

DEDICATORIA

Al único y sabio Dios sea honor y gloria mediante Jesucristo por los siglos de los siglos Amén. 1Tim 1-17.

Los muchachos se fatigan y se cansan, los jóvenes flaquean y caen, pero los que esperan en Jehová tendrán nuevas fuerzas; levantarán alas como las águilas, correrán y no se cansarán, caminarán y no se fatigarán. Isa 40: 30-31.

Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora. Ecl.3-1.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi Señor el Dios Altísimo, por su misericordia, gracia y amor, y por la vida de las personas que usa para conocerlo un poco más cada día de mi vida.

A mis papitos Mary Luz y Alejandro, quienes se dedicaron a darme buena enseñanza, además de adquirir sabiduría, también por todos sus esfuerzos a lo largo de mi vida. A Carito, Eli y Alejandrito, por su apoyo de toda la vida, consejos y dedicación. A Elenita, Franky, Alejandra y a Janer, por hacer parte de mi existencia. A Martha, Jessica, Anyela, Valentina, Mila, Danielito, Franklin, Alejandro, Ruth, Valeria, Anita y demás familiares por su acompañamiento.

A la Universidad de Rosario por permitirme ingresar al programa de Doctorado y por su apoyo a lo largo de todo este tiempo, especialmente a las Doctoras Carolina Ramírez y Luisa Matheus.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia y a Profesor Manuel Elkin Patarroyo, por configurar una Institución de alto compromiso con el desarrollo educativo del país, en donde pude aprender no sólo ciencia en un nivel superior, sino conocer personas y tener experiencias inolvidables. A la Doctora Marisol Ocampo Cifuentes, por darme la oportunidad de trabajar con ella, brindarme su importantísima ayuda y guía en la realización del doctorado y por este tiempo de vida que hemos tenido juntas. Al Doctor Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez por abrirme las puertas para desarrollarme como investigadora, por su guía, apoyo y conocimientos aportados a lo largo de estos años, que no sólo tuvieron mella en mi vida académica. A Doctora Diana Diaz por su compañerismo y valiosos aportes.

A mis compañeros de laboratorio por brindarme su colaboración y amistad: Carolina Rodríguez y Diana Díaz, por ser mis primeras compañeras en todo y acogerme en el laboratorio, a Alejandra Mantilla por sus aportes al proyecto, a Christian Sánchez quien me acompañó durante estos años y me brindo una gran ayuda, a Jonathan Salazar por ser parte de este equipo, colaborando y compartiendo sus conocimientos con los estudiantes, a Carmencita Pulido, por siempre estar ahí brindándonos su colaboración, a Adriana Barreto, Jeimy Castañeda, Yoelis Yepes, Luis Alfredo Baquero, Yahson Varela y Andrés Hernández por sus aportes y compañerismo. De forma especial quiero agradecer a los estudiantes a los cuales tuve la oportunidad de dirigirles el trabajo de grado, por su amistad y sus valiosos aportes a este proyecto: Valen Vergara, Paolita Alfonso, reconociendo de forma especial a Dani Galeano y Juan Sebas Gómez, por su gran esfuerzo y buena actitud en todo momento. A los estudiantes que hicieron su pasantía y me ayudaron mucho con su buen desempeño: Tati Tonguino, Laurita Mora, Claudia Gamboa, María Valen Hernández, Dani-Dani Salazar, Jorge Cubillos y Angie Pinillo, quienes fueron muy responsables y comprometidos. Quiero

agradecer sustancialmente a Tati Amado, que ha sido un gran apoyo en la culminación de este proyecto y ha hecho más ameno los últimos momentos de estrés.

A los integrantes de la FIDIC, en primer lugar: a Jamer Gómez, por su constante apoyo, a Oswaldo Escobar por siempre estar dispuesto a colaborar, a los profesores: Gabriela Arévalo, Marina Muñoz, Andrés Moreno, Carlos Suarez, Milena Camargo, Adriana Bermúdez, Patricia Alba, Hernando Curtidor, Magnolia Vanegas, Catalina Avendaño, Sara Soto-De León, Martha Forero y Yolanda Silva, quienes hicieron muy valiosos aportes al proyecto de doctorado, reconociendo de manera especial a César Santofimio por siempre brindarme una mano, al ingeniero Edwin Ramírez, por su apoyo logístico invaluable y darle solución a cada problemota que le llevaba hasta en los últimos momentos, a Jorge Aza, María Laura Pabón, Vicente Amaya, Rigoberto Gutiérrez, Rosa Garzón, Jimena Castañeda, Zoris Junco, Blanca Sánchez por su apoyo durante estos años.

A mis compañeros de doctorado: Nury Olaya, Diego Ordoñez, Milena Maya, Marcela López por el apoyo logístico y humano en el desarrollo de la investigación y de forma especial a Caro López, Moni Ararat, por todos estos años de amistad, de apoyo y enseñanza, a Carmen Celis, Oscar Rodríguez por su compañerismo y apoyo.

A los Doctores: Giovanni Rodríguez, Luisa Murcia, Ricardo Lutz, Alejandra Izquierdo, la jefe Natalia Moreno y a la auxiliar Zoraida Bonilla por recibirme en la pasantía, aportarme con sus conocimientos acerca de la tuberculosis y acogerme con calidez.

A los Jurados de mi tesis, por sus observaciones y dedicación al proyecto de grado, los Doctores: Bruno Rivas-Santiago, Carlos Yesid Soto Ospina y Julián Esteban Muñoz Henao.

A Colciencias por el otorgamiento del crédito beca condonable.

Y a todas las personas que de una u otra manera me han ayudado en este proceso.



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA *in vitro* PARA LA EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS
PEPTÍDICOS CANDIDATOS A VACUNA CONTRA TUBERCULOSIS

PRESENTADO POR:

MARY LILIÁN CARABALÍ ISAJAR

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
PROGRAMA ACADÉMICO DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y
BIOLÓGICAS
BOGOTÁ D.C
2023

DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA *in vitro* PARA LA EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS
PEPTÍDICOS CANDIDATOS A VACUNA CONTRA TUBERCULOSIS

MARY LILIÁN CARABALÍ ISAJAR

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de Doctor en
Ciencias Biomédicas

Directora

MARISOL OCAMPO CIFUENTES PhD

Profesor Titular

Facultad de Ciencias Matemáticas y Naturales

Universidad Distrital de Colombia

Coordinador Grupo Funcional Tuberculosis

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC

Codirector

MANUEL ALFONSO PATARROYO GUTIÉRREZ M.D., Dr.Sc.

Profesor Asociado

Departamento de Microbiología

Facultad de Medicina

Universidad Nacional de Colombia

Director Científico y

Coordinador Grupo Funcional Biología Molecular e Inmunología

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

PROGRAMA ACADÉMICO DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y

BIOLÓGICAS

BOGOTÁ D.C

2023

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	5
4.1. Tuberculosis.....	5
4.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y el complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC)	6
4.3. Inmunología de la tuberculosis	8
4.4. Desarrollo de vacunas contra la tuberculosis	13
4.5. Ensayos <i>in vitro</i> en la evaluación de candidatos a vacuna contra tuberculosis.....	16
5. OBJETIVOS	18
5.1. General	18
5.2. Específicos	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1. <i>Selección de nuevas proteínas e identificación de HABPs que inhiban la entrada de Mtb</i>	20
6.1.1. Caracterización de proteínas <i>in silico</i>	20
6.1.2. Obtención de micobacterias	20
6.1.3. Presencia y transcripción de genes	21
6.1.4. Síntesis de péptidos	21
6.1.5. Estructura secundaria de los péptidos	22
6.1.6. Ensayo receptor-ligando	22
6.1.7. Ensayo de inhibición de la entrada de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
6.1.8. Antigenicidad de los péptidos derivados de la proteína Rv3587c con pacientes TBA, TBL y Donantes sanos	23
6.1.9. Selección de péptidos nativos y predicción de la unión de HLA-DR β con péptidos modificados	23
6.2. Presentación antigénica de péptidos modificados de las proteínas de <i>Mtb</i> a Linfocitos ..	24
6.2.1. Selección de los grupos de estudio	24
6.2.2. Presentación de los péptidos seleccionados	25
6.2.2.1. Obtención de PMBCs y plasmas	25
6.2.2.2. Linfoproliferación y evaluación de citoquinas Th1, Th2 y Th17.....	25
6.3. <i>Determinación de la función efectora de LT activados por péptidos candidatos en macrófagos infectados</i>	266

6.3.1 Co-cultivos de linfocitos estimulados y macrófagos infectados.....	266
6.4. <i>Evaluación de la función efectora de anticuerpos antígeno-específicos</i>	26
6.4.1. Determinación de la presencia de inmunoglobulinas afines a péptidos modificados en sueros humanos	26
6.4.2. Obtención de anticuerpos específicos dirigidos contra péptidos modificados	277
6.4.3. Ensayos función efectora de anticuerpos	27
6.4.3.1. Inhibición de la entrada de <i>Mtb</i> a la línea humana de macrófagos U937	27
6.4.3.2. Evaluación de activación de células polimorfonucleares (PMN) dependiente de anticuerpo	27
6.5. <i>Modelo animal primate no humano</i>	288
6.5.1. Grupo experimental	288
6.5.2. Inmunización.....	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1. Identificación de péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de <i>Mtb</i> H37Rv involucrados en la interacción hospedero-patógeno.	29
7.1.1. Aproximación bioinformática en la caracterización de Rv3587c.....	29
7.1.2. El gen <i>rv3587c</i> está presente y se transcribe en todas las micobacterias del estudio	29
7.1.3. Ensayos de receptor-ligando evidencian HABPs para dos líneas celulares	30
7.1.4. HABPs inhiben la invasión de <i>Mtb</i> H37Rv a macrófagos alveolares y células epiteliales.....	31
7.1.5. HABP 39265 tuvo pobre reconocimiento antigénico	32
7.1.6. Estructura secundaria de los péptidos sintéticos.....	33
7.2. Presentación antigénica de péptidos modificados de las proteínas de <i>Mtb</i> a Linfocitos ..35	
7.2.1. Selección de péptidos nativos y predicción de la unión de HLA-DR β con péptidos modificados	35
7.2.2. Linfoproliferación y evaluación de citoquinas Th1, Th2 y Th17	42
7.3. Determinación de la función efectora de linfocitos estimulados por péptidos candidatos en macrófagos infectados por <i>Mtb</i>	53
7.3.1. Co-cultivos de linfocitos estimulados por péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de <i>Mtb</i> H37Rv y macrófagos infectados con el patógeno.....	53
7.3.2. ON como agente microbicida encontrado en los sobrenadantes de co-cultivos de linfocitos estimulados por péptidos y macrófagos infectados con <i>Mtb</i>	58
7.4. Establecer la función efectora de los anticuerpos generados por linfocitos B que reconocen péptidos modificados de las proteínas de <i>Mtb</i>	62
7.4.1. Selección de péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de <i>Mtb</i> H37Rv	62

7.4.2. Determinación de la presencia de inmunoglobulinas que reconocen los péptidos modificados en sueros humanos	64
7.5. Evaluación de activación de polimorfonucleares dependiente de anticuerpo	73
7.5.1. Estandarización para la obtención de neutrófilos	73
8. RESUMEN GRÁFICO	81
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
10. PUBLICACIONES	87
11. BIBLIOGRAFÍA.....	889

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tasas de incidencias de tuberculosis en 2021 a nivel mundial, incidencia de casos por cada 100.000 habitantes, modificado de <i>WHO Global tuberculosis report 2022</i> (1).	5
Figura 2. Envoltura celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , modificado de <i>How sisters grow apart: mycobacterial growth and division</i> (56).	7
Figura 3. Resumen de la metodología para evaluar la inducción de respuesta inmune adaptativa celular y humoral por parte de antígenos candidatos a una vacuna.	20
Figura 4. Presencia y transcripción del gen <i>rv3587c</i>	30
Figura 5. Perfil de unión de los péptidos a las líneas celulares A549 y U937.	30
Figura 6. Ensayo de inhibición de la entrada de <i>Mtb</i> a las células A549 y U937.	32
Figura 7. Reconocimiento antigénico de los péptidos de Rv3587c.	33
Figura 8. Aspectos estructurales de Rv3587c	34
Figura 9. Perfil de unión de péptidos nativos (cHABPs) y modificados (mHABPs) a moléculas HLA Clase II.	37
Figura 10. Índice de linfoproliferación en células tratadas con péptidos nativos (HABPs) Y modificados (mHABPs).	43
Figura 11. Caracterización fenotípica de las poblaciones de linfocitos humanos que proliferaron en respuesta a la estimulación <i>in vitro</i> con péptidos nativos y modificados.	48
Figura 12. Citocinas producidas por linfocitos humanos en respuesta a la estimulación <i>in vitro</i> con péptidos nativos y modificados.	50
Figura 13. Ensayo de inhibición intracelular de <i>Mtb</i> en macrófagos humanos, co-cultivados con linfocitos producto de linfoproliferación de células tratadas con cHABPs y mHABPs.	56
Figura 14. Producción de Oxido nítrico en macrófagos infectados activados por linfocitos estimulados con péptidos cHABPs y mHABPs.	58
Figura 15. Análisis de citocinas evaluadas por citometría en sobrenadantes de co-cultivos en presencia de linfocitos humanos estimulados con péptidos nativos y modificados.	62
Figura 16. Ensayo de inhibición de la entrada <i>Mtb</i> a macrófagos U937 en presencia de las secuencias modificados.	63
Figura 17. Aproximación bioinformática para caracterizar los antígenos candidatos.	64
Figura 18. Reconocimiento de péptidos nativos y sus secuencias modificadas.	66
Figura 19. Ensayos de Inhibición de la entra de <i>Mtb</i> pre-incubada con sueros que reconocen antígenos micobacterianos en macrófagos humanos U937.	67
Figura 20. Purificación de anticuerpos que reconocieron el lisado de <i>Mtb</i> H37Rv.	68
Figura 21. IgG purificadas y aisladas de donantes que reconocieron péptidos nativos y modificados.	68

