizamos para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes en los adenovirus fue la inmunofluorescencia, utilizamos los anticuerpos policlonales AntiAg85B, AntiESAT-6 y AntiCFP10 según la clona a identificar, respectivamente. Se observaron el microscopio de fluorescencia cada muestra (Figuras 9, 10, 11 y 12). Células HEK 293 fueron infectadas con los adenovirus recombinantes, después de observar un efecto citopático, se analizó la expresión de proteínas recombinantes mediante la técnica de Inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos correspondientes.

En la Figura 9 podemos observar la presencia de la proteína Ag85B detectada mediante el uso del anticuerpo policlonal específico para esta proteína, se puede comparar la señal emitida cuando las células no fueron infectadas, de las que fueron infectados con el AdCRTAg85B-ESAT-6-CFP10, así mismo de células infectadas pero sin emplear el anticuerpo primario como un control de la técnica. Como resultado se observa una señal positiva en el caso de las células que fueron infectadas y además donde se utilizó el anticuerpo primario el cual nos revela la presencia de la proteína Ag85B. También se realizó la detección de las proteínas ESAT-6 y CFP10, así comprobando la presencia de todas las proteínas recombinantes empleadas en esta construcción.

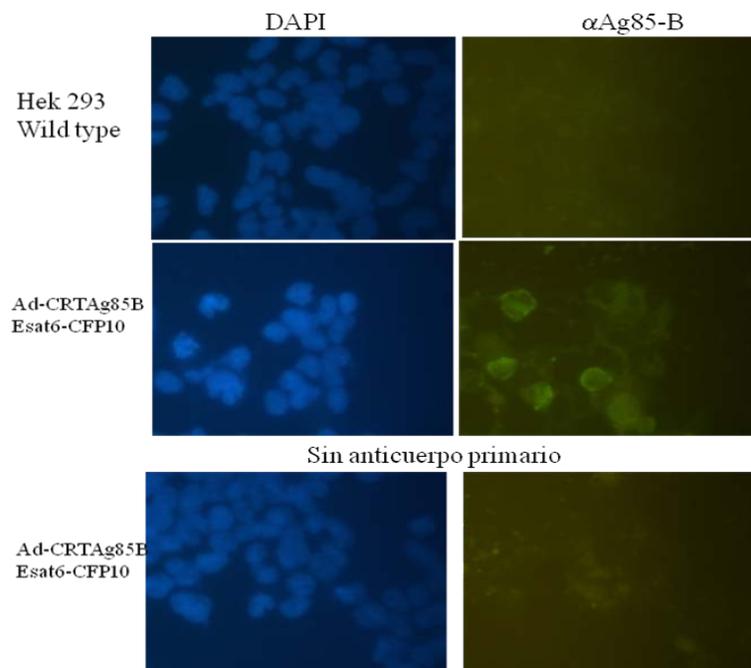


Figura 9. Funcionalidad del virus recombinante AdCRTAg85B-ESAT6-CFP10. Células HEK 293 fueron infectadas con el virus AdCRTAg85B-ESAT6-CFP10 y posterior al efecto citopático se detectó la expresión de la proteína por inmunofluorescencia con el anticuerpo Ag85B.

Células HEK 293 fueron infectadas con los adenovirus AdESAT-6 y AdCRTESAT-6, posteriormente a observar un efecto citopático, se realizó la inmunofluorescencia empleando al anticuerpo policlonal ESAT-6 para revelar la presencia de esta proteína. En la Figura 10 se observa la expresión de la proteína ESAT-6 comparada con los controles, como en el caso descrito en la Figura 9. Además en esta Figura se observa la expresión de la proteína Ag85B detectada en células que fueron infectadas con el adenovirus AdCRTAg85B-ESAT-6.