Figura 22. Inhibición de la entrada de micobacterias preopsonizadas con anticuerpos aislados con las cuales se infectaron macrófagos U937.	69
Figura 23. Reconocimiento antigénico de péptidos nativos y sus secuencias modificadas por primates <i>Aotus</i>	71
Figura 24. Macrófagos infectados con <i>Mtb</i> preincubada con sueros de primates no humanos inmunizados con la mezcla de péptidos sintéticos modificados.	72
Figura 25. Análisis de neutrófilos aislados de sangre periférica.	73
Figura 26. Estandarización MOI de infección para Neutrófilos.	74
Figura 27. Muerte celular de neutrófilos.	75
Figura 28. PMNs post infección de <i>Mtb</i> pretratada con los Acs que reconocen péptidos nativos y modificados.	76
Figura 29. Metodología <i>in vitro</i> para la evaluación de antígenos peptídicos candidatos a vacuna contra tuberculosis.	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Receptores implicados en el proceso de fagocitosis para <i>Mtb</i>	8
Tabla 2. Ejemplos de estrategias de evasión inmune de <i>Mtb</i>	12
Tabla 3. Vacunas en fase clínica de investigación contra tuberculosis	15
Tabla 4. Constantes fisicoquímicas de la interacción célula –HABP	31
Tabla 5. Secuencias nativas y modificadas.....	35
Tabla 6. Tipificación HLA-DRβ1 mediante Exón 2, pruebas de PPD y QuantiFERON	38
Tabla 7. Unión <i>in silico</i> de antígenos peptídicos a los alelos de los donantes incluidos en el estudio.....	40
Tabla 8. Resumen resultados de linfoproliferaciones inducidas por péptidos nativos y modificados.....	45
Tabla 9. Resultados de necrosis y apoptosis en neutrófilos humanos.....	76
Tabla 10. Correlación resultados de los Acs que reconocen péptidos nativos, modificados y su efecto en la muerte celular de neutrófilos humanos.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC:** Células Presentadoras de Antígeno (del inglés: *Antigen Presenting Cells*)
- Acs:** Anticuerpos
- BCG:** Bacilo-Calmette-Guérin de *Mycobacterium bovis*
- CCR:** Receptor de Quimioquina tipo C-C (del inglés: *Chemokine Receptor (C-C type)*)
- CDs:** Células Dendríticas
- CTL:** Linfocito T Citotóxico (del inglés: *Cytotoxic T Lymphocyte*)
- FIDIC:** Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
- GM-CSF:** Factor Estimulador de Colonia Granulocito-Monocito (del inglés: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
- HLA:** Antígeno Leucocitario Humano (del inglés: *Human Leukocyte Antigen*)
- IL:** Interleucina (del inglés: *Interleukin*)
- LN:** Nódulo Linfático (del inglés: *Lymph Nodes*)
- LB:** Linfocito B
- LT:** Linfocito T
- LTfH:** Linfocito T Folicular Ayudador (del inglés: *Lymphocytes T Follicular Helper*)
- Mtb:** *Mycobacterium tuberculosis*
- MTBC:** Complejo *Mycobacterium tuberculosis*
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- PMBCs:** Células Mononucleares de Sangre Periférica (del inglés: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
- IFN:** Interferón
- HABPs:** Péptidos de Alta Actividad de Unión (del inglés: *High Activity Binding Peptides*)
- PMs:** Péptidos Modificados
- PRR:** Receptores de Reconocimiento de Patrones (del inglés: *Pattern Recognition Receptors*)
- RR-TB:** tuberculosis con resistencia a la rifampicina
- TNF:** Factor de Necrosis Tumoral (del inglés: *Tumoral Necrosis Factor*)
- TB:** Tuberculosis
- MDR-TB:** Tuberculosis Multidrogo- Resistente (del inglés: *Multidrug-Resistant Tuberculosis*)
- TBA:** Tuberculosis activa
- TBL:** Tuberculosis Latente
- TGF:** Factor de Crecimiento Transformante (del inglés: *Transforming Growth Factor*)
- TLR:** Receptor de tipo Toll (del inglés: *Toll like Receptors*)
- XDR-TB:** Tuberculosis extensamente resistente a los medicamentos (del inglés: *Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*)

1. RESUMEN

Pese a los esfuerzos mundiales por erradicar la tuberculosis, esta enfermedad persiste entre las primeras causas de muerte por un agente infeccioso a nivel mundial, aún por encima del VIH y superada sólo por el SARS COV-2, siendo la causa de muerte de 1,5 millones de personas en 2021. Lo anterior se suma a los crecientes casos de tuberculosis producto de cepas micobacterianas multirresistentes y extensivamente resistentes. La actual vacuna BCG, que es la única avalada por OMS, es ineficiente para conferir protección a la mayoría de la población frente a la forma más prevalente de la enfermedad. *Mycobacterium tuberculosis* es el principal agente causal de la tuberculosis y posee muchos mecanismos para evadir la respuesta inmune que despliega el hospedero como defensa frente a la infección; por tal razón, es preciso generar una vacuna que confiera una mejor respuesta a la actualmente obtenida con la BCG. Sin embargo, la falta de un modelo en donde se puedan evaluar los candidatos a vacuna y correlacionarlo con protección en humanos, ha sido una de las mayores limitantes en el desarrollo de dicha vacuna. De ahí que se están considerando los ensayos *in vitro* como una alternativa viable en esta tarea. Algunos de estos ensayos han permitido evidenciar la inhibición del crecimiento bacteriano intracelular, estudiándose tanto el efecto de la respuesta celular como de anticuerpos, citoquinas y quimioquinas efectoras involucradas en este proceso. Por otra parte, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia ha buscado antígenos candidatos para el diseño de una vacuna sintética antituberculosis, mediante una metodología robusta, lógica y racional, con la cual se han identificado péptidos derivados de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* que pueden estar involucrados en la interacción micobacteria-célula hospedera; no obstante, no se ha evaluado la inmunogenicidad de estos péptidos o de sus secuencias modificadas en cuanto al potencial protector contra *Mycobacterium tuberculosis*. Por lo tanto, el presente proyecto planteó realizar diferentes ensayos *in vitro* con células humanas, para evaluar la posible respuesta inmune protectora que pudieran conferir los péptidos candidatos a vacuna.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, cuyo principal agente etiológico es *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2020 esta enfermedad causó la muerte de 1,6 millones de personas, siendo 1,4 millones pacientes VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) negativos y 0,18 millones VIH positivos; así, la TB se sitúa entre las 10 principales causas de muerte por agentes infecciosos a nivel mundial (1). Además, se reportaron 450.000 casos de TB producidos por cepas rifampicina - resistentes (RR-TB) o cepas bacterianas multidrogo-resistentes (TB-MDR). Es importante resaltar que, además de los casos clínicos sintomáticos, se estima que 23% de la población mundial presenta tuberculosis latente (TBL), es decir, 1,7 billones de personas están en riesgo de desarrollar la fase activa de la enfermedad (1).

Teniendo en cuenta las alarmantes estadísticas, se hace necesario intensificar los esfuerzos para abordar el problema de la TB, por tanto, se han planteado diferentes estrategias como la detección temprana y proporcionar un tratamiento adecuado; no obstante, la mejor estrategia para contrarrestar una enfermedad infecciosa es el desarrollo de vacunas (1). En la actualidad, la única vacuna avalada por la OMS es la derivada del bacilo *Mycobacterium bovis* de Calmette y Guérin (vacuna BCG), ésta se administra en neonatos hasta los 6 meses de edad y protege en niños de la meningitis tuberculosa y tuberculosis diseminada, no obstante, no previene la infección primaria en adultos o la reactivación de la infección pulmonar latente, que es la forma más frecuente de la enfermedad (2).

Dada la alta prevalencia de la TB, es urgente una vacuna que confiera una protección eficiente, pues se sabe que, en la mayoría de los casos, el tiempo de protección de la BCG oscila entre 10 y 15 años (2). Desde hace varios años, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) se ha enfocado en la búsqueda de antígenos que puedan ser considerados como candidatos en el diseño de una vacuna contra la TB, siguiendo una metodología lógica y racional. Mediante una aproximación funcional, se han identificado péptidos derivados de las proteínas de *Mtb* localizadas en su envoltura celular, que podrían estar involucrados en la interacción micobacteria-célula hospedera (3–22).

Si bien la búsqueda de tales antígenos es fundamental para el diseño de la vacuna, también lo es disponer de un modelo de evaluación apropiado que permita evidenciar la inmunogenicidad de los péptidos, con el objetivo de determinar si la respuesta inducida es capaz de inhibir la entrada de *Mtb* a células humanas, por lo cual, los ensayos *in vitro* son la mejor alternativa.

En el momento, no se cuenta con un modelo animal validado para estudios de la TB, debido a la carencia de una correlación entre el sistema inmune de los modelos experimentales animales y el del humano; por esta razón, varios candidatos a vacuna que han resultado muy promisorios en las fases preclínicas, han resultado no ser lo suficientemente efectivos al evaluarse en las fases clínicas (23).

En este aspecto, se han utilizado diferentes modelos preclínicos como murinos, los cuales han representado un rol fundamental en investigación, por las facilidades que ofrecen relativas a su mantenimiento, disponibilidad de reactivos y la ventaja de tener cepas *knockout*, entre otras, lo que ha permitido evaluar algunas condiciones inmunológicas que reducen el crecimiento de *Mtb* (24,25); a pesar de lo anterior, al comparar la respuesta inducida con la obtenida en humanos, no hay buena correlación inmunológica, y la infección latente (forma más común de la TB en el humano) no ocurre naturalmente en este modelo (23).

Por otra parte están los cobayos, que presentan manifestaciones de la enfermedad similares a las del humano, como son los granulomas con necrosis central, rodeada por macrófagos y células gigantes multinucleadas (26); además, se han encontrado características inmunes similares a las del hombre, como por ejemplo las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), el sistema de complemento, la regulación transcripcional en la expresión de IFN- γ , la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), el correceptor CD8, la expresión génica de citoquinas y RANTES (ligando de quimioquina CCL5), importante en la formación del granuloma durante la infección, a través del reclutamiento de linfocitos T (27). No obstante, el uso de este modelo plantea dificultades por la oferta de reactivos específicos para la detección de la respuesta inmune y caracterizar poblaciones celulares, citoquinas, así mismo para realizar *knockouts*, lo cual podría informar acerca del rol de estos elementos en la respuesta inmune contra la infección (25,26,28).

Otros organismos en los cuales se han realizado investigaciones previas son los primates no humanos, que por su cercanía evolutiva pueden ofrecer una mejor correlación inmune y por tanto conferir un mayor valor predictivo (29–32), a pesar de ello, el uso de los mismos puede verse restringido debido a su disponibilidad y mantenimiento.

Lo anteriormente expuesto permite sugerir que los ensayos *in vitro* con células humanas, podrían ofrecer un acercamiento a la respuesta inmune celular y humoral esperada *in vivo*, por lo cual se proponen una serie de ensayos para evaluar el potencial efecto protector de los candidatos a vacuna, aplicables tanto en el campo de la tuberculosis, como en la investigación de otras enfermedades y vacunas humanas (33–38).

3. JUSTIFICACIÓN

Las estadísticas de la TB muestran que anualmente sigue afectando a millones de personas en el mundo (1). El desarrollo de una vacuna eficaz para combatir esta enfermedad, que se ha reconocido como la mejor alternativa para controlar su diseminación, presenta varias dificultades entre las que se encuentra la historia evolutiva que comparten el hospedero humano y el huésped micobacteriano, los diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero, la falta de biomarcadores de protección y la carencia de modelos animales con carácter predictivo (39–41).

La reunión del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (*NIAID*, del inglés *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*) del 2017, titulada “*The Impact of Mtb Immune Evasion on Protective Immunity: Implications for TB Vaccine Design*”, concluyó que es necesario desarrollar ensayos *in vitro* para evidenciar el efecto de vacunas, pues éstos ayudarían a seleccionar candidatos más eficientemente. Se menciona también, que comparar candidatos en diferentes modelos animales conferiría confiabilidad y robustez a los experimentos, sin embargo, en el momento no se dispone de dicho modelo animal. Como consecuencia, los ensayos *in vitro* se plantean como la mejor opción. Teniendo en cuenta que uno de los eventos fundamentales en el desarrollo de la tuberculosis es la infección micobacteriana en las células hospederas (42), los ensayos se han orientado a determinar la capacidad de los candidatos a vacuna para inhibir la entrada de la micobacteria, empleando esplenocitos provenientes de animales inmunizados (34,43–45), en los cuales se ha establecido correlación con protección *in vivo*. Estos ensayos, representan un acercamiento funcional que considera un amplio rango de mecanismos inmunes que, por su naturaleza, permiten un sistema controlado para evaluar la eficacia y estudiar mediadores de la respuesta inmune a la tuberculosis (25).

Por otra parte, en la FIDIC se han identificado péptidos que tienen alta unión específica a células hospederas tanto epiteliales como macrófagos alveolares, y se ha evidenciado que éstos tienen la capacidad de inhibir la entrada de *Mtb* a dichas células (3–22), sin embargo, su potencial inmunogénico no ha sido evaluado aún. Los péptidos sintéticos se presentan como alternativa para el diseño de una vacuna contra la TB, pues éstos tienen diversas ventajas entre las que se encuentran: su versatilidad en el diseño de secuencias peptídicas, el grado de pureza con que se obtienen (reduciendo efectos adversos asociados a su producción) y su estabilidad a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo después de ser liofilizados, lo que facilita su transporte a zonas de difícil acceso en donde se presenta una mayor incidencia de la enfermedad (1).

En cuanto a las características inmunológicas de los antígenos, en el modelo de la malaria causada por *Plasmodium falciparum*, se ha descrito que péptidos con alta actividad de unión específica (HABPs, del inglés *high activity binding peptides*) son incapaces de generar respuestas inmunitarias protectoras celulares y/o humorales en animales inmunizados (46,47). Es así, como con el fin de mejorar su inmunogenicidad, las secuencias peptídicas son modificadas teniendo en cuenta la unión del péptido con los Antígenos Leucocitarios Humanos clase II (HLA-II), suceso clave para la generación de una respuesta inmune. Dichas modificaciones están dirigidas a que los antígenos peptídicos puedan encajar en el HLA-II, confiriéndole estabilidad al complejo; dicho complejo, expresado en células presentadoras de antígeno (*APC*, del inglés *Antigen Presenting Cells*), interactuará con las células responsables de la inmunidad adaptativa, interacción que puede inducir una respuesta inmune protectora, la cual se pretende evaluar a través de ensayos *in vitro* en el presente proyecto.

Teniendo en cuenta la necesidad de una vacuna anti-tuberculosis, es pertinente evaluar dichos antígenos. Este proyecto es pertinente porque contribuye a evidenciar, mediante el planteamiento de diferentes ensayos *in vitro* con células humanas, la posible generación de una respuesta inmune protectora inducida por los péptidos sintéticos derivados de proteínas de *Mtb* frente a la infección con este patógeno y, de esta manera, la efectividad de antígenos candidatos a vacuna contra la tuberculosis.

4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1. Tuberculosis

Aunque se ha mejorado en el control de la TB a nivel mundial, observándose una reducción del 20% en la incidencia comparado con 2015, en el 2021 se reportaron 10,6 millones de nuevos casos, de los cuales 57% fueron hombres, 33% mujeres, 11% niños y con una mortalidad de 1,6 millones de personas. Por otra parte, 450.000 de los casos reportados correspondieron a TB producidas por cepas bacterianas multidrogo-resistentes (TB MDR) (1).

Se estima que la asociación entre VIH y TB ha causado 187.000 muertes para el mismo año, así que la TB continúa posicionándose como un gran problema de salud pública y es la principal causa de muerte en personas VIH positivas (1). En la figura 1, se observa la incidencia de casos de la enfermedad a nivel mundial. Se evidencia que los países más afectados (≥ 500 casos/100.000 habitantes), están ubicados hacia el sur del continente africano, el 43% corresponde al Sur oriente asiático, el 25% a África, el 18% al Pacífico oriental, el 8,3% al Mediterráneo oriental, 3% a las américas y el 2,3% a Europa.