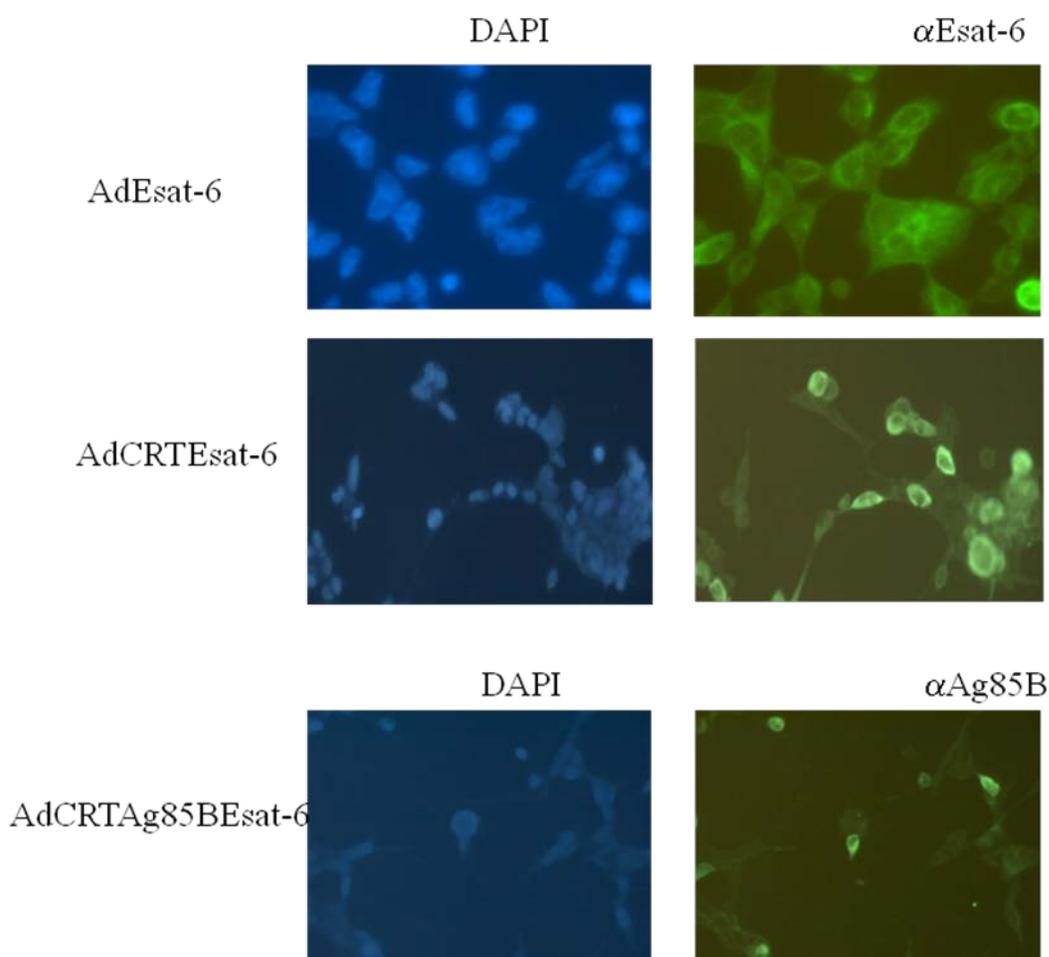


Figura 10. Funcionalidad de los virus recombinantes AdESAT-6 , AdCRT-ESAT6. AdCRTAg85B-ESAT6. Células infectadas con los virus AdCRTAg85B-ESAT6, AdCRT-ESAT6 y AdESAT-6 posterior al efecto citopático se realizó inmunofluorescencia con los anticuerpos para Ag85B y ESAT6.

Así mismo, otras células fueron infectadas con los adenovirus AdCFP10, AdCRTCFP10 y AdPSCFP10KDEL y posteriormente al mostrar un efecto citopático se les realizó la inmunofluorescencia empleando el anticuerpo policlonal AntiCFP10 para corroborar la expresión de la proteína recombinante. Como se observa en la Figura 11 existe la presencia de la proteína CFP10 en todos los casos donde las células fueron infectadas por los adenovirus previamente mencionados, caso contrario en los controles negativos empleados.

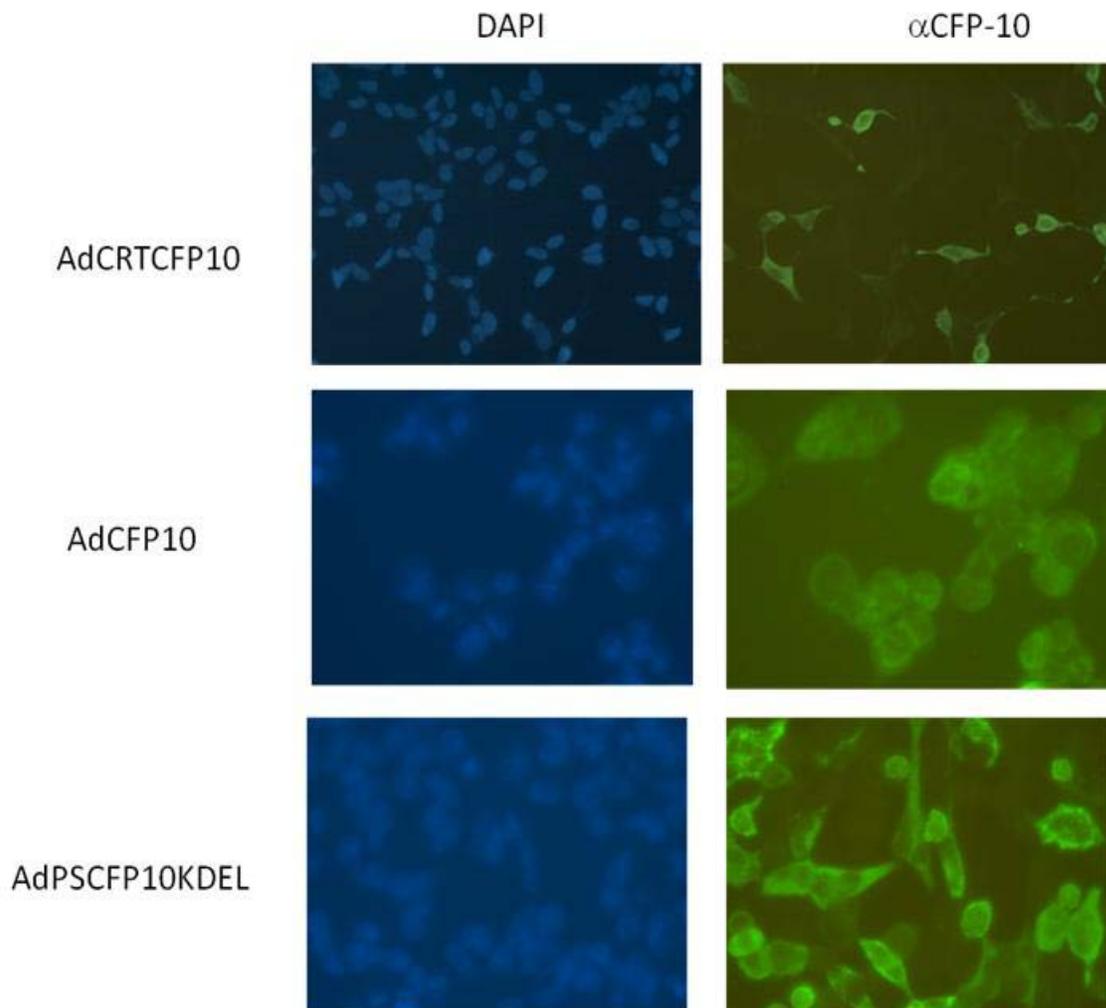


Figura 11. Funcionalidad del virus recombinante AdCRTCFP10, AdCFP10 y AdPSCFP10KDEL. Células HEK 293 fueron infectadas con los adenovirus AdCRTCFP10, AdCFP10 y AdPSCFP10KDEL posterior al efecto citopático se analizó la expresión de la proteína recombinantes detectada por inmunofluorescencia con el anticuerpo CFP10.

Como se observa en la Figura 12 células que fueron infectadas con el adenovirus AdCRTAg85B expresan la proteína recombinante Ag85B a diferencia de los controles negativos empleados en el experimento.

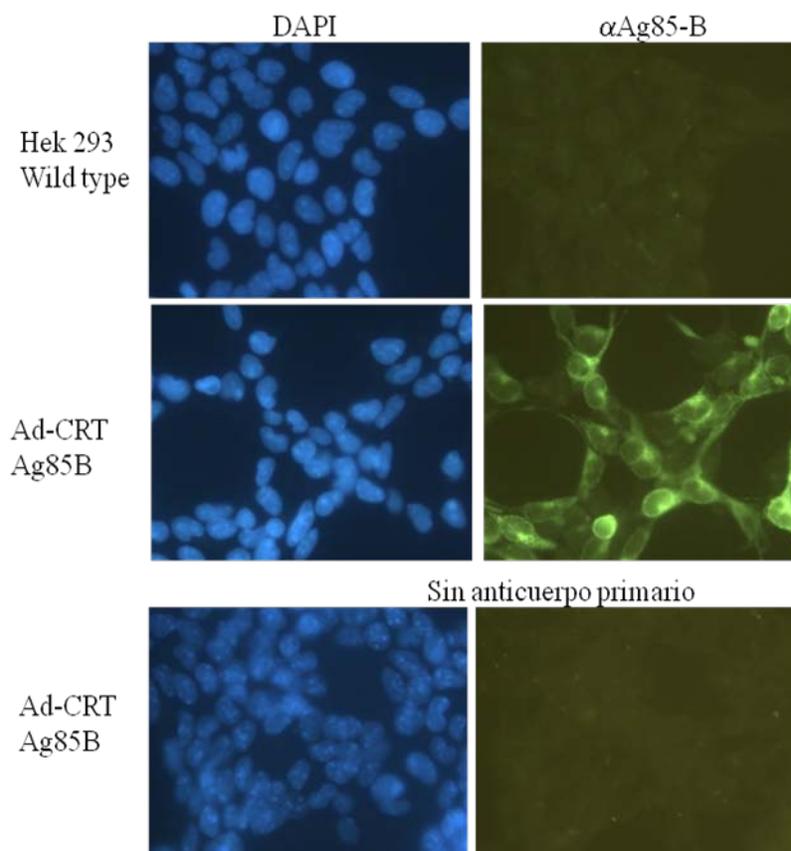


Figura 12. Funcionalidad del virus recombinante AdCRTAg85B. . Células HEK 293 fueron infectadas con los adenovirus AdCRTAg85B posterior al efecto citopático se analizó la expresión de la proteína recombinantes detectada por inmunofluorescencia con el anticuerpo Ag85B.

Además la señal positiva representa la funcionalidad de los vectores en el proceso de la infección viral así como en la expresión de la proteína recombinante, que fue clonada en el genoma del adenovirus serotipo 5, que se utilizó en la construcción de los vectores. Así mismo se comprueba el funcionamiento de la metodología, ya que al utilizar solo el

anticuerpo secundario no se observa expresión, en contraste con el uso de células HEK 293 no infectadas.

4.5 Evaluación de la inducción de la respuesta inmune generada por adenovirus.

4.5.1 Titulación viral

Las partículas virales que se obtuvieron mediante purificación en gradientes de cloruro de cesio, se determinó su concentración y capacidad infectiva mediante una técnica de titulación seriada. Inicialmente se sembraron 3 placas de 96 pozos con las células HEK 293 y se realizaron de igual manera diluciones seriadas del virus en relación 1:10 hasta $1:1 \times 10^{14}$, posteriormente con cada una de las diluciones se infectaron 10 pozos con células confluentes al 90 %. Se realizó un monitoreo todos los días hasta observar el inicio del efecto citopático. Posteriormente haciendo uso de las formulas correspondientes se determinó la concentración de partículas virales por ml (PFU/mL), resultando las concentraciones descritas en la Tabla 3.

Tabla3. Títulos de los Adenovirus.

Adenovirus	Título promedio PFU/ml
AdLacZ	6.3×10^{14}
AdCFP10	7.9×10^{12}
AdESAT-6	6.3×10^{10}
AdCRT-CFP10	6.8×10^{10}
AdCRT-ESAT6	8×10^{12}
AdCRT-ESAT6-CFP10	5×10^{12}
AdCRT-Ag85B-ESAT6-CFP10	4×10^{12}
AdPSCFP10KDEL	6×10^{10}

En base a estos resultados obtenidos, se calculó para cada uno de los casos la cantidad necesaria para inmunizar con 5×10^7 ufp (PFU).

4.6 Respuesta Inmune

Para evaluar la participación de la respuesta inmune inducida por las construcciones adenovirales realizadas en este trabajo, utilizamos 3 ratones por grupo de la cepa C57/BL6, de 6-8 semanas de edad, los cuales fueron inmunizados con una dosis intranasal de 5×10^7 pfu. Después de 4 semanas los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron células del bazo las cuales se cultivaron y reestimularon *in vitro*, con los antígenos respectivos que expresan los adenovirus recombinantes utilizados previamente para inmunizar a los ratones. Se evaluó las concentraciones de IFN- γ mediante la técnica de ELISPOT así como TNF- α mediante la técnica de ELISA.

Posterior a las 4 semanas de inmunización todos los grupos de ratones fueron sacrificados y se procesó cada bazo de manera independiente para la obtención de los linfocitos. Para evaluar el grado de sensibilización de las células por la inmunización con los adenovirus, las células de cada animal fueron cultivadas con y sin el antígeno correspondiente al previo estímulo (10 μ g/ml), y se determinó la liberación de TNF- α a las 24 horas. Inicialmente se realizó una curva de calibración para determinar por interpolación la concentración de TNF- α de nuestras muestras (Figura 13).

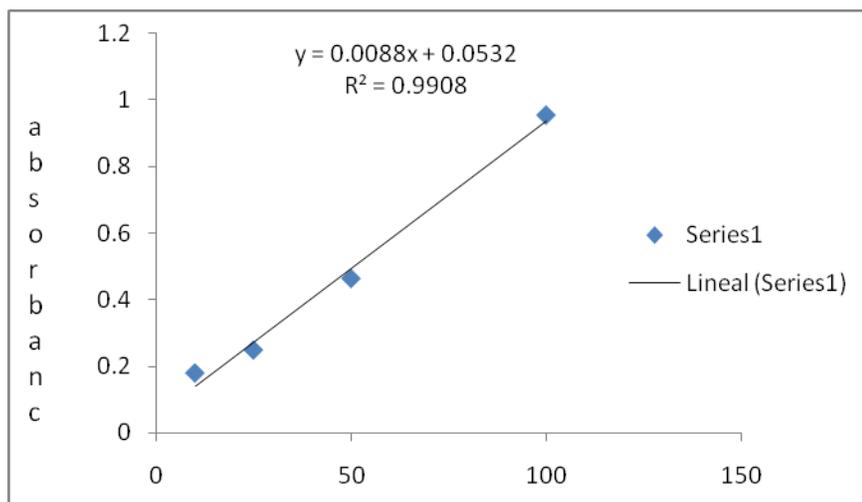


Figura 13. Curva de estándares de TNF- α . Concentraciones diferentes de TNF- α fueron utilizadas para construir una curva de calibración.