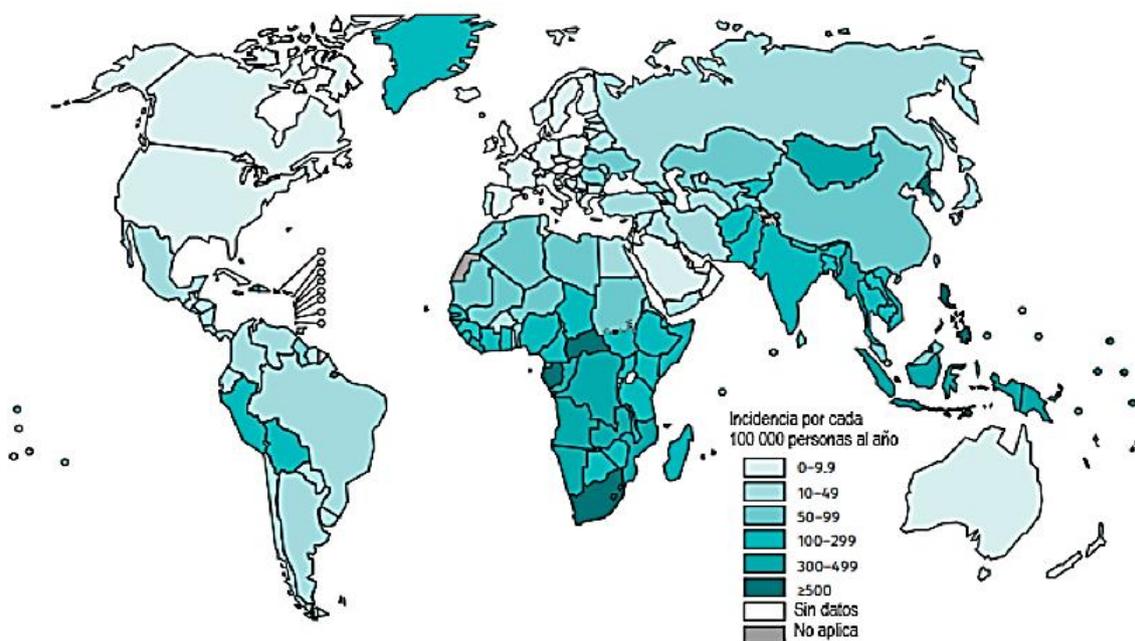


Figura 1. Tasas de incidencias de tuberculosis en 2021 a nivel mundial, incidencia de casos por cada 100.000 habitantes, modificado de *WHO Global tuberculosis report 2022* (1).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), para el año 2021 en la región de las Américas, 27 mil personas murieron por tuberculosis (incluyendo pacientes VIH positivos) y 291.000 enfermaron. Según este reporte, se registraron 4 mil casos de TB RR y de éstos, tan solo

el 89% inició tratamiento. Entre los países con la mayor incidencia de casos se encuentran: Brasil (32%), Perú (14%), México (10%) y Haití (7%) (48). En Colombia, de acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (SIVIGILA), en el año 2022 se notificaron un total de 14.994 casos nuevos de TB con una incidencia de 22,6 casos y una mortalidad de 1,72 casos por cada 100.000 habitantes. Los hombres continúan siendo la población más afectada con un 65,8% respecto a las mujeres con un 34,2% (49).

4.2. *Mycobacterium tuberculosis* y el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

Mtb junto a *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, y *M. canetti*, forman el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), sin embargo, dentro de éste, también se agrupan los bacilos *M. oryx* y *M. mungi* (50). Estas bacterias presentan el 99,9% de similitud en cuanto a la secuencia de nucleótidos, lo cual sugiere un ancestro común; no obstante, entre ellas hay diferencia en el fenotipo, tropismo por el hospedero y patogenicidad, además de existir poca evidencia de intercambio génico entre ellas; para su identificación, pueden ser usadas las regiones de diferenciación (RD) del 1-14 a través de PCR, pues la presencia (o ausencia) de éstas, varía entre especies (39,50,51).

Entre los factores determinantes en la virulencia de las cepas del MTBC, se encuentran: el metabolismo de los lípidos y ácidos grasos, las proteínas de envoltura, otras proteínas que inhiben la acción antimicrobiana de los macrófagos, las protein-quinasas, las proteasas (que incluyen metaloproteasas), genes reguladores de expresión, proteínas transportadoras de metales, además de proteínas de función desconocida como aquellas pertenecientes a las familias PE y PE_PGRS (50).

Algunas características generales de las cepas pertenecientes a este complejo son: *M. bovis*, su genoma es más pequeño que el presente en *Mtb*; dado que un organismo clonal como *Mtb* no puede reparar las deleciones en el ADN cromosómico por recombinación, se cree que *M. bovis* evolucionó a partir de una especie con un cromosoma de mayor tamaño; ésta es la especie más común causante de la enfermedad en vacas y otros bóvidos, aunque se han identificado en aislados provenientes de jabalíes, caballos, cerdos y otras especies de vida salvaje como conejos, leones y primates. El bacilo BCG es la única vacuna licenciada para la enfermedad; con el objetivo de hacer su uso seguro, se atenuó realizando aproximadamente 230 pases y se encontró que proveía inmunidad protectora frente al reto con *Mtb*. *M. microti*, originalmente descrita en pequeños roedores, también fue aislada de gatos, cerdos, tejones, suricatos y jabalíes. Aunque esta micobacteria se usó como vacuna, la protección no fue mayor a la obtenida con *M. bovis* BCG y además se observó que podía producir la enfermedad en personas tanto inmunocomprometidas como inmunocompetentes (52–54). *M. africanum* causa la mitad de los casos de TB en África occidental, no obstante, se ha reportado en pacientes de Alemania, Francia, Estados Unidos, Kazajistán y España. Adicionalmente, este patógeno ha sido aislado de monos y vacas. *M. pinnipedii*, sus hospederos naturales son mamíferos marinos, esparciéndose de éstos a mamíferos terrestres entre los que se encuentran primates no humanos como los gorilas. El potencial zoonótico de esta bacteria fue evidenciado al encontrarse en entrenadores de focas. *M. caprae*, inicialmente descrita en caprinos, pero se ha encontrado en bovinos, cerdos, ciervos, jabalíes, tigres, camellos y ovejas. *M. canettii*, es la especie más divergente genéticamente dentro del complejo, es de rápido crecimiento, ha mostrado tener mayores tasas de variación genética y haber

divergido evolutivamente más temprano que las otras cepas del complejo y en estudios con ratones, se ha evidenciado que es menos virulenta que *Mtb* (51).

Mycobacterium tuberculosis afecta humanos, primates no humanos, cabras, gatos, perros, aves y especies de vida salvaje. *Mtb* es el principal agente causal de la TB, siendo un microorganismo aerobio de lento crecimiento, no formador de esporas, ni móvil, su tiempo de generación oscila entre 15 a 20 horas, requiere más de 7 días de cultivo para observar la formación de colonias, mide de 2 a 4 μm de longitud, y crece en agares Middlebrook 7H10 y Löwenstein -Jensen a 37°C (55).

La envoltura de *Mtb* presenta membrana plasmática, pared celular y en algunos, cápsula. En la membrana plasmática se encuentran carbohidratos y fosfolípidos como fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y difosfatidilglicerol, acompañados de manósidos, precursores de lipomano y lipoarabinomano, también proteínas y lipoproteínas. En la pared celular se encuentran peptidoglicano, formado por N-acetilglucosamina (NAM) y N-acidoglicorilmurámico (NAG), que se une covalentemente con arabinogalactano esterificado con ácidos micólicos. La cápsula está compuesta principalmente de carbohidratos y lípidos que no están unidos covalentemente a la pared y, en menor proporción, proteínas (Fig. 2) (56,57).

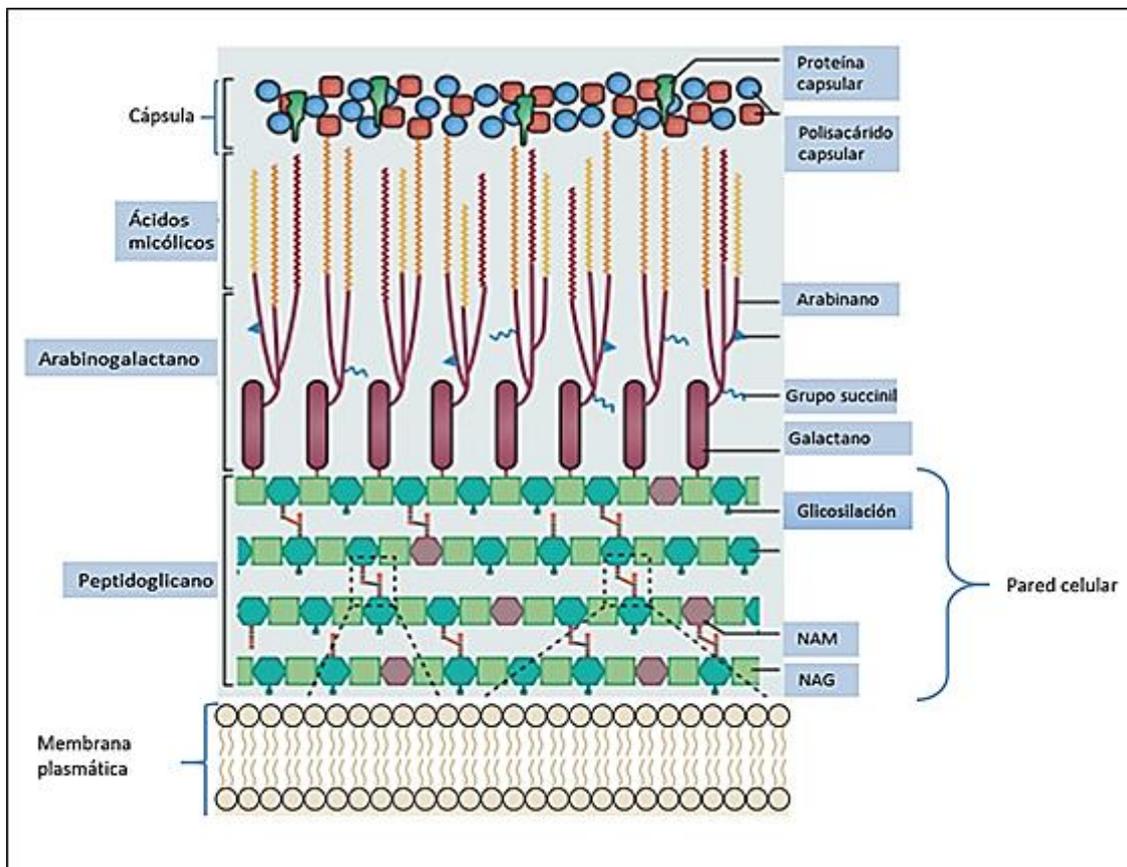


Figura 2. Envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis*, modificado de *How sisters grow apart: mycobacterial growth and division* (56).

4.3. Inmunología de la tuberculosis

El ciclo de esta enfermedad comprende dos fases: tuberculosis activa (la fase aguda) y tuberculosis latente (la fase crónica). En la primera, el paciente presenta síntomas como tos, que puede ser no productiva (seca) o productiva, con expectoración de sangre o flemas, sudoración nocturna y pérdida de peso. La fase latente de la enfermedad se caracteriza por ser asintomática, debido a que el sistema inmune del hospedero despliega una respuesta de contención celular denominado como granuloma. Esta estructura se distingue por una agregación multicelular de macrófagos y otras células especializadas como las células gigantes de *Langerhans*, macrófagos espumosos y células epitelioides, rodeadas por un anillo de linfocitos. El 10% de los pacientes con TB latente pueden progresar a casos activos, debido a un proceso de inmunosupresión. Esto demuestra cómo la respuesta inmune del hospedero juega un papel importante en detener la infección, especialmente en regiones endémicas, y evita el desarrollo de la TB miliar; este último cuadro clínico puede desarrollarse cuando la carga bacilar del granuloma es muy grande y la respuesta falla en contener al microorganismo o por eventos de inmunosupresión que desencadenan la diseminación de la micobacteria a otros órganos cuando entra en contacto con el torrente sanguíneo (58).

La principal vía de entrada del bacilo implicada en la generación de la TB pulmonar es la vía aérea, por medio de la inhalación de microgotas en las que se encuentra suspendido el bacilo, producidas por pacientes con TB activa. Una de las primeras células que tienen contacto con la micobacteria son los macrófagos alveolares, en los cuales se ha reportado que *Mtb* puede ser neutralizado o seguir proliferando. Estas células presentadoras de antígeno expresan sobre su superficie una gran diversidad de receptores de patrones de reconocimiento (del inglés, *pattern recognition receptors*, PRR) lo que le facilita el reconocimiento y fagocitosis del bacilo. Dentro de los principales receptores involucrados en esta interacción, se encuentran los receptores para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas, los TLRs (Receptores de tipo Toll, del inglés: *Toll like Receptors*), receptores tipo lectina C, receptores del complemento, receptores *scavenger*, entre otros, mencionados en la Tabla 1 (59–61).

Tabla 1. Receptores implicados en el proceso de fagocitosis para *Mtb*.

Receptor	Ligando de <i>Mtb</i>	Actividad
Lectina de tipo C (transmembranal)	ManLAM, PIMS, arabinomanano, mananos, manoproteínas	Se cree que es anti-inflamatorio e inhibe la llegada de micobacterias al lisosoma.
DC-SIGN (CD209)	ManLAM, PIMS, arabinomanano, lipoarabinomanano, antígeno 19 kDa	Receptor de captación mayor en CD4 humanas; Se cree que es anti-inflamatorio y que inhibe la maduración de CD4. Existen siete parálogos en ratones (SIGNR1-5, SIGNR7, SIGNR8).
Dectin- 1	Desconocido	Reconoce el β -glucano fúngico en cooperación con TLR2.
Familia integrina		
Receptor del complemento 3 (CD11b/CD18)	LAM, PIMs Antígeno 85C	Tiene un dominio de lectina y media el ingreso de <i>Mtb</i> a través opsonización o independiente de ésta.
SRs		

Clase A (SR- A1, MARCO) Clase B (CD36, SR-B1)	Desconocido	SRs tienen gran habilidad de unión a ligandos; entre éstos se encuentran lipoproteínas, moléculas polianiónicas, bacterias Gram + y Gram -.
Oponización		
CRs		
CR1, CR3, (CD11b/CD18)	Hospedero iC3b	CR3 es el mayor receptor del complemento, involucrado en la opsonización por complemento de <i>Mtb</i> , aunque la micobacteria activa una ruta alternativa y es opsonizada por C3b e iC3b.
Colectinas (forma soluble de lectinas tipo C)		
Proteína surfactante A	ManLAM; lipomanano, una glicoproteína de 60 kDa; la glicoproteína Apa	Aglutina <i>Mtb</i> y mejora la internalización por parte de macrófagos.
Proteína surfactante D	ManLAM	Aglutina <i>Mtb</i> retrasa la fagocitosis por macrófagos.
Lectina de unión a manosa	ManLAM, PIMs	Estudios en humanos sugieren que bajos niveles confieren protección contra tuberculosis.
Receptor Fc		
FcγR	IgG del hospedero	La entrada de la micobacteria mediante este receptor puede direccionarla al lisosoma.
Abreviaciones: CDs, Células dendríticas; IgG, inmunoglobulina G; LAM, lipoarabinomanano; ManLAM, lipoarabinomanano acoplado con manosa; PIM, fosfatidilinositol; SR, receptor <i>scavenger</i> ; CR, Receptores del complemento.		