A partir de estas absorbancias se determinó la concentración de TNF- α inducida en las diferentes muestras obteniendo los resultados mostrados en la Figura 14. Donde podemos apreciar que en los tratamientos donde utilizamos BCG, AdLacZ e incluso el AdESAT-6 liberan alrededor de 20 pg/ml y no existe una diferencia significativa entre ellos. Sin embargo si comparamos estos grupos con aquellos que están fusionados a calreticulina como adyuvante podemos observar una mayor cantidad de TNF- α cuantificado la cual es significativamente diferente ($P < 0.05$).

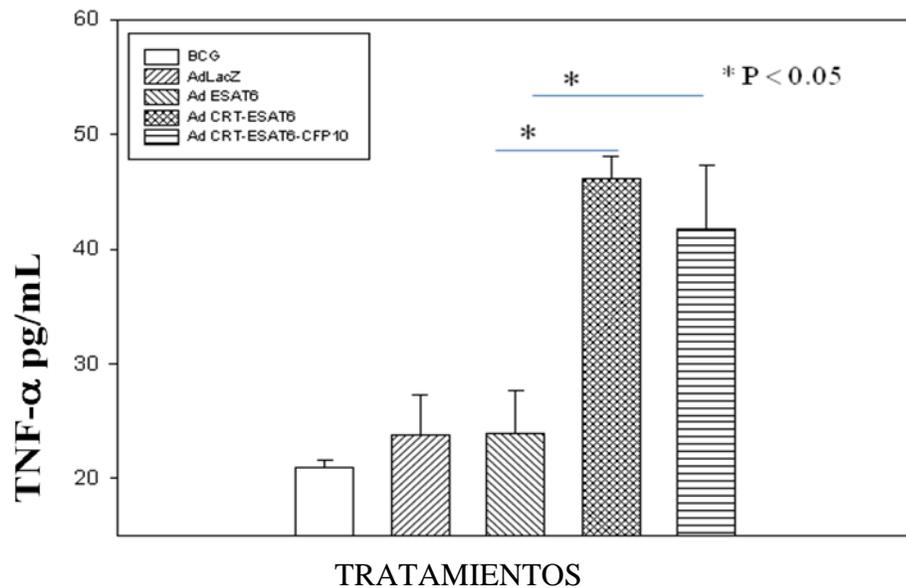


Figura 14. TNF- α liberado por las células del bazo en respuesta al reestímulo con ESAT6. Grupos de ratones fueron inmunizados con 5×10^7 ufp de cada adenovirus recombinante, posterior a las 4 semanas se extrajo las células del bazo y se estimularon *in vitro* con ESAT-6. La cantidad de TNF- α liberada en el medio se midió por el método de ELISA.

Por otro lado para analizar la respuesta de inducción de IFN- γ se utilizó la técnica de ELISPOT de acuerdo a lo descrito en la metodología. Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 15. Nuevamente se observa la presencia de una inducción significativa de IFN- γ usando los antígenos fusionados a calreticulina

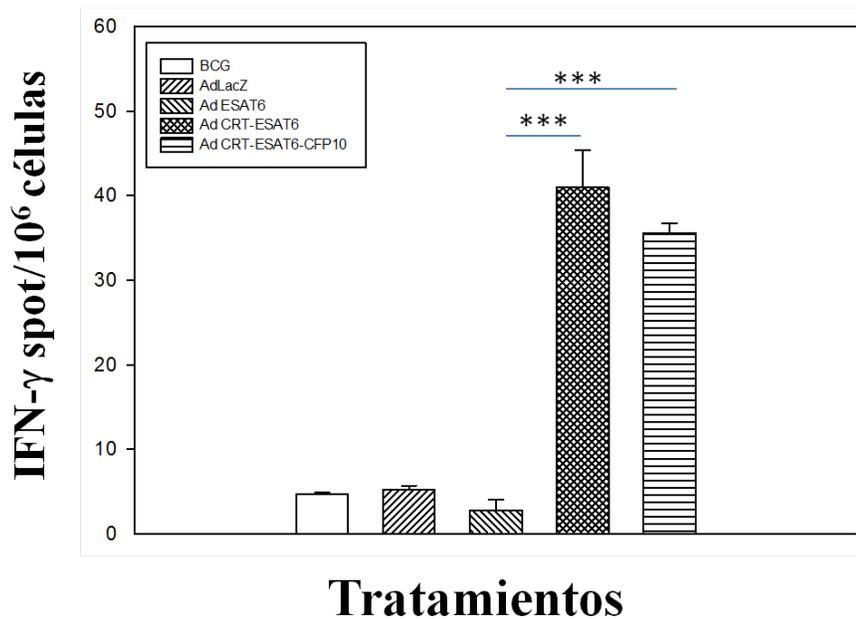


Figura 15. Células del bazo productoras de IFN- γ al reestímulo con ESAT6. Grupos de ratones se inmunizaron con 5×10^7 ufp de cada adenovirus recombinante, posterior a las 4 semanas se extrajo las células del bazo y se estimularon *in vitro* con la proteína ESAT-6. La cantidad de células productoras de IFN- γ se cuantificó por el método de ELISPOT.

*** $P < 0.001$

Cuando evaluamos la respuesta inmune de las células del bazo de los ratones tratados con adenovirus que expresan la proteína CFP10, tanto para TNF- α (Figura 16) como IFN- γ (Figura 17) obtuvimos resultados diferentes a los obtenidos con ESAT6.

El tratamiento con el adenovirus expresando CFP10 incrementó la inducción específica de TNF- α al estimular con CFP10, sin embargo esta respuesta no únicamente no se mejoró con la presencia de calreticulina sino que mostró niveles similares a los controles negativos. Por el contrario CFP10 en el contexto de Calreticulina y ESAT-6 (Ad CRT-ESAT6-CFP10) si mostró un incremento todavía mayor que el inducido por el Ad CFP10.

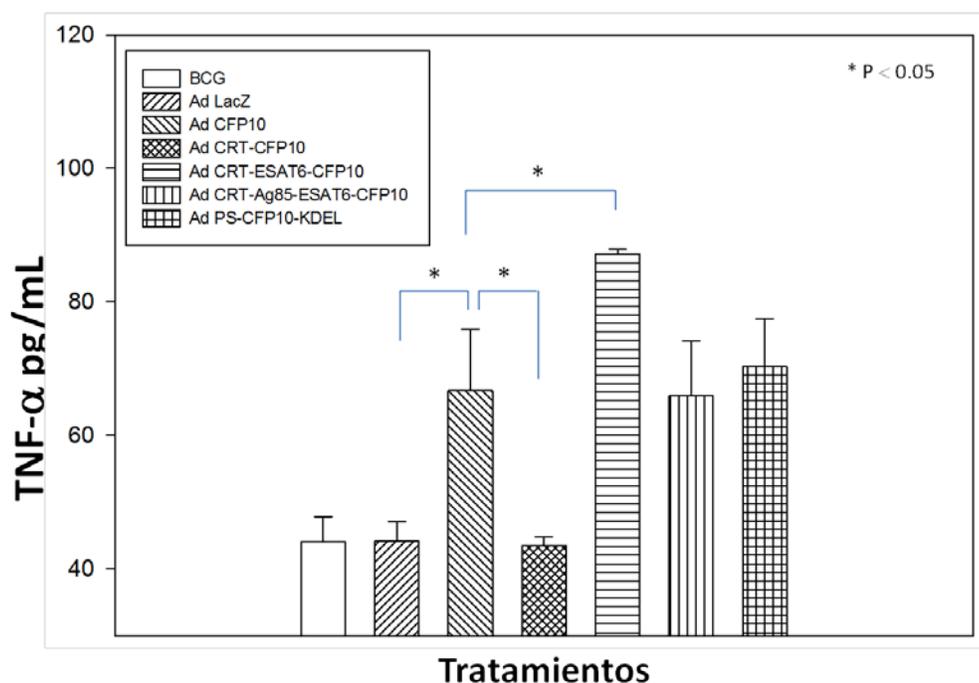


Figura 16. TNF- α liberado por las células del bazo al reestímulo con CFP10. Grupos de ratones se inmunizaron con 5×10^7 ufp de cada adenovirus recombinante, posterior a las 4 semanas se extrajeron las células del bazo y se estimularon *in vitro* con CFP10. La cantidad de TNF- α liberada en el medio se midió por el método de ELISA.

Los Adenovirus que expresan CFP10 en el contexto de la triple fusión (Ad CRT-Ag85-ESAT6-CFP10) o con las señales de envío y retención a retículo endoplásmico (Ad PS-CFP10-KDEL) mostraron una inducción significativa en comparación con los controles negativos, pero similar a la obtenida con el Ad CFP10. El patrón de respuesta a la inducción específica de IFN- γ (Figura 17) mostró un patrón similar al de la inducción de TNF- α (Figura 16).

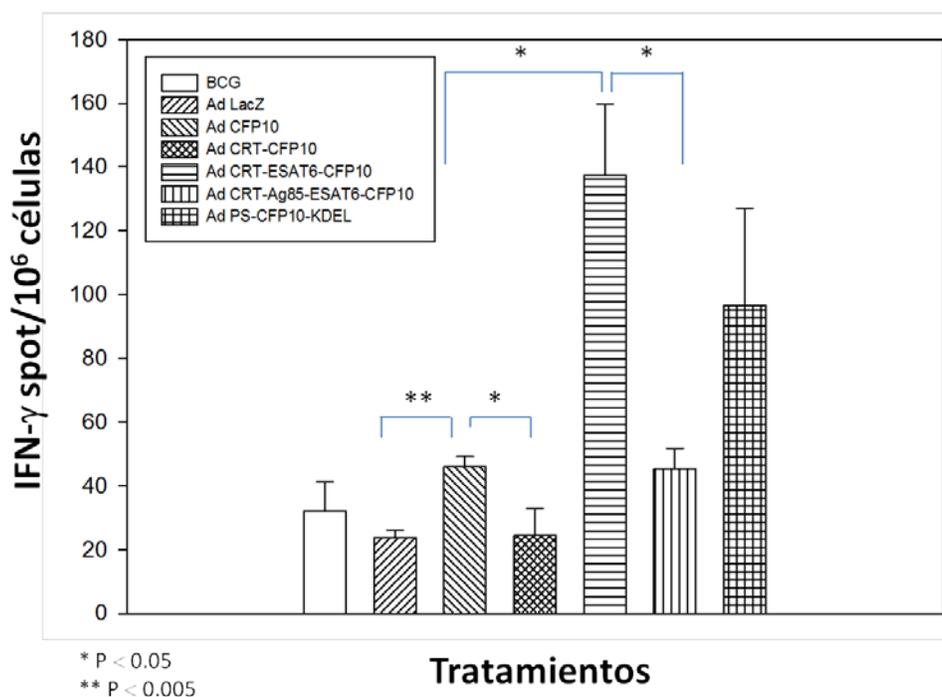


Figura 17. Células del bazo productoras de IFN- γ al reestímulo con CFP10. Grupos de ratones fueron inmunizados con 5×10^7 ufp de cada adenovirus recombinante, posterior a las 4 semanas se extrajo las células del bazo y se estimularon *in vitro* con la proteína CFP10. La cantidad de células productoras de IFN- γ se cuantificó por el método de ELISPOT.

4.7 Evaluación de la eficiencia de Protección

Para evaluar la protección de estos adenovirus recombinantes en animales retados con la bacteria de *Mycobacterium tuberculosis* trabajamos con ratones de la cepa C57BL/6. Estos ratones se inmunizaron vía intranasal con una dosis de adenovirus igual a la previamente ensayada en los experimentos de respuesta inmune. Cuatro semanas posteriores a la inmunización se infectaron con la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* para mimetizar una infección en los ratones. A los 30 días siguientes se cuantificó la cantidad de bacterias presentes en extractos de bazo y pulmón.