Tomado de Philips *et al.*, Tuberculosis pathogenesis and immunity (60).

Luego del reconocimiento del bacilo por parte de los macrófagos alveolares, estos orquestan la migración de monocitos presentes en sangre periférica al sitio de la infección y su diferenciación a macrófagos. Los bacilos fagocitados en los macrófagos pueden morir en el fagolisosoma. En el caso que se induzca el proceso de apoptosis del macrófago infectado, los bacilos pueden escapar a través de los cuerpos apoptóticos y éstos, a su vez, serán fagocitados por los nuevos macrófagos que migran al lugar de la lesión, permitiéndole a los microorganismos un nuevo nicho para proliferar. Por otra parte, se ha descrito que las vesículas apoptóticas facilitan el proceso de presentación cruzada, siendo fagocitadas por CDs y sus productos de degradación cargados al HLA-I para ser presentados a Linfocitos T (LT) citotóxicos CD8+, importantes efectores en la inmunidad protectora frente a *Mtb* (62). Si los macrófagos infectados mueren por necrosis, la cual se promueve por el sistema de secreción VII (ESX1) usado por esta micobacteria para exportar proteínas a pared celular y al espacio extracelular, todo el contenido celular se liberará al microambiente celular, permitiéndole al bacilo proliferar libremente (63,64).

Por otra parte, *Mtb* inhibe la maduración del fagosoma, evitando la fusión de éste con el lisosoma, permitiéndole sobrevivir dentro del endosoma, en donde tendrá acceso a micronutrientes esenciales para su supervivencia. El interferón gamma (IFN- γ) es una citoquina involucrada no solamente en la orquestación de la respuesta inmune una vez se ha iniciado el proceso de infección, induciendo la migración de macrófagos al sitio, sino que además está involucrado en la activación del fagosoma, pues estimula la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que participan en el proceso de muerte intracelular; sin embargo, los bacilos que escapan de esta muerte, permanecen en dormancia con una actividad metabólica reducida,

facilitándole la supervivencia bajo condiciones carentes de nutrientes y de oxígeno o pueden inducir la apoptosis o necrosis en la célula hospedera (59).

Aunque la inhibición de la maduración del fagosoma es el mecanismo mejor conocido, actualmente se sabe de otros posibles destinos de la micobacteria luego de la fagocitosis; *Mtb* puede crecer en un compartimiento similar al endosoma temprano inhibiendo la generación de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en el fagosoma. La disminución de PI3P se ha demostrado por medición directa de fagosomas purificados, a pesar de ello, se desconoce la forma exacta por medio de la cual *Mtb* disminuye la generación de éste en el fagosoma; una de las hipótesis postula que el ManLAM, presente en la pared celular de *Mtb*, interrumpe la señalización dependiente de Ca⁺/calmodulina, la cual actúa corriente arriba de la producción de PI3P; otra de las hipótesis, establece que SapM (del inglés, *Secreted acid phosphatase*) presente en la micobacteria puede degradar PI3P, bloqueando de esta forma la fusión del endosoma tardío. Se ha descrito también, que dado el papel de PI3P en el proceso de autofagia, cuando se carece del mismo, la micobacteria puede inhibir más fácilmente la muerte celular por este mecanismo (60). Por otro lado, el sistema ESX1 permeabiliza la membrana del fagosoma, permitiendo el acceso directo de la micobacteria al citosol; en el caso de infecciones por *M. marinum*, las bacterias libres en el citosol son reconocidas por el sistema de ubiquitina de las células hospederas y son re-secuestradas en un compartimiento unido a la membrana (60). Algunas bacterias fallan en prevenir la maduración del fagolisosoma y, en algunos casos, las bacterias tienen la capacidad de crecer en los lisosomas (65).

Cuando la micobacteria entra en contacto con otras células de la inmunidad innata como los neutrófilos, se han evidenciado diferentes escenarios: en el primero, los polimorfonucleares son incapaces de eliminar a *Mtb* por medio de la fagocitosis, lo que conlleva a una exacerbación de la inflamación y daño tisular, no obstante, se ha reportado el control de la infección a través de la muerte de los neutrófilos por apoptosis, la cual promueve la presentación cruzada a células presentadoras de antígeno, induciendo la inmunidad mediada por LT, Linfocitos B (LB), células asesinas naturales y, promoviendo mediante quimiocinas, el reclutamiento de macrófagos y CDs, éstas últimas, migran a los nódulos linfáticos a realizar la presentación de antígenos micobacterianos a más linfocitos. Finalmente, en los neutrófilos se ha descrito la producción de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-22, involucradas en el control de la infección micobacteriana (66–68). Por otra parte, se ha reportado que complejos inmunes antígeno-anticuerpo pueden mediar la apoptosis en neutrófilos y que ésta se asocia con el receptor Fc γ tipo II (Fc γ R2), así mismo, con la producción de citoquinas inflamatorias, enzimas proteolíticas, agentes oxidativos y otras moléculas tóxicas (69); no obstante, se desconoce si anticuerpos dirigidos a antígenos micobacterianos podrían tener el mismo efecto sobre neutrófilos.

Una vez la respuesta inmune innata ha permitido la contención de la infección por la formación del granuloma, intervienen las células de la inmunidad adaptativa como los LT. Esta respuesta se induce a través de la presentación antigénica que se da en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I y II, conocido como HLA para humanos; este complejo debe cargarse con péptidos provenientes del antígeno, para que el TCR (del inglés, *T-cell receptor*) del LT, pueda reconocer al antígeno. La interacción HLAII-péptido-TCR, junto a moléculas coestimuladoras y otras señales, permite, el desarrollo de fenotipos celulares efectores y de memoria (70). Estas células se han descrito como coordinadoras de la respuesta inmune protectora frente *Mtb*, también se ha reportado que pacientes con deficiencia en activar elementos relacionados con los LT, como por ejemplo la inducción de IFN- γ , son más sensibles a la infección por micobacterias (71,72).

Las principales poblaciones celulares involucradas en la respuesta son los LT perfil Th1, productores activos de Factor de Necrosis Tumoral (TNF del inglés, *Tumoral Necrosis Factor*), IL-12 e IFN- γ , éste último, se considera crucial en la respuesta protectora contra *Mtb*, dado que estimula células fagocíticas para que contengan patógenos intracelulares, promoviendo diferentes acciones, entre las que se encuentran: actividad bactericida producto de especies reactivas de oxígeno, aumento en la expresión de HLA-II, así mismo, la promoción de apoptosis y autofagia (73,74), además de la producción de quimiocinas como CCL3 (del inglés, *Chemokine (C-C motif) ligand 3*) para el reclutamiento de linfocitos B (75).

En los centros germinales (CG) se generan células B de memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos, con alta afinidad por diversos antígenos; los LT ayudadores foliculares (TFH, del inglés *T Follicular Helpers*), tienen un papel importante en la formación de dichos centros. Los TFH expresan el receptor CXCR5 (del inglés, *C-X-C chemokine receptor type 5*) que permite la migración de los LB a los CG, así mismo, el coestimulador inducible ICOS (del inglés, *inducible co-stimulator*), se ha descrito como esencial para la formación del CG. Los TFH también producen IL-21 que junto con el CD40L promueven la diferenciación de los LB y el cambio de isotipo para finalmente generar células de memoria y plasmáticas productoras de anticuerpos de larga duración (76). En la infección por bacilos tuberculosos, se ha visto que la presencia de estas células está asociada con el control inmune de la infección, mientras que la ausencia de TFH CXCR5+, con susceptibilidad; así mismo, la expresión de CXCR5 favorece la localización de estas células en los granulomas, promueve la activación de macrófagos y facilita la formación de los folículos linfoides, mostrando de esta manera, la importancia de dicha subpoblación celular en la respuesta inmune frente a TB (77).

Igualmente, se ha descrito la inducción del perfil de linfocitos Th2 productores de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, citoquinas asociadas con la activación de macrófagos, cuya actividad bactericida contra *Mycobacterium* es menos eficiente, así como con la inhibición de la autofagia, vinculada con la degradación intracelular de la micobacteria (78,79).

El linaje Th17, produce IL-17 que media el reclutamiento de células con perfil Th1, así mismo, citoquinas como IL-22, IL-26 y Factor Estimulante Colonia Granulocito Monocito (GM-CSF, por sus siglas en inglés), que inducen péptidos antimicrobianos, estimulan la granulopoyesis, el reclutamiento y activación de granulocitos como neutrófilos, para eliminar patógenos micobacterianos (80,81).

Los LT citotóxicos, contribuyen directamente con la inmunidad contra patógenos intracelulares como *Mtb*; se ha descrito que el bacilo es capaz de inducir una respuesta celular de tipo CD8. Después del procesamiento de la micobacteria por APCs, los péptidos resultantes se unen a moléculas de HLA-I que interactúan con el TCR de los LT CD8+. La muerte de *Mtb* mediada por los linfocitos citotóxicos, es dependiente de granulisinas que se encuentran en los gránulos citotóxicos de estas células. Así, la micobacteria puede ser eliminada extracelularmente, pues se altera la integridad de la membrana del bacilo. Otra vía de acción es Fas/FasL (CD95/CD95L). CD95 pertenece a la familia del receptor de TNF, que sirve como receptor de muerte prototipo para el sistema inmune, CD95L es su ligando, esencial para desencadenar actividad citotóxica; en el modelo murino, la delección de CD95/CD95L, disminuye la habilidad de controlar el crecimiento micobacteriano intracelularmente (80,82–84).

Del mismo modo, se encuentran los LT reguladores (Tregs), involucrados en la inhibición del control de la infección por *Mtb*, dado que disminuyen la producción de IFN- γ en personas con TB activa, aún ante antígenos potentes como BCG y ESAT-6, lo que podría contribuir a la patogénesis

del microorganismo causante de la infección (85,86). Los Tregs son inducidos por antígenos micobacterianos de manera temprana en los nódulos linfáticos, de modo que retrasan la activación de los LT efectores, con la liberación de IL-10 y Factor de crecimiento transformante β (77,87).

A continuación, en la tabla 2, se presenta un resumen con estrategias de evasión inmune por parte de *Mtb* (42).

Tabla 2. Ejemplos de estrategias de evasión inmune de *Mtb*.

Estrategias de defensa del hospedero	Estrategias de evasión micobacterianas
Reclutamiento de macrófagos al sitio de la infección	<ul style="list-style-type: none"> -Enmascara con lípidos los antígenos que pueden ser reconocidos de su envoltura celular. -Evita el reclutamiento de macrófagos microbicidas a través de la señalización por TLR. -Recluta macrófagos tolerantes al crecimiento bacteriano mediante la inducción de la quimioquina CCL2.
Promover la fusión fagosoma-lisosoma	Evita y/o tolera la formación del fagolisosoma.
Agregar macrófagos en granulomas epitelioides para restringir y contener micobacterias	<ul style="list-style-type: none"> -Usa el granuloma temprano para expandirse de macrófago a macrófago. -Activa genes específicos para su supervivencia en el granuloma, como homólogos de PE/PE-PGRS, una familia que codifica numerosas proteínas polimórficas ricas en glicina (de función desconocida), que pueden ayudar a que la micobacteria sobreviva dentro de éste.
Procesamiento y presentación de antígenos bacterianos	<ul style="list-style-type: none"> -Inhibe el procesamiento y la presentación por CMH. -Desviar los Ags secretados de la vía del CMH de clase II a la vía de exportación, para evitar el reconocimiento de las células T CD4+. -Altera la expresión de Ags para evadir el reconocimiento de células T, induciendo una activación subóptima de los LT CD4+ efectores. -Evita enfocar la respuesta inmune de LT en regiones conservadas y/o subdominantes.
Activación de las células T para controlar la infección	<ul style="list-style-type: none"> -Libera los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) para inhibir la señalización de TCR e inducir la anergia de células T CD4+. -Retrasa la migración de CDs a los ganglios linfáticos con el fin de retardar la generación de LT efectores.
Aumentar la capacidad microbicida del granuloma mediante el reclutamiento células T efectoras	<ul style="list-style-type: none"> -Induce linfocitos Treg específicos del antígeno que retrasan la presentación a LT efectoras y su reclutamiento al granuloma. -Regula negativamente los antígenos micobacterianos clave para que los macrófagos infectados sean "invisibles" a LT efectores específicos del patógeno. -Induce factores supresores (por ejemplo, IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) que restringen la función de LT efectores.

Abreviaturas: TLR: Receptores de tipo Toll; CCL2: ligando de quimioquinas 2; CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad; Ags: antígenos; PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos; CD: células dendríticas; Treg: Linfocito T regulador.

Tomada de “*The Impact of Mtb Immune Evasion on Protective Immunity: Implications for TB Vaccine Design*” (42).

Por otra parte, la respuesta inmune humoral, puede contribuir a la protección contra TB, lo cual tiene base en tres hechos principales: la transferencia de anticuerpos antígeno-específicos de *Mtb* ayuda al hospedero a controlar la infección, la presencia de anticuerpos dirigidos contra *Mtb* se correlaciona con una menor susceptibilidad a la infección, y el desarrollo de la enfermedad se facilita en hospederos con una deficiencia en la producción de anticuerpos o de linfocitos B (88); teniendo en cuenta que los LB no sólo contribuyen a la respuesta humoral mediante la producción de anticuerpos, sino que son también capaces de presentar antígenos, pueden inducir la producción de citoquinas y quimiocinas (89).

En trabajos desarrollados por Zimmermann *et al.*, 2016, se evidenció IgG e IgA con afinidad a antígenos de la micobacteria, tanto en individuos con TB pulmonar aguda, como en sanos expuestos al patógeno. Sin embargo, la inmunoglobulina A anti-*Mtb* inhibió la entrada de la micobacteria a células epiteliales de pulmón, mientras que la IgG, que comúnmente se produce en los procesos inflamatorios, tuvo el efecto contrario, promoviendo la infección (35). Por otra parte, se ha reportado que las personas con TB latente y activa producen anticuerpos con distintivas funciones efectoras. Al hacer un perfil de 70 características de inmunoglobulinas asociadas con la actividad efectora de su fracción cristalizable (Fc), se encontró que los anticuerpos provenientes de individuos con TB latente, mejoran su actividad efectora a través de los receptores de la fracción cristalizable Fc γ RIII, implicados en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo; del mismo modo, estas inmunoglobulinas tienen diferentes patrones de glicosilación y conducen a la muerte intracelular de la micobacteria en macrófagos humanos, promoviendo una maduración fagolisosomal mejorada, activación del inflammasoma y disminuyendo la carga micobacteriana, en comparación con aquellos anticuerpos provenientes de las personas con TBA (36).