Contrario a lo que esperábamos ninguno de nuestros tratamientos presentó una disminución en la carga bacteriana, ya que se había observado una buena inducción de la síntesis de citocinas IFN- γ y TNF- α ⁸, las cuales ya se ha determinado que son de importancia fundamental para controlar la infección causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 18). Como se observa en la Figura los niveles de bacteria fueron similares entre los controles negativos y los inmunizados con los adenovirus, solo el control positivo (inmunización con BCG) mostró una reducción significativa en el número de bacterias presentes en el bazo.

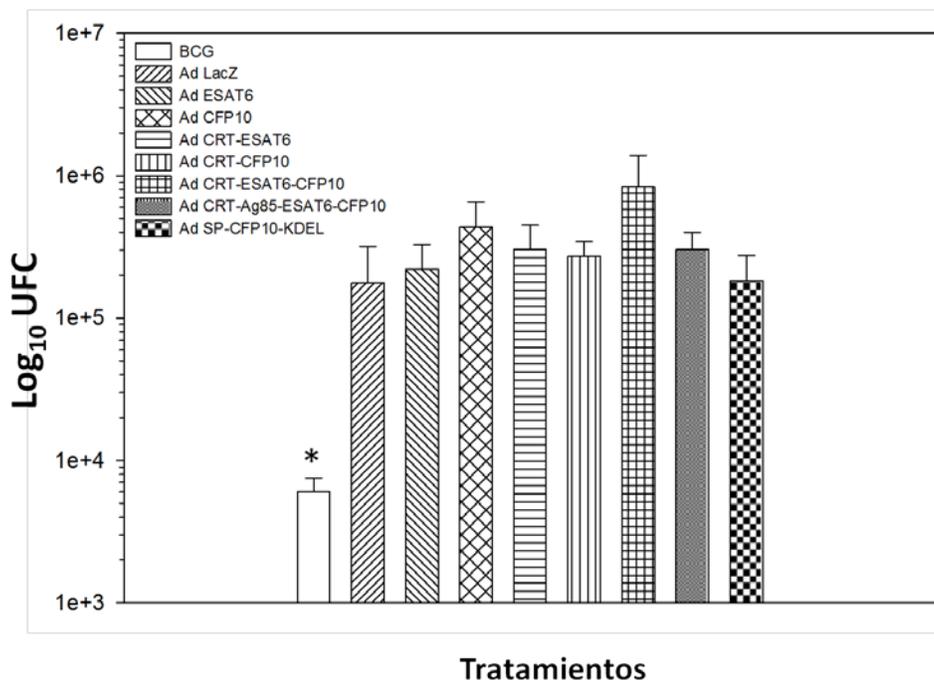


Figura 18. Niveles de *Mycobacterium tuberculosis* en el bazo de ratones inmunizados con adenovirus expresando antígenos de *Mycobacterium*. Conteo de UFC en el bazo. Ratones previamente inmunizados se infectaron con *Mycobacterium tuberculosis*, 4 semanas posterior a la infección los ratones se sacrificaron y se extrajo el bazo para cuantificar la UFC.

De igual manera se evaluó la cantidad de carga bacteriana en los pulmones de los ratones. Como lo muestra la Figura 19 podemos observar que no existe alguna diferencia significativa en la reducción de carga bacteriana entre los controles negativos y los inmunizados con Adenovirus expresando antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo nuevamente utilizando la BCG, que es considerada el estándar de oro para comparar la eficiencia de las vacunas en fase experimental, observamos cómo ésta si redujo significativamente la cantidad de bacterias en los pulmones.

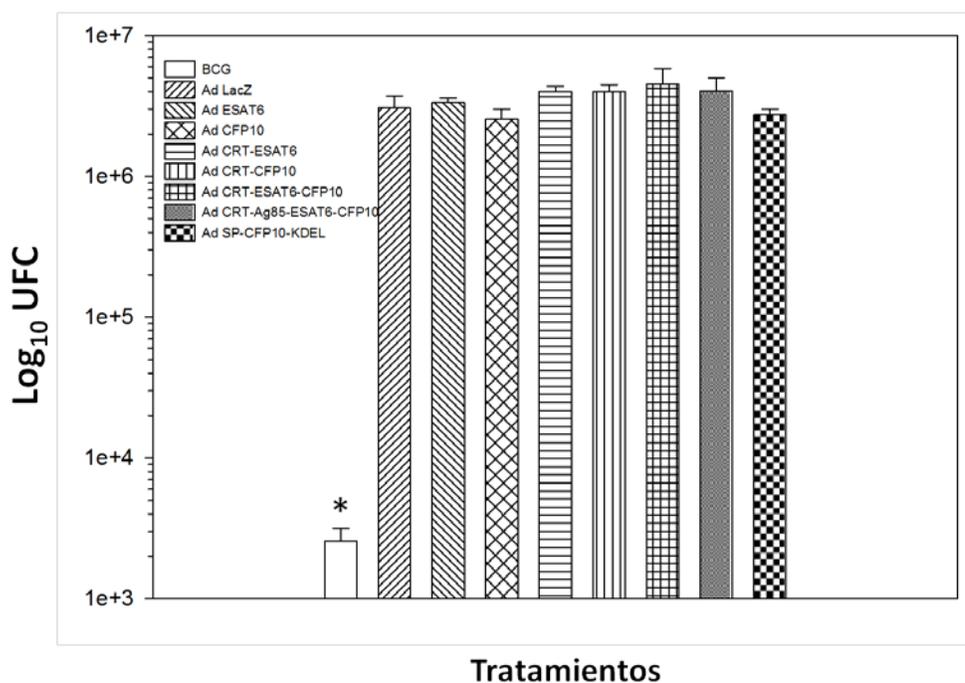


Figura 19. Niveles de *Mycobacterium tuberculosis* en los pulmones de ratones inmunizados con adenovirus expresando antígenos de *Mycobacterium*. Conteo de UFC en el pulmón. Ratones previamente inmunizados fueron infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, 4 semanas posterior a la infección los ratones se sacrificaron y se extrajo los pulmones para cuantificar la UFC.