Adicionalmente a la presentación de antígenos a través de los HLA de clase I y II, se ha observado un mecanismo de presentación antigénica no clásico mediado por el grupo de moléculas CD1, el cual comprende CD1a, CD1b, CD1c y CD1d, involucradas en la presentación de glicolípidos micobacterianos, abundantes en la pared celular como fosfatidilinositol manósidos, lipoarabinoamano, ácidos micólicos, sulfoglicolípidos, entre otros, y generalmente dicha presentación induce la producción de IFN- γ . CD1a se ha visto expresado en la superficie celular y en los endosomas tempranos, CD1b en endosomas o lisosomas tardíos, CD1c y CD1d se localizan en la superficie de la célula y se reciclan en los endosomas tardíos. Estas moléculas abundan en CDs, no obstante, se regulan negativamente en células infectadas por la micobacteria; las moléculas CD1 no se han encontrado en macrófagos, pero CD1d se expresa en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, incluyendo células epiteliales (59,90,91).

4.4. Desarrollo de vacunas contra la tuberculosis

Actualmente se cuenta con la vacuna BCG, desarrollada hace casi 100 años, la cual protege en la niñez de las formas severas de la enfermedad, no obstante, la protección frente a la TB pulmonar

en adultos es muy variable y no proporciona inmunidad esterilizante, por lo cual existe un gran número de personas que presentan TBL a pesar de haber sido vacunadas con el bacilo *M. bovis* BCG. De esta manera, no hay una vacuna que sea efectiva para adultos y que se suministre antes o después de la infección con la micobacteria (1,2), motivo por el cual se sigue investigando en este tema.

La publicación del genoma de *Mtb* H37Rv (92) ha contribuido enormemente al diseño de antibióticos y la búsqueda de antígenos candidatos a la vacuna contra la tuberculosis. Dentro de los actuales candidatos, se encuentran 12 en ensayos clínicos, de los cuales algunos están dirigidos a prevenir la infección y otros a evitar que las personas con TBL desarrollen la enfermedad en estado activo; sus características se resumen en la Tabla 3 (93).

Entre los principales tipos de vacuna empleados, se destacan aquellos donde se inmuniza con toda la célula micobacteriana, dentro de los que se encuentran: BCG recombinante (rBCG), *Mtb* atenuada y micobacterias muertas (*Mtb* y *M. vaccae*). Por otro lado, se han evaluado las vacunas de subunidades, dentro de las que se destacan las proteínas recombinantes con adyuvante y las vacunas de subunidades administradas mediante vectores virales. En algunas de éstas, se ha visto una protección similar a la obtenida con la vacuna BCG. Hay diferentes limitantes en cuanto a los antígenos que se emplean en los distintos tipos de vacuna, por ejemplo, el uso de los vectores virales es de poca utilidad en aquellos casos en los que el individuo vacunado tiene anticuerpos previos dirigidos frente a los antígenos del vector; en cuanto a las inmunizaciones con base en células completas, se ha observado que pueden inducir autofagia como en el caso de rBCG, lo que podría afectar su efectividad. Por otro lado, las vacunas basadas en subunidades pueden proveer una más amplia inmunidad, ya que están compuestas de antígenos presentes en diferentes etapas del metabolismo bacteriano, evidenciándose que su eficacia protectora puede ser mayor a aquellas que sólo consisten en antígenos altamente expresados en bacteria en replicación (94).

Tabla 3. Vacunas en fase clínica de investigación contra tuberculosis

Fase I	Fase IIa	Fase IIb	Fase III
<u>A.</u> AdHu5Ag85A MCMaster UNIV, CANSINO	<u>B.</u> AEC/BC02 ANHUI ZHIFEI LONGCOM	<u>D.</u> BCG (Revaccination) GATES MRI	<u>D.</u> BCG (Travel vaccine) HJF
<u>A.</u> TB/FLU-01L RIBSP, SRII	<u>A.</u> ChAdOx1.85A+MVA85A UNIV OXFORD	<u>C.</u> DAR-901 DARTMOUTH	<u>B.</u> GamTBvac GAMALEYA RES. CENTRE, MOH RUSSIA
<u>A.</u> TB/FLU-04L RIBSP, SRII	<u>B.</u> ID93+GLA-SE (QTP101) QURATIS (QTP101); NIAID/NIH (ID93+GLA-SE)	<u>B.</u> H56:IC31 SSI, VALNEVA, IAVI	<u>C.</u> Immuvac (MIP) ICMR, CADILA
		<u>B.</u> M72/AS01E GATES MRI, GSK	<u>D.</u> MTBVAC BIOFABRI, UNIV ZARAGOZA, IAVI, TBVI
		<u>C.</u> RUTI® ARCHIVEL FARMA	<u>D.</u> VPM1002 SIPL, VPM

A: Vectores virales; B: Proteína/adyuvante; C: Células micobacterianas muertas completas o extractos; D: Micobacterias vivas atenuadas. Modificado de *pipeline_TB_vaccines_2020_final* (93).

En el diseño de una vacuna sintética, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) ha formulado una metodología lógica y racional para la identificación de antígenos funcionalmente importantes, con el fin de obtener vacunas basadas en subunidades, cuyo principio está fundamentado en péptidos derivados de proteínas de la envoltura de *Mtb*, de alta capacidad de unión específica a células blanco de infección (13); esta metodología inicialmente se empleó en el desarrollo de la vacuna anti-malárica (46,47).

Dicha metodología, para el caso de la tuberculosis, inicia utilizando herramientas bioinformáticas validadas para su uso en el análisis de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* (95,96) para predecir la posible ubicación de las proteínas; así mismo, se analiza la presencia de péptido señal, con el fin de identificar proteínas que puedan ser secretadas o exportadas a la envoltura micobacteriana. Una vez se han seleccionado proteínas que puedan estar en la superficie de la micobacteria y, por lo tanto, pudieran interactuar con la célula blanco de infección, se realizan ensayos moleculares (PCR y RT-PCR), con los cuales se determina si los genes codificantes para esas proteínas se encuentran presentes y se transcriben en diferentes cepas de *Mycobacterium* en condiciones normales de cultivo, siendo de especial interés aquellas que se encuentren en el complejo MTBC.

Posteriormente, se determina la expresión proteica, para lo cual se emplean anticuerpos policlonales y técnicas de Western blot y microscopía inmunoelectrónica, tanto en micobacteria completa, como en fracciones subcelulares de la misma. Luego, para cada una de las proteínas seleccionadas, se lleva a cabo la síntesis química de péptidos que cubren su secuencia completa con el fin de reconocer los fragmentos de interacción proteína-célula blanco (HABPs, por sus siglas en inglés *High Activity Binding Peptides*) y que posiblemente también emplea *Mtb* para interactuar con su célula hospedera a través de ensayos receptor-ligando.

A continuación, los ensayos de inhibición de la entrada de *Mtb*, permiten determinar si el ingreso de la micobacteria puede ser inhibida por los péptidos identificados como HABPs; cuando la inhibición es dependiente de la concentración del péptido en las líneas celulares empleadas, estos HABPs se presentan como de especial interés para continuar en el diseño de la vacuna contra la tuberculosis. Tanto en los ensayos de receptor-ligando como en los de inhibición de la entrada micobacteriana, se emplean dos líneas celulares: U937, las cuales corresponden a macrófagos derivados de monocitos y A549, células epiteliales alveolares tipo II. Finalmente, se determinan los elementos de estructura secundaria a través de la técnica de Dicroísmo Circular, acompañado de la elucidación de la estructura terciaria de los péptidos a través de Resonancia Magnética Nuclear, con la cual ha sido posible constatar (en algunos casos) que la estructura de los péptidos sintéticos es la misma que presentan cuando hacen parte de la proteína nativa (13).

De acuerdo con los resultados encontrados en el desarrollo de la vacuna contra malaria, los péptidos de alta capacidad de unión específica no son inmunogénicos por si solos, por lo cual es necesario realizar cambios en su secuencia de aminoácidos para que se establezca una interacción entre el HLAII-péptido-TCR (97–100). Dado que la respuesta inmune protectora frente a la tuberculosis es principalmente atribuida a los linfocitos T CD4+, los péptidos son modificados para que ajusten en la región de unión al péptido de las moléculas DR del HLAII. En estas moléculas, la cadena α es invariable en la parte de unión al péptido, aunque tiene la capacidad de acomplejarse con diferentes cadenas β , las cuales presentan una alta variabilidad, específicamente DR β 1, de quien se estima el mayor número de variantes alélicas (101–103). Los alelos HLA DR β 1, a pesar de mostrar mayor variabilidad alélica, son la principal ruta de presentación de péptidos en HLA-II (104). Para modificar los péptidos e incrementar su inmunogenicidad, en general se han optimizado los aminoácidos de la secuencia peptídica que tienen contacto directo con los bolsillos (*pockets*) 1, 4, 6 y 9 del HLA-II, para que la unión del péptido-HLA sea más estable, con el fin de generar inmunidad y así inducir protección (46).

Basados en esta metodología, se han seleccionado péptidos provenientes de las proteínas Rv0180c, Rv0227c, Rv0354c, Rv0679c, Rv1268c, Rv1411c, Rv1490, Rv1510c, Rv1911c, Rv1980c, Rv2004c, Rv2270, Rv2301, Rv2536, Rv2560, Rv2707, Rv2969c, Rv3166c, Rv3481c, Rv3494c, Rv3623, Rv3629c, Rv3630, Rv3705c, Rv3763, Rv3804c y Rv3910 como candidatos a antígenos para el diseño de una vacuna sintética contra tuberculosis (3–22).

4.5. Ensayos *in vitro* en la evaluación de candidatos a vacuna contra tuberculosis

La evaluación de la eficiencia y eficacia de las vacunas requiere de ensayos clínicos de gran costo y, en el caso de la tuberculosis, no son claros los marcadores inmunológicos de protección, por tanto, es fundamental que las vacunas con mayor potencial de protección sean seleccionadas para estos ensayos (105). Con el fin de avanzar en este tópico, se han desarrollado diferentes técnicas *in vitro* de las cuales se reportan algunos ejemplos:

Parra *et al.*, (34) reportan una técnica *in vitro* en cepas murinas, en donde se evaluó mediante co-cultivo, la capacidad de los esplenocitos obtenidos de animales inmunizados (con antígenos candidatos a vacuna) de inhibir el crecimiento de *Mtb* en macrófagos murinos infectados; además, se determinó la producción de citoquinas antígeno-específicas en el sobrenadante del co-cultivo. La respuesta inhibitoria y el perfil de citoquinas se correlacionaron con las respuestas inmunitarias *in vivo*. Con este ensayo, se evaluaron los mecanismos de protección frente a la TB pulmonar en un modelo murino, que pueden ser inducidos por la vacunación. Posteriormente, en una modificación del ensayo (106), se evalúa la capacidad de esplenocitos inmunizados de controlar

el crecimiento de una cepa de BCG recombinante resistente a isoniazida y BCG normal, con el fin de evidenciar los mecanismos de protección entre cepas virulentas y avirulentas. Se encontró similitud en la inducción de protección por parte de los diferentes antígenos probados en el primer ensayo entre las aproximaciones *in vitro* e *in vivo* en modelo murino, pero se observó una respuesta disímil entre cepas micobacterianas, sugiriendo, según los autores, diferencias entre los mecanismos de protección inmune de cepas virulentas versus avirulentas.

Más adelante, se reporta el uso del sistema BACTEC, en donde se determina crecimiento micobacteriano mediante fluorescencia detectando el consumo de O₂, para hacer ensayos de inhibición del crecimiento microbiano en modelo murino, demostrando inhibición del crecimiento micobacteriano de forma reproducible, en presencia de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados, comparado con esplenocitos de ratones sin inmunizar, lo cual tuvo un resultado similar al reto *in vivo* que se hizo infectando los ratones con *Mtb*. En este estudio también se evaluó la respuesta Th1, que incluyó la producción de IFN- γ , IL-17 y de la enzima óxido nítrico sintetasa, las cuales fueron estimuladas por la inmunización con BCG (44).

Por otro parte, en cuanto a ensayos con células humanas, Worku *et al.* en 2000, reportaron un trabajo donde LT provenientes de personas reactivas a PPD (del inglés, *purified protein derivative*) y vacunadas con BCG, tras ser expuestos a antígenos micobacterianos, proliferan y estos LT al ser co-incubados con macrófagos infectados por BCG, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento intracelular micobacteriano en comparación con el grupo control (células estimuladas con toxoide tetánico) (107). Por último, se han evaluado células mononucleares de sangre periférica (PMBCs) y sangre completa de personas vacunadas con BCG, con respecto a su capacidad de inhibir el crecimiento micobacteriano en macrófagos infectados, observándose una mejora en la respuesta inhibitoria después de la primera dosis de la vacuna BCG, pero no se consiguió una mayor inhibición después de la segunda dosis. Los autores postulan que, por primera vez con este ensayo, se logró demostrar la diferencia de respuesta entre la primera y la segunda dosis de BCG y se sugiere que los ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento pueden generar un aporte al conocimiento de la eficacia clínica, lo cual sólo había sido logrado con los ensayos *in vivo* para evaluar candidatos a vacuna (108).

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar la respuesta inmune inducida *in vitro* de antígenos candidatos a una vacuna contra tuberculosis.

5.2. Específicos

1. Identificar péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv involucrados en la interacción hospedero-patógeno.
2. Evaluar la inmunogenicidad *in vitro* de péptidos modificados derivados de proteínas de *Mtb*.
3. Determinar la función efectora de linfocitos T activados con los candidatos seleccionados en macrófagos infectados por *Mtb* H37Rv.
4. Establecer la función efectora de los anticuerpos generados por linfocitos B que reconocen péptidos modificados de las proteínas de *Mtb*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se presenta el diagrama con la secuencia de experimentos que permitieron evaluar *in vitro*, la respuesta inmune frente a antígenos candidatos a una vacuna contra tuberculosis (Fig. 3).

En primer lugar, para contribuir a la *identificación de nuevos péptidos candidatos a vacuna*, se seleccionaron mediante herramientas bioinformáticas, proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* (posiblemente involucradas en la interacción micobacteria - célula hospedera); posteriormente, se verificó la presencia y transcripción del gen que codifica para estas proteínas; luego, se sintetizaron los péptidos que comprendían la totalidad de la secuencia de cada una de las proteínas y se evaluaron elementos de estructura secundaria que contribuye a dilucidar la posible relación estructura - función; al tiempo, se determinó la interacción de dichos péptidos con receptores presentes en las células hospederas, a fin de obtener los HABPs (por sus siglas en inglés, *High Activity Binding Peptides*) o péptidos de alta actividad de unión; por último, se evidenció su capacidad de inhibir la entrada de *Mtb* a células blanco de infección.

Después de modificar los péptidos obtenidos en el anterior paso (para optimizar el contacto con los bolsillos de los diferentes alelos del HLA), se llevó a cabo *la presentación antigénica de éstos a linfocitos T* (coordinadores de la respuesta inmune adaptativa); así, se tomaron muestras de sangre periférica, con las que se tipificó el HLA-DR β 1 de los donantes, adicionalmente, se realizó la prueba de QuantiFERON para determinar su previo contacto con *Mtb*. Los PMBCs, se cultivaron en presencia de péptidos modificados y se evidenció si estos estimulaban linfoproliferación, además se evaluaron los perfiles efectores Th1, Th2 y Th17 a través de la medición de citoquinas en sobrenadantes de cultivo. Posteriormente, con el fin de *determinar la función efectora de linfocitos con respuesta a péptidos modificados*, éstos se cultivaron con macrófagos que fueron previamente incubados con la micobacteria.

Finalmente, se evaluó la función efectora de los anticuerpos que reconocen péptidos modificados, los cuales se obtuvieron a partir de sueros provenientes de los donantes anteriormente enunciados, considerando que estos reconocen los antígenos peptídicos mediante ELISA. Finalmente, se realizaron ensayos funcionales que comprenden inhibición de la entrada de la micobacteria a macrófagos y determinar la inducción a apoptosis mediada por anticuerpos en neutrófilos infectados con micobacteria.

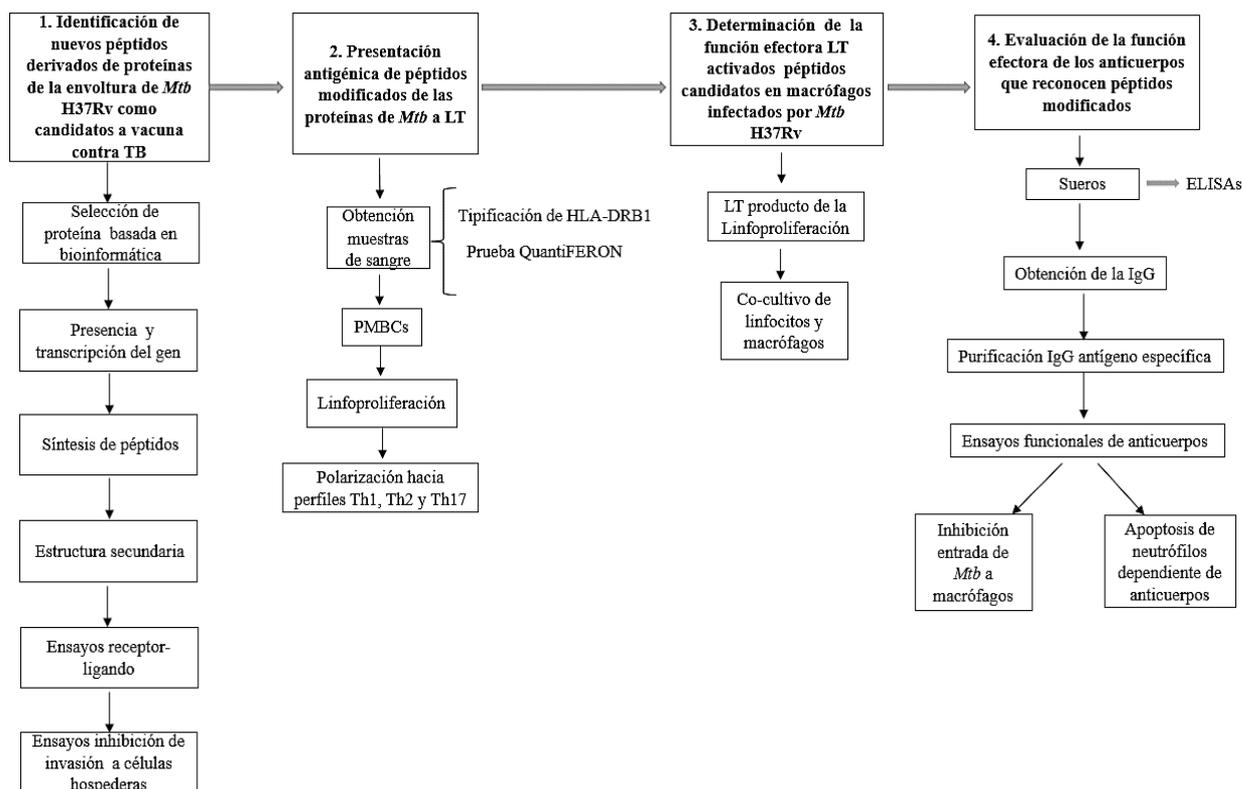


Figura 3. Resumen de la metodología para evaluar la inducción de respuesta inmune adaptativa celular y humoral por parte de antígenos candidatos a una vacuna.

6.1. Selección de nuevas proteínas e identificación de HABPs que inhiban la entrada de *Mtb*

6.1.1. Caracterización de proteínas *in silico*

Basados en estudios previos (95,96) donde se validaron algunas herramientas bioinformáticas y se establecieron algunas características de interés para la selección de proteínas de superficie de *Mtb* que pudiesen interactuar con células hospederas, se seleccionaron secuencias proteicas reportadas en la base de datos *Mycobrowser* de *Mtb* (<https://mycobrowser.epfl.ch/>) para hacer una completa caracterización *in silico*. Primero, se empleó BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*), que determinó si la secuencia codificante para la proteína de interés se ha reportado en diferentes micobacterias, principalmente aquellas que se encuentren dentro del complejo MTBC (109). A continuación, mediante SignalP 3.0 y SecretomeP 2.0 se determinó la posible secreción o exporte a la envoltura celular (110), la localización de la proteína fue predicha con PSORTb v3.0.2 (111) y el servidor TBpred de diseño exclusivo para micobacterias (112). Además, se analizó la presencia de hélices transmembranales con el programa TMHMM 2.0 (113).

6.1.2. Obtención de micobacterias

La presencia y transcripción de los genes que codifican para las proteínas de interés se determinó en las siguientes micobacterias: *Mtb* H37Rv (ATCC 25618), *Mtb* H37Ra (ATCC 25177), *M. bovis* (ATCC 19210), *M. bovis* BCG (ATCC 27291, subcepa Pasteur) y *M. smegmatis* (ATCC 19420). Éstas se cultivaron por 5 y 20 días (*M. smegmatis* y bacterias del complejo MTBC, respectivamente) en medio Middlebrook 7H9 a 37°C, el cual se suplementó con ADC (Catalasa,

albúmina bovina, dextrosa y cloruro de sodio) y OADC (ácido oleico, catalasa, albúmina bovina, dextrosa y cloruro de sodio) según indicaciones para *M. smegmatis* o bacterias del complejo MTBC. Se incubó hasta obtener una densidad óptica a 600nm entre 0,5-1,0. Las micobacterias se cosecharon en fase logarítmica y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 minutos, después del lavado se resuspendieron en PBS, y se guardaron a -20°C para ser utilizadas en ensayos posteriores (3,114). Se empleó *Mtb* H37Rv transformada con la proteína verde fluorescente, GFP (por sus siglas en inglés, *Green Fluorescent Protein*), adicionando al medio de cultivo el antibiótico higromicina, usado para seleccionar las micobacterias transformadas, a través del plásmido pMN437 que contiene el gen de la GFP. La obtención de las micobacterias se llevó a cabo teniendo en cuenta las condiciones de bioseguridad para laboratorios BSL-2 (del inglés, *biosafety level 2*) usando prácticas de laboratorios y procedimientos de un BSL-3.

6.1.3. Presencia y transcripción de genes

Los resultados obtenidos con las herramientas bioinformáticas dan cuenta de proteínas putativas en *Mtb* H37Rv con potencial localización en la superficie micobacteriana, sin embargo, se hace necesario determinar la presencia y transcripción del gen que codifica para dichas proteínas en las micobacterias. La metodología a seguir ha sido ampliamente reportada e involucra la extracción de ADN genómico (ADNg) y ARN total. El aislamiento del ADNg micobacteriano se hizo con el KIT *UltraClean Microbial DNA Isolation*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR se llevó a cabo en el termociclador (LABNET MultiGene Thermal Cycler). La calidad del ADN se verificó amplificando un fragmento de 439pb del gen *hsp65* (del inglés, *heat shock protein 65*) usando los cebadores: directo 5'- ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3' y reverso 5'- CTTGTGGAACCGCATACCCT-3'. Para los genes codificantes para cada proteína a estudiar, se diseñaron manualmente diferentes cebadores verificando la formación de *loops* y dímeros mediante el programa *Gene runner* versión 6.5.51. La reacción de PCR se hizo de acuerdo con las condiciones estandarizadas según cada cebador y los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2 % teñidos con *SYBR Safe*.

A continuación, confirmada la presencia del gen, se evaluó su transcripción en condiciones normales de cultivo, para lo cual se usaron muestras de diferentes cepas y especies de *Mycobacterium* disponibles en el laboratorio, el ARN total fue aislado del pellet bacteriano por homogenización en 1mL de Trizol. La síntesis del ADN complementario se realizó en condiciones libres de RNAsa usando el kit *Super Script III FirstStrand Synthesis System*. El control negativo de la síntesis de cada muestra involucró reemplazar el *SuperScript* con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). 1µL cDNA se usó como plantilla para la amplificación por PCR, en las mismas condiciones descritas para el ADN. El gen *hsp65* se usó como control positivo de la transcripción.

6.1.4. Síntesis de péptidos

Para cada una de las proteínas de interés, el Grupo de Síntesis Química de la FIDIC, sintetizó péptidos de 20 residuos cubriendo la secuencia completa de la misma. Los péptidos se sintetizaron en fase sólida, para lo cual se usa como soporte una resina de acople MBHA (del inglés, *p-Methylbenzhydrylamine hydrochloride*) (0.5 meq/g) y aminoácidos protegidos por el grupo ter-

butiloxicarbonilo (t-Boc), los cuales se desprotegeron en cada acople con TFA (ácido trifluoroacético) al 40% en diclorometano y posteriormente se clivaron siguiendo la metodología de alto y bajo clivaje, para lo cual se empleó fluoruro de hidrógeno (HF) en diferentes porcentajes y temperaturas (115,116). La purificación de los mismos se realizó por RP-HPLC (del inglés, *Reverse-Phase, High-Performance Liquid Chromatography*) (Merck Hitachi, L-450 UV-vis detector) y se verificó su pureza por espectrometría de Masas MALDI-TOF.

También se sintetizaron secuencias poliméricas de epítopes B, seleccionadas con base en el uso del software Bpred (117), necesarias para la inmunización de animales con el fin de obtener anticuerpos policlonales que reconociesen la proteína de la cual se derivan. Esta síntesis se realizó a través de la adición de los aminoácidos cisteína y glicina en los extremos N- y C-terminal del péptido seleccionado como epítope B.

6.1.5. Estructura secundaria de los péptidos

Se usó la técnica de Dicroísmo Circular para evidenciar los elementos de estructura secundaria presentes en cada uno de los péptidos derivados de las proteínas seleccionadas. Para esto se usó el espectropolarímetro Jasco J-810 en un rango de longitudes de onda de 260 a 190 nm en celdas de 1cm (118); los péptidos fueron disueltos en trifluoroetanol (TFE) al 30% y se realizaron tres lecturas. Las deconvoluciones de los datos obtenidos se hicieron mediante los programas SELCON3 (119), CONTINLL (120) y CDSSTR (121).

6.1.6. Ensayo receptor-ligando

Para identificar aquellos péptidos con alta capacidad de unión a células blanco de infección se hicieron ensayos del tipo receptor-ligando ampliamente reportados en la FIDIC (3-22); en éstos, se usaron las líneas celulares U937 y A549 (ATTC CRL-2367 y CLL-185, respectivamente), las cuales se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) en una atmósfera de 5% de CO₂ y 37°C. Los péptidos fueron radiomarcados con Na¹²⁵I (22). En el ensayo (el cual se hizo por triplicado) se incubaron 1,2 x 10⁶ células A549 (37°C) y U937 (4°C), en placas de 96 pozos, por 2 horas, adicionando concentraciones crecientes de péptido radiomarcado, para obtener la denominada Unión Total y en presencia de un exceso de péptido sin radiomarcado (40µM) para determinar la Unión Inhibida; finalmente, la Unión Específica es el resultado de la diferencia entre la Unión Total y la Unión Inhibida. La radioactividad correspondiente a la unión de péptido radiomarcado en cada ensayo fue medida en un contador gamma (*Gamma Counter Cobra II, Packard Instrument Co.*). Los péptidos denominados HABPs, son aquellos cuya pendiente de la curva de unión específica es $\geq 0,01$ (1%) de acuerdo a parámetros previamente establecidos (4,9,15).

6.1.7. Ensayo de inhibición de la entrada de *Mycobacterium tuberculosis*

Con el fin de determinar el rol funcional de los péptidos identificados como de alta unión específica, HABPs, se hicieron ensayos de inhibición de la entrada de la micobacteria a las células blanco de infección. Estos ensayos de inhibición de la entrada se realizaron por triplicado con células A549 y U937; se dispusieron 2,5 x 10⁵ células de cada línea en cajas de 24 pozos y se incubaron a 37°C (A549) y 4°C (U937), en 5% de CO₂ con diferentes concentraciones (2, 20 y 200 µM) de cada HAPB; como control de inhibición, se utilizó lisado de *Mtb* H37Rv (200 µg/mL)

o Citocalasina D (50 μ M) y el control de infección correspondió a células sin inhibidor. Las células fueron infectadas con *Mtb* H37Rv GFP a una multiplicidad de infección (MOI) 1:5 y se incubaron toda la noche. Posteriormente, se lavaron para retirar la bacteria extracelular, se fijaron toda la noche a 4°C con una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,5% en PBS, posteriormente se leyeron 10000 eventos por pozo en el citómetro (BD FACSCanto II). Para determinar el porcentaje de inhibición, se tuvo en cuenta el control de infección, que se tomó como el 100% de la micobacteria intracelular.

Para descartar el efecto citotóxico que pudiesen presentar los péptidos, se realizó un ensayo de toxicidad con MTT (del inglés, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) *tetrazolium*), en el cual se dispuso de 5x10⁴ células/pozo de cada línea celular en cajas de 96 pozos, las cuales se dejaron adherir toda la noche en RPMI-1640 al 10% de SFB, en un volumen final del 200 μ L. Luego las células se incubaron por 2 horas con los péptidos en concentraciones 20 y 200 μ M, en las mismas condiciones dadas para el ensayo de inhibición de la invasión; como control negativo de toxicidad, se usaron células sin péptidos y al control positivo de citotoxicidad se adicionó Triton X-100 al 1%. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó MTT (en una concentración final del 10%), las células se incubaron de nuevo toda la noche a 37° C con CO₂ (5%), después de la formación de los cristales de formazán se agregó 100 μ L de SDS (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulphate*), con éste, las células se incubaron nuevamente por 12 horas y finalmente se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 570nm.

6.1.8. Antigenicidad de los péptidos derivados de la proteína Rv3587c con pacientes TBA, TBL y Donantes sanos

Se realizaron ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), utilizando sueros recolectados en estudios anteriores, para determinar la reactividad frente a cada péptido. Los individuos se agruparon en tres categorías: personas con tuberculosis activa (TBA, n=6), personas con tuberculosis latente (TBL, n=7) e individuos sanos (IS, n=7). El diagnóstico de TBA se basó en el cultivo positivo de esputo para *Mtb*. Se diagnosticó TBL por ensayo de liberación de interferón gamma positivo y asintomático, y finalmente, los IS por ensayo de liberación de interferón gamma negativo (QuantiFERON Gold Cellestis Limited, Valencia, EE. UU.) y cultivo de esputo negativo para *Mtb*.