CAPÍTULO V

DISCUSIONES

La tuberculosis es una enfermedad que ha afectado a la humanidad desde hace mucho tiempo. Durante algún tiempo esta enfermedad fue controlada con la vacuna desarrollada a partir de *Mycobacterium bovis* la que hoy conocemos como BCG. Sin embargo, diferentes factores han hecho que en la actualidad tengamos un incremento en la tasa de mortalidad de personas infectadas con tuberculosis. Algunos de estos factores que han influido son: la ineficiencia de la BCG donde se ha reportado una protección del 0-80% dependiendo del tipo de cepa utilizada, la población donde se aplica, los polimorfismos asociados con la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, y por consecuencia alteraciones del sistema inmune, favoreciendo la susceptibilidad a infecciones virales como el VIH/SIDA, metabólicas como la diabetes y aun en trasplantes que entre otras los pacientes son más vulnerables a adquirir esta enfermedad. Estos factores han hecho que en la actualidad la OMS declare un estado de reemergencia de la enfermedad, por lo cual muchas de las investigaciones están enfocadas a tratar de resolver este problema mundial.

Debido a la falta de una vacuna con alto grado de eficiencia protectora, muchas de las investigaciones más recientes se han enfocado en la utilización de diferentes antígenos inmunodominantes como Ag85, ESAT-6 y CFP-10 que están ausentes en la BCG para inducir un aumento de la respuesta inmune. Aunque se ha demostrado que algunas de estas vacunas pueden disminuir la infección, aun no se logra erradicarla por completo. Por lo cual se ha tratado de desarrollar vacunas utilizando adyuvantes que potencien la respuesta inmune de antígenos de *M. tuberculosis* con propiedad inmunopotenciadora intrínseca, por lo cual es esta la razón que nosotros utilizamos la calreticulina para llevar a cabo esta función.

La calreticulina es una proteína que se encuentra en el retículo endoplásmico, tiene dos señales muy importantes que le ayudan a llevar a cabo su función las cuales son un péptido señal (la dirige al retículo) y el KDEL (retiene en el retículo). Calreticulina participa en la formación del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Se ha

demostrado que la calreticulina puede incrementar la respuesta inmune de las proteínas que se le fusionan, esto se demostró en un modelo de cáncer cérvico uterino en ratón.

Nosotros fusionamos las proteínas Ag85B, ESAT-6 y CFP10 a calreticulina, para determinar si nos podía incrementar la respuesta inmune y posteriormente evaluar si este incremento nos ayuda a proteger contra la infección. En un primer plano pudimos observar la funcionalidad de los adenovirus recombinantes ya que en todas las inmunofluorescencias detectamos la presencia de las proteínas recombinantes. Una vez comprobada la funcionalidad procedimos a evaluar si calreticulina incrementa la respuesta inmune celular específica del antígeno que empleamos en la fusión. Analizando los resultados obtenidos con el antígeno ESAT-6 podemos observar que las determinaciones de IFN- γ y TNF- α confirman nuestra teoría; ya que cuando comparamos los resultados obtenidos por los adenovirus recombinantes que expresan a Calreticulina se observa una diferencia significativa que cuando no está presente. Analizando los datos cuando las células se reestimularon en cultivo con CFP10, se observa un comportamiento diferente a cuando se reestimularon con ESAT-6, ya que cuando Calreticulina se fusionó a CFP10 mostró una disminución en la síntesis de las citocinas analizadas, que no fue significativamente diferente que el control LacZ. Esto puede deberse a que la secuencia del control CFP10 tiene 6 aminoácidos de diferencia comparada con la fusión CRT-CFP10. Sin embargo cuando analizamos las demás fusiones podemos concluir que en ambos casos el adenovirus recombinante que mejor respuesta inmune produjo fue la fusión de CRT-ESAT-6-CFP10.

Como ya se había demostrado en reportes previos que tanto el IFN- γ como TNF- α tienen una participación importante en el control de la infección causada por *M.tuberculosis* esperábamos que la respuesta generada por los adenovirus recombinante ayudara a combatir la infección. Sin embargo cuando los ratones inmunizados por los diferentes adenovirus fueron infectados con la bacteria ninguno fue capaz de controlar la infección comparado con el estándar de oro BCG, por lo cual se deberá de corroborar estos resultados bajo otras condiciones experimentales e incluir nuevos experimentos que nos brinden mayor información para determinar las posibles causas de este efecto negativo.

Algunas de las posibles causas para explicar este resultado son en primer lugar lo que muchos autores han reportado que las células T CD4+ tienen el papel principal en el control de la infección, y si tomamos en cuenta que en la estrategia empleamos vectores

adenovirales de los que ya se conoce que el vector *per se* tiene preferencia a estimular células T CD8+, esto aunado al mecanismo que calreticulina presenta para montar una respuesta inmune celular de tipo citotóxica, lo que nos estaría encaminando a una respuesta preferentemente células T CD8+. Para corroborar estos datos podríamos realizar ensayos de doble marcaje analizando el marcador de superficie y una tinción intracelular de interferón gamma y así determinar el porcentaje de células activadas por los adenovirus. También podemos pensar que los epítopes derivados de nuestros adenovirus no son los más adecuados para proteger; esto ya se había reportado previamente con otras vacunas adenovirales para tratar de controlar la infección de *Mycobacterium tuberculosis*. En este caso los autores utilizaron la fusión Ag85B-ESAT6 y no observaron protección, realizaron una serie de ensayos posteriores llegando a la conclusión de que las fusiones alteran el patrón de los epítopes y si se fracciona la proteína podemos encontrar el o los epítopes más inmunoprotectores para el control de la infección.²⁷ Además ya se ha reportado que en cada cepa de ratón utilizada para la evaluación de posibles vacunas contra *Mycobacterium tuberculosis* los resultados son diferentes y las que han obtenido resultados favorables empleando vectores adenovirales son en las cepas Balb/c, ya que en esta cepa recientemente se reportó que es suficiente la repuesta de las células T CD8+ para el control de la infección mientras que en la cepa C57BL/6 se necesita un balance entre las células CD8 y CD4.