Para el ELISA, se inmovilizaron 10 μ g/mL de los péptidos en placas de 96 pozos, fondo plano, por triplicado, posterior al bloqueo con leche-tween (para prevenir uniones inespecíficas) y lavado sucesivos con PBS y agua, los plasmas se adicionaron a una dilución 1:100, el anticuerpo que no se unió se retiró con lavados; se usó como anticuerpo secundario el monoclonal anti-IgG humano conjugado con peroxidasa (1:5000), se reveló con TMB 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (sustrato de la peroxidasa), la reacción se detuvo con ácido fosfórico 2N y se leyó a una absorbancia de 450nm; como control positivo, se usó lisado de *Mtb* H37Rv (122).

6.1.9. Selección de péptidos nativos y predicción de la unión de HLA-DR β con péptidos modificados

Teniendo en cuenta que al aplicar esta aproximación en el diseño de la vacuna sintética contra malaria se encuentra que los HABPs conservados no generan respuestas inmunitarias protectoras humorales o celulares en animales inmunizados, se ha determinado que tales secuencias deben ser modificadas (123).

Para seleccionar los péptidos a modificar, se tomaron aquellos HABPs que presentaran capacidad de inhibir la entrada de *Mtb* a ambas líneas celulares, que resultasen inocuos en el ensayo de toxicidad y con determinadas características estructurales, todos ellos derivados de las proteínas seleccionadas hasta ahora en el Grupo Funcional Tuberculosis de la FIDIC.

Una vez modificados estos péptidos, de acuerdo con criterios previamente descritos (99), se evaluó su unión a distintos alelos del HLA DR *in silico*, a través del servidor NetMHCIIpan versión 4.0 (124). Este servidor predice la unión de péptidos a las moléculas CMH-II: HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ y arroja los valores que caracterizan la unión como: la concentración media inhibitoria (IC50) correspondiente a la concentración (nM) necesaria para que se una el 50 por ciento de las moléculas y el percentil Rank indicado como valor a tomar en cuenta por los gestores de la plataforma, ya que se genera para un péptido comparando el puntaje de éste con los puntajes de 200,000 péptidos naturales al azar de la misma longitud del péptido de consulta. El valor de Rank es considerado por los autores como una mejor medida para definir péptidos de unión, los cuales fueron escogidos teniendo en cuenta que, un puntaje de 0 a 2 indicó uniones fuertes y de 2,1 a 15 uniones débiles, entre las secuencias peptídicas y los diferentes alelos del HLA-DR β 1, β 3, β 4 y β 5.

6.2. Presentación antigénica de péptidos modificados de las proteínas de *Mtb* a Linfocitos

6.2.1. Selección de los grupos de estudio

Los individuos incluidos en este proyecto fueron aquellos cuyo HLA-DR β 1 fue tipificado previamente, mediante la extracción de ADN genómico, procedimiento que estuvo a cargo del grupo de Biología Molecular e Inmunología de la FIDIC. Posteriormente, a estos individuos se les realizaron las pruebas de PPD y QuantiFERON Gold (Cellestis Limited), con el fin de determinar si los individuos habían estado en contacto con *Mtb*; ésta última prueba detecta el IFN- γ producido por células que reconocen péptidos provenientes de antígenos propios de *Mtb* como ESAT-6, CFP-10 y TB7.7. Las muestras se colectaron con previa firma de consentimientos informados.

Para aplicar las pruebas PPD, se hizo una punción inyectando 0,1 mL de derivado proteico purificado o tuberculina, en la zona intradérmica (justo debajo de la superficie de la piel) de la cara anterior del antebrazo; la aplicación de la prueba siempre contó con un seguimiento y respaldo médico en caso de que existiera la manifestación de un evento adverso. La lectura del endurecimiento se hizo a las 72 horas después de aplicado el PPD.

En cuanto a la prueba de QuantiFERON® Gold, una vez obtenida la muestra de sangre en tubo heparinizado de 10mL, ésta se distribuyó en los tubos Neil (sin antígeno), TB1 (Péptidos para LT CD4), TB2 (Péptidos para LT CD4 y LT CD8) y Mitógeno (fitohemaglutinina, PHA del inglés, *Phytohaemagglutinin*), se agitaron y se incubaron a 37°C por 24h, después se centrifugaron a 3000g por 15 min. y se recuperaron 150 μ L de plasma, de los cuales 50 μ L se dispusieron en placas de ELISA adsorbidas con anti-IFN- γ y se adicionaron 50 μ L de anti-human IFN- γ , tras lo cual se incubó a 22°C por 2h. A continuación, se aplicó la solución de lavado 6 veces para eliminar el exceso de anti-human IFN- γ y se agregaron 100 μ L de *Enzyme substrate solution* (TMB), se agitó, se incubó nuevamente a 22°C por 30 min, se frenó la reacción con 50 μ L de ácido sulfúrico 0,5 M y se leyó a 450 nM. Paralelo al montaje de las muestras, se preparó una curva de IFN- γ , y los resultados fueron analizados con el software *QFT-Plus Analysis*.

6.2.2. Presentación de los péptidos seleccionados

6.2.2.1. Obtención de PMBCs y plasmas

Para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), se tomaron muestras de sangre (60mL) en tubos heparinizados y se centrifugaron a 450 x g (~2700 rpm) por 7 min a 20°C. Se recuperaron los plasmas y se guardaron a -20°C para posteriores ensayos; luego, se recuperó la capa leucocitaria y se resuspendió en medio RPMI, suplementado al 10% de SFB. Se adicionó el *buffy coat* en RPMI, sobre el Ficoll-Histopaque sin alterar el gradiente de densidad, en proporción 2:1. Las muestras se centrifugaron a 650 x g (~2300 rpm) por 30 min a 20°C. A continuación, se extrajeron los anillos de glóbulos blancos resuspendiéndolos en medio RPMI suplementado, se centrifugaron a 400 x g (~1800 rpm), descartándose los sobrenadantes y las células se resuspendieron para su conteo con azul de tripán.

6.2.2.2. Linfoproliferación y evaluación de citoquinas Th1, Th2 y Th17

Para evaluar la expansión clonal de linfocitos al entrar en contacto con los antígenos candidatos, se llevó a cabo el ensayo de linfoproliferación *in vitro*, por triplicado, siguiendo la metodología previamente reportada con modificaciones (125). Las PBMCs fueron marcadas con CFSE (del inglés, *Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*) en una concentración de 1µM y se incubaron a temperatura ambiente por 15 min en condición de oscuridad, se lavaron y se resuspendieron en RPMI al 10% de SFB. Posteriormente 1,5x10⁵ células por pozo fueron dispuestas en cajas de 96 pozos de fondo redondo. El control positivo de estimulación fue fitohemaglutinina a 10µg/mL y como control negativo se emplearon células sin estímulo cultivadas en medio RPMI, sobre las cuales se calculó el índice de estimulación.

Los linfocitos fueron estimulados con los péptidos en concentración de 100µg/mL, concentración adoptada tras la estandarización del ensayo de linfoproliferación. En el ensayo, las células se incuban a 37°C y 5% de CO₂ por 5 días, al cabo de los cuales se recogen los sobrenadantes de cada pozo con los que posteriormente se detectan citoquinas correspondientes a los perfiles Th1, Th2 y Th17 por medio del kit BD™ CBA (del inglés, *Cytokine Bead Array*), para lo cual 50 µL del sobrenadante se pusieron en contacto con un cóctel de perlas acopladas a anticuerpos específicos para cada citoquina (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e IL-17), durante 3h a temperatura ambiente; luego se realizó un lavado con PBS 1X, los inmunocomplejos de citoquinas/anti-citoquina se detectaron con anticuerpos fluoromarcados, mediante citometría de flujo (Facs Canto II BD™); cada concentración de citoquina se determinó con una curva de calibración realizada en paralelo a la medición de las muestras. Los resultados fueron analizados con el software FCAP Array v3.0 (BD Biosciences). Una vez recogidos los sobrenadantes, las células se lavaron y éstas fueron analizadas por citometría multicolor, con el propósito de cuantificar la expansión de linfocitos T CD4, CD8, (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8) y evaluar memoria (CD45RA y CD45RO), para lo cual se adquirieron en el citómetro 10000 eventos por tratamiento, los datos se analizaron con el programa Flowjo™ V10.

6.3. Determinación de la función efectora de LT activados por péptidos candidatos en macrófagos infectados

6.3.1 Co-cultivos de linfocitos estimulados y macrófagos infectados

Con el objetivo de evaluar la actividad efectora de los LT estimulados (producto del ensayo de linfoproliferación anterior, numeral 6.2.2.2. de materiales y métodos), sobre el crecimiento micobacteriano en macrófagos, se planteó realizar un co-cultivo de linfocitos y macrófagos infectados con *Mtb*.

La obtención de macrófagos se hizo a partir de monocitos provenientes de la fracción adherente de PBMCs sin ningún estímulo. Los monocitos se aislaron de PBMCs incubados en RPMI al 1% de SFB en cajas de Petri por 3 horas en una atmósfera de 5% de CO₂ y 37°C. Terminado el tiempo de incubación, se comprobó la adherencia celular al microscopio de luz. A los macrófagos resultantes se les agregó RPMI al 10% de SFB (126). 4x10⁴ macrófagos, se pusieron en cajas de 48 pozos fondo plano, se infectaron con *Mtb* H37Rv GFP en un MOI 1:5, toda la noche; transcurrido este tiempo, a estos macrófagos infectados se les añadieron 4x10⁵ linfocitos estimulados, los cuales se obtuvieron del ensayo de linfoproliferación (numeral 6.2.2.2 de materiales y métodos).

El co-cultivo se mantuvo durante 3 días con la misma atmósfera (34). Se recogieron sobrenadantes para determinar la secreción de citoquinas y se evaluó la producción de óxido nítrico (indirectamente por la detección de nitrito, usando el Kit *Griess Reagent System* (Promega); siguiendo las instrucciones del fabricante; 50 µL del sobrenadante de cultivo se dispuso por cada pozo (cajas de 96), posteriormente, se adicionaron 50 µL de la solución de sulfanilamida, se incubó 10 min a temperatura ambiente y a continuación se adicionó el reactivo NED (N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato) con el que nuevamente se incubó la muestra por 10 min, a la misma temperatura. La concentración de nitrito, que es uno de los dos productos de descomposición primaria estable y no volátil del ON, se determinó con una curva de calibración realizada en paralelo a la medición de las muestras. La absorbancia se leyó a 530nm.

6.4. Evaluación de la función efectora de anticuerpos antígeno-específicos

Teniendo en cuenta que se ha evidenciado un importante papel de la respuesta inmune humoral en la protección frente a la TB, se planteó evaluar la respuesta antigénica de anticuerpos producidos por linfocitos B que reconociesen péptidos modificados, aislando inmunoglobulinas a partir de sangre periférica para determinar la función efectora de estos anticuerpos.

6.4.1. Determinación de la presencia de inmunoglobulinas afines a péptidos modificados en sueros humanos

Después de obtener los plasmas como se enunció anteriormente (numeral 6.2.2.1), se evaluó la presencia de inmunoglobulinas específicas para los antígenos por medio de ensayos de ELISA.

En el inmunoensayo, se realizó como se enunció en el numeral 6.1.8. para cada suero obtenido de los donantes.

6.4.2. Obtención de anticuerpos específicos dirigidos contra péptidos modificados

A continuación, de los sueros en donde se encuentren anticuerpos por ELISA, se realizó la extracción de inmunoglobulinas G, se implementó precipitación con ácido caprílico y sulfato de amonio. Posteriormente, se dializó con Tris 10mM pH 8,5 en membrana de 10000 Da y se concentró en Amicon de 10000 Da. La selección de anticuerpos específicos para cada antígeno, se realizó por cromatografía de afinidad CNBr-Activated Sepharose 4B; siguiendo las indicaciones del fabricante, se acopló 1 mg del antígeno. La elución del anticuerpo se hizo con Glicina-HCl (pH: 2,7-3); luego, el pH fue neutralizado con buffer Tris a pH 8 y las fracciones recuperadas se concentraron en Amicon 100,000 Da. Con el fin de verificar la pureza de las inmunoglobulinas obtenidas, se hizo un SDS-PAGE, con un peso esperado de 50kDa para las cadenas pesadas de IgG y para las cadenas livianas de 25 kDa. Estas proteínas se cuantificaron con el kit micro BCA (Ácido bicinonínico) y con el coeficiente de extinción molar de las inmunoglobulinas G; el reconocimiento de los antígenos se verificó por ELISA y Dot blot, utilizando como anticuerpo secundario *anti-human* IgG peroxidasa.

6.4.3. Ensayos función efectora de anticuerpos

Una vez obtenidas las inmunoglobulinas y tomando en consideración la diversidad de funciones efectoras que se les han descrito, se evaluaron algunas de éstas.

6.4.3.1. Inhibición de la entrada de *Mtb* a la línea humana de macrófagos U937

El experimento se hizo como los anteriores ensayos de inhibición de la entrada de *Mtb* (numeral 6.1.7 de materiales y métodos) con algunas modificaciones:

Mtb H37Rv GFP (1×10^8 bacilos) fue incubada con los anticuerpos aislados IgG ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$, cantidad estandarizada en ensayos previos) por 2h a 37°C y se lavaron con PBS. Simultáneamente, 1×10^5 células U937 fueron infectadas tanto con la micobacteria sin tratar como con aquella preincubada con los anticuerpos. Transcurridas 12 horas de incubación, las células se lavaron para remover la micobacteria extracelular y se evaluó la entrada del bacilo por citometría de flujo y los ensayos se hicieron por triplicado (35).

6.4.3.2. Evaluación de activación de células polimorfonucleares (PMN) dependiente de anticuerpo

Para evidenciar el efecto de la fagocitosis mediada por anticuerpos afines a candidatos vacunales, sobre el tipo de muerte celular en neutrófilos, se procedió a aislar los PMN a partir de sangre completa; en primera estancia, se hizo gradiente de Ficoll-Histopaque como se mencionó anteriormente, se extrajo la capa intermedia entre los eritrocitos y el ficoll, las células rojas se lisaron con solución de lisis ($\text{NH}_4\text{Cl}:1.5\text{M}$, $\text{NaHCO}_3:0.1\text{M}$ y $\text{Na}_2\text{EDTA}:0.01\text{M}$). Su pureza se verificó con anti-CD16b (receptor Fc γ IIIb) y tinción de *Wright*. Posteriormente, para el ensayo de fagocitosis de neutrófilos, se utilizó *Mtb* H37Rv GFP en un MOI de 1:5, el tratamiento de la micobacteria con las inmunoglobulinas se realizó como se enunció en el numeral 6.4.3.1; a continuación, 5×10^4 neutrófilos se pusieron en contacto con micobacteria sola, aquella preincubada con los anticuerpos por 2h a 37°C . Concluida la incubación, se retiró el microorganismo que no ingresó a los polimorfos mediante lavados; el tipo de muerte celular se evaluó mediante la detección de Anexina V y marcación con yoduro de propidio (127),

adicionalmente, la apoptosis se examinó por morfología celular fijando los neutrófilos en lámina por calor para posteriormente aplicar coloración de Giemsa.

6.5. Modelo animal primate no humano

6.5.1. Grupo experimental

Para el estudio, se usaron 20 individuos pertenecientes a la especie *Aotus vociferans*, mantenidos en la estación de primates de la FIDIC en la ciudad de Leticia, Amazonas, Colombia, bajo el cuidado de un profesional veterinario. El estudio fue aprobado por el Comité de ética de la Fundación Instituto de Inmunología; los individuos se mantuvieron según las regulaciones vigentes para el cuidado animal contenidas en la ley 84 de 1989 del Ministerio de Salud de Colombia, que concuerda con los lineamientos de la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (USA), con la supervisión semanal de CORPOAMAZONIA (permiso otorgado desde 1990, la última versión codificada 0632 y 0042/2010 fue renovada el 2 de abril de 2020 (resolución 0366)). Tras su ingreso a la estación, a los *Aotus* se les determinó sexo, peso y se les practicó un examen clínico-físico, para verificar sus condiciones de salud. Los animales fueron mantenidos en condiciones similares a su ambiente natural, con temperatura entre 20°C y 30°C con una humedad relativa de 83%, la dieta de alimentación basada en frutas, vegetales y suplementos nutricionales.

6.5.2. Inmunización

Antes de la inmunización con los péptidos poliméricos modificados, se obtuvieron muestras de 2 mL de sangre periférica de cada primate, estas se denominan Pre-inmune (Pre-I). Para la inmunización se utilizaron 0,25mL de una mezcla de los péptidos modificados 40412, 40416, 40418 y 40422 (derivados de la proteína Rv0180c), 40432 (derivado de la proteína Rv2270), 40448 (derivado de la proteína Rv3494c) y 40450 (derivado de la proteína Rv0679c) con adyuvante incompleto de *Freund*. La mezcla péptidos-adyuvante se inoculó por vía subcutánea a 17 primates, mientras que a tres animales restantes se les administró sólo adyuvante incompleto de *Freund*. Se llevaron a cabo 3 inmunizaciones en los días 0, 20, 40 y veinte días después de cada una se recolectaron muestras de 2mL sangre para su posterior procesamiento. Después de la tercera sangría, los primates pasaron 14 días en la zona de rehabilitación donde fueron continuamente examinados por profesionales especializados para verificar su condición de salud, como había sido determinado por el Comité de Ética. Finalmente, los monos *Aotus* fueron liberados a la selva amazónica en la presencia de representantes de CORPOAMAZONIA. Para obtener los plasmas, los tubos con las muestras sanguíneas se centrifugaron a 2700 rpm por 7 min a 4°C y se guardaron a -20°C para posteriores ensayos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación de péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv involucrados en la interacción hospedero-patógeno.

7.1.1. Aproximación bioinformática en la caracterización de Rv3587c

En primer lugar, se realizó el análisis bioinformático para aportar información en la caracterización de la proteína. Con el análisis por BLAST, se observó 100% de identidad de la proteína Rv3587c de *M. tuberculosis* H37Rv con secuencias dentro del complejo MTB: *M. tuberculosis* cepa *Beijing*, *M. tuberculosis* CCDC5180, *M. tuberculosis* Erdman, *M. tuberculosis* ZMC13-88, *M. tuberculosis* XTB13-086, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* y *M. canetti*.

Los análisis con TMHMM 2.0 and HMMTOP, mostraron la presencia de una hélice transmembranal entre los residuos 20-42 o 21-41; la cual podría corresponder a la región del péptido señal, encontrándose un extremo intracelular, N-terminal entre los residuos 1 y 19 y una región extracelular entre los residuos 43 y 264. El programa *SignalP* 3.0 predijo un sitio de clivaje para el péptido señal entre las posiciones 47-48 (0.651 max. probabilidad de sitio de clivaje, 0,979 probabilidad del péptido señal). Por último, los programas *TBpred* y *Phobius* predijeron que la proteína Rv3587c era proteína integral de membrana.

7.1.2. El gen *rv3587c* está presente y se transcribe en todas las micobacterias del estudio

Después del análisis bioinformático que predijo la localización de la proteína en la membrana celular, se procedió a examinar la presencia y transcripción del gen *rv3587c* (Fig. 4). Como primer paso se amplificó el gen *hsp65* usando ADN genómico (ADNg) de buena calidad aislado de diferentes micobacterias banda de 439pb (Fig. 4A). Se encontró que el gen *rv3587c* estaba presente en todas las micobacterias involucradas en el estudio, incluyendo aquellas que forman parte del complejo MTB como *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis*, *M. bovis* BCG y la cepa no virulenta *M. smegmatis* (Fig. 4B). La transcripción del gen *hsp65* fue evidente en todas las cepas de estudio con una banda de 439pb (Fig.4C). Por último, la Fig. 4D, muestra una banda de 202pb para el gen *rv3587c*, destacando su activa transcripción en condiciones normales de cultivo de la micobacteria.

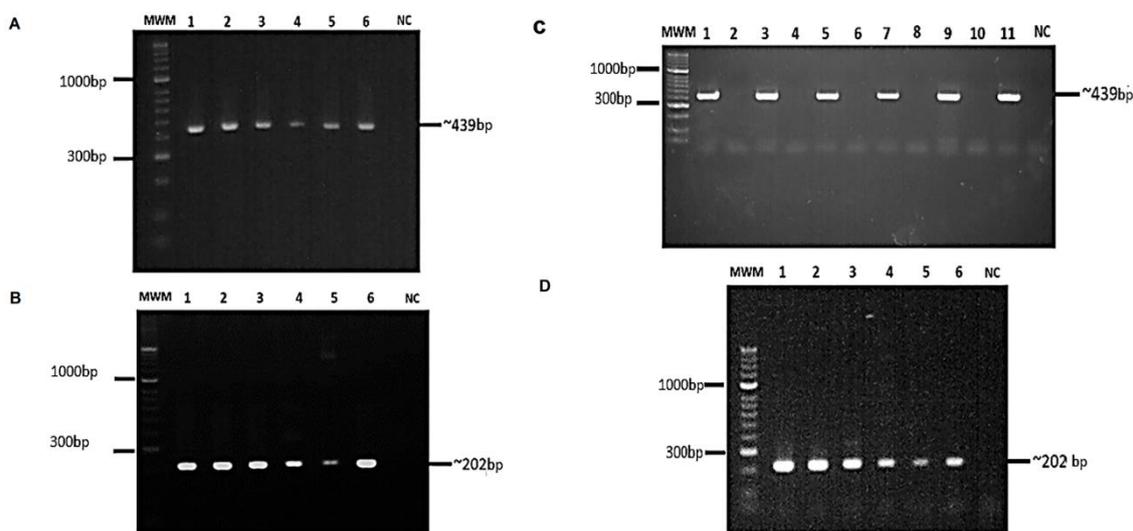


Figura 4. Presencia y transcripción del gen *rv3587c*. **A** Amplificación del gen *hsp65* del ADNg aislado de: 1. *M. tuberculosis* H37Rv; 2. *M. tuberculosis* H37Ra; 3. *M. bovis*; 4. *M. bovis* BCG; 5. *M. smegmatis*; 6. Control positivo de PCR; NC: Control negativo de PCR. MWM: Marcador de peso molecular 50pb (HyperLadder II); **B** Amplificación del gen *rv3587c* de ADNg aislado de: 1. *M. tuberculosis* H37Rv; 2. *M. tuberculosis* H37Ra; 3. *M. bovis*; 4. *M. bovis* BCG; 5. *M. smegmatis*; 6. Control positivo de PCR; NC: Control negativo de PCR. **C** Amplificación del gen *hsp65* a partir de ADNc de: 1. *M. tuberculosis* H37Rv (+) síntesis; 2. *M. tuberculosis* H37Rv (-) síntesis; 3. *M. tuberculosis* H37Ra (+) síntesis; 4. *M. tuberculosis* H37Ra (-) síntesis; 5. *M. bovis* (+) síntesis; 6. *M. bovis* (-) síntesis 7. *M. bovis* BCG (+) síntesis; 8. *M. bovis* BCG (-) síntesis; 9. *M. smegmatis* (+) síntesis; 10. *M. smegmatis* (-) síntesis; 11. Control positivo de PCR (ADNg de *M. tuberculosis* H37Rv); NC: Control de PCR negativo; MWM: marcador de peso molecular de 50 pb. **D** Amplificación del gen *rv3587c* a partir de ADNc de: 1. *M. tuberculosis* H37Rv; 2. *M. tuberculosis* H37Ra; 3. *M. bovis*; 4. *M. bovis* BCG; 5. *M. smegmatis*; 6. Control positivo de PCR; NC: Control de PCR negativo. MWM: marcador de peso molecular de 50 pb.

7.1.3. Ensayos de receptor-ligando evidencian HABPs para dos líneas celulares

Luego de comprobar la transcripción de la proteína Rv3587c en *Mtb* H37Rv, se sintetizaron los péptidos que comprenden la secuencia de ésta; los ensayos receptor-ligando se usaron para determinar las secuencias específicas de unión a las células blanco. Los péptidos que presentaron porcentaje de unión específica mayor a 1%, se denominaron HABPs (*High Activity Binding Peptides*). Se encontró que la región comprendida entre los residuos ¹¹⁶Leu y ¹⁹³Thr, que contenían los péptidos 39263 a 39266, presenta alta capacidad de unión específica a las dos líneas celulares probadas, U937 y A549 (Fig. 5). Se resalta que el péptido 32965 presentó un alto valor de unión específica tanto a las células epiteliales A549 (9,1%) como a macrófagos U937 (4,4%). Estos péptidos podrían compartir un receptor común para ambas líneas celulares.

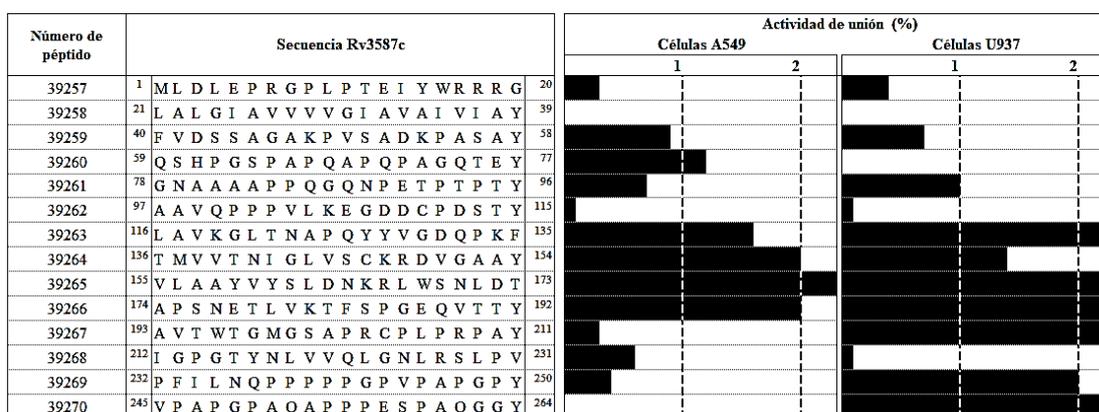


Figura 5. Perfil de unión de los péptidos a las líneas celulares A549 y U937. Los números de los péptidos se asignan de acuerdo con la numeración interna de FIDIC y las secuencias de aminoácidos se muestran a la izquierda de la figura. Las barras negras horizontales representan la capacidad de unión específica, expresada como porcentajes para cada péptido con respecto a ambas líneas celulares ensayadas. Las líneas punteadas verticales muestran el límite de unión específica del 1% por encima del cual se consideró que un péptido era un HABP.

El péptido 39260 (⁵⁹QSHPGSPAPQAPQPAGQTEY⁷⁷) fue HABP sólo para las células A549 (1,1% de unión específica) mientras que los péptidos 39267 (3,7% de unión específica) (¹⁹³AVTWTGMGSAPRCPLRPAY²¹¹), 39269 (3,1%) y 39270 (2,7%) del extremo C-terminal de la proteína (²³²PFILNQPPPPPGPVPAPGPAQAPPESPAQGGY²⁶⁴) fueron HABPs para macrófagos alveolares (derivados de monocitos U937). En total, los ensayos de receptor-ligando permitieron identificar 5 HABPs para las células epiteliales A549 y 8 para los macrófagos alveolares U937. Futuros estudios deben ser orientados hacia definir la naturaleza de los receptores usados por los péptidos con alta capacidad de unión. Un ensayo de saturación se usó

para determinar las constantes fisicoquímicas de la interacción HABP-célula hospedera, en éstos se mantuvo una concentración constante de células y se adicionaron concentraciones crecientes de péptido radiomarcado, en un intervalo más amplio que el utilizado para la selección inicial de péptidos, hasta alcanzar la saturación de la unión específica; para esto, se requirió la presencia o ausencia de péptido no radiomarcado. La tabla 4 muestra que, para el péptido 39263 (¹¹⁶LAVKGLTNAPQYYVGDQPKF¹³⁵), las constantes que definen la interacción se encuentran en el mismo orden de magnitud para la unión con las dos líneas celulares; para el péptido 39264 (¹³⁶TMVVTNIGLVSCKRDVGAAAY¹⁵⁴) sólo se encuentra variación en el número de sitios receptores sobre las células blanco de infección. El péptido 39265 (¹⁵⁵VLAAYVYSLDNKRLWSNLDT¹⁷³) tuvo mayor afinidad por las células epiteliales que por los macrófagos alveolares y, por último, el péptido 39266 presentó afinidad similar ambas líneas celulares, pero mayor número de sitios receptores en los macrófagos alveolares.

En todos los casos el coeficiente de Hill (n_H) presentó valores mayores a 1, indicando las interacciones presentan cooperatividad positiva, lo que quiere decir que la unión inicial de una molécula de péptido a su receptor puede facilitar la asociación de otras moléculas del mismo péptido.

Tabla 4. Constantes fisicoquímicas de la interacción célula –HABP

Número de péptido	Células A549			Células U937		
	Kd (nM)	n_H	Sitios de unión ($\times 10^6$)	Kd (nM)	n_H	Sitios de unión ($\times 10^6$)
39263	3,500	1.5	8.1	4,100	1.3	3.7
39264	3,500	1.1	0.7	3,500	1.5	6.2
39265	1,500	1.5	11.1	3,600	1.3	10.6
39266	4,700	1.4	4.0	3,600	1.2	9.3

7.1.4. HABPs inhiben la invasión de *Mtb* H37Rv a macrófagos alveolares y células epiteliales

Después de identificar los HABPs para las dos líneas celulares y conocer algunas de las características de unión por medio de los ensayos de saturación, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la entrada de *Mtb* en las mismas células blanco; el péptido 39265 inhibió la entrada de la micobacteria para ambas líneas celulares de manera dependiente de la concentración (Fig. 6); este péptido tuvo el más alto porcentaje de unión específica de los HABPs (Fig. 5). En las células A549, tres de los cinco péptidos mostraron tener actividad inhibitoria de la entrada de *Mtb*; de manera interesante, se observó que el péptido no-HABP 39262, presentó inhibición dependiente de concentración en la entrada de la micobacteria a las células epiteliales, en un porcentaje similar al mostrado