Otro de los puntos que es importante de resaltar en nuestros ensayos que pudiera explicar la discrepancia entre comparar los resultados del estímulo con CFP10 y ESAT-6, es que la construcción de CFP10 del vector sin calreticulina, es diferente a los demás debido a que éste no tiene ningún sitio de restricción adicional comparado con nuestras demás construcciones que si presentan sitios adicionales en fase de lectura. Estos sitios son remanentes de la construcción original (calreticulina-Ag85B-ESAT-6-CFP10) a partir de la cual se generaron las diferentes construcciones por medio de deleciones. Es posible que estos sitios cambien la estructura permitiendo exponer otros epítopes diferentes a los comparados con aquellos que tienes algunos sitios intermedios, y que esto pudiera incrementar los niveles de interferon gamma y factor de necrosis tumoral como se observa en las gráficas.

Para tratar de mejorar nuestros resultados proponemos analizar otras dosis y evaluar desde 5×10^7 hasta 10^{10} , así como cambiar la ruta empleada utilizando la vía intramuscular, utilizar una cepa diferente de ratón, así como evaluar los adenovirus restantes construidos en este proyecto.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

En este trabajo se construyeron diferentes adenovirus recombinantes que expresan antígenos de *M.tuberculosis*. Los adenovirus recombinantes que expresan a calreticulina incrementaron la respuesta inmune celular específica de antígeno, sin embargo en las condiciones empleadas en este trabajo no mostraron un efecto de protección contra la infección producida por *Mycobacterium tuberculosis in vivo*.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS

1. Schluger, N. The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**, 251-256 (2005).
2. Castillo-Rodal, A., *et al.* Mycobacterium bovis BCG substrains confer different levels of protection against Mycobacterium tuberculosis infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* **74**, 1718-1724 (2006).
3. Sasseti, C. & Rubin, E. The open book of infectious diseases. *Nat Med* **13**, 279-280 (2007).
4. Kochi, A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* **72**, 1-6 (1991).
5. von Reyn, C. & Vuola, J. New vaccines for the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis* **35**, 465-474 (2002).
6. Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V. & Raviglione, M.C. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* **282**, 677-686 (1999).
7. Raja, A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* **120**, 213-232 (2004).
8. van Crevel, R., Ottenhoff, T. & van der Meer, J. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 294-309 (2002).
9. Smith, I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* **16**, 463-496 (2003).
10. Ernst, J. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **66**, 1277-1281 (1998).
11. Houben, E., Nguyen, L. & Pieters, J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr Opin Microbiol* **9**, 76-85 (2006).
12. Grosset, J. Mycobacterium tuberculosis in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 833-836 (2003).
13. Schluger, N. & Rom, W. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 679-691 (1998).
14. North, R. & Jung, Y. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **22**, 599-623 (2004).
15. Harper, C. Tuberculosis, a neglected opportunity? *Nat Med* **13**, 309-312 (2007).
16. Kaufmann, S.H. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. *Nat Rev Immunol* **6**, 699-704 (2006).
17. Skeiky, Y. & Sadoff, J. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol* **4**, 469-476 (2006).

18. Brodin, P., Rosenkrands, I., Andersen, P., Cole, S. & Brosch, R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol* **12**, 500-508 (2004).
19. Takayama, K., Wang, C. & Besra, G. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* **18**, 81-101 (2005).
20. Santosuosso, M., McCormick, S., Zhang, X., Zganiacz, A. & Xing, Z. Intranasal boosting with an adenovirus-vectored vaccine markedly enhances protection by parenteral *Mycobacterium bovis* BCG immunization against pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* **74**, 4634-4643 (2006).
21. Xing, Z. & Lichty, B. Use of recombinant virus-vectored tuberculosis vaccines for respiratory mucosal immunization. *Tuberculosis (Edinb)* **86**, 211-217 (2006).
22. Vordermeier, H., Huygen, K., Singh, M., Hewinson, R. & Xing, Z. Immune responses induced in cattle by vaccination with a recombinant adenovirus expressing Mycobacterial antigen 85A and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* **74**, 1416-1418 (2006).
23. Brandt, L., *et al.* The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *Infect Immun* **72**, 6622-6632 (2004).
24. Skeiky, Y.A., *et al.* Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol* **172**, 7618-7628 (2004).
25. Doherty, T., *et al.* Comparative analysis of different vaccine constructs expressing defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **190**, 2146-2153 (2004).
26. Dietrich, J., *et al.* Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guerin immunity. *J Immunol* **177**, 6353-6360 (2006).
27. Bennekov, T., *et al.* Alteration of epitope recognition pattern in Ag85B and ESAT-6 has a profound influence on vaccine-induced protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* **36**, 3346-3355 (2006).
28. Rosa-Calatrava, M., Grave, L., Puvion-Dutilleul, F., Chatton, B. & Kedinger, C. Functional analysis of adenovirus protein IX identifies domains involved in capsid stability, transcriptional activity, and nuclear reorganization. *J Virol* **75**, 7131-7141 (2001).
29. Nemerow, G.R. & Stewart, P.L. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 725-734 (1999).
30. Michalak, M., Corbett, E., Mesaeli, N., Nakamura, K. & Opas, M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* **344 Pt 2**, 281-292 (1999).
31. Zhang, Y. & Williams, D. Assembly of MHC class I molecules within the endoplasmic reticulum. *Immunol Res* **35**, 151-162 (2006).
32. Gomez-Gutierrez, J., *et al.* Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 997-1007 (2007).

33. Park, Y.S., Lee, J.H., Hung, C.F., Wu, T.C. & Kim, T.W. Enhancement of antibody responses to *Bacillus anthracis* protective antigen domain IV by use of calreticulin as a chimeric molecular adjuvant. *Infect Immun* **76**, 1952-1959 (2008).
34. Ginsberg, A.M. & Spigelman M. Challenges in Tuberculosis drug research and development. *Nature Medicine* **13**, 290-294 (2007).
35. Russell, D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis?. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 39-47(2007).
36. Ferraz, J.C., et al. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **39**, 1387-1397 (2006).
37. Harries, A.D. & Dye, C. Centennial Review, Tuberculosis. *Annals of tropical medicine & parasitology*. **100**, 415-431 (2006).
38. Honer Zu Bentrup, K. & Russell, D.G. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends in Microbiology* **9**, 597-606 (2001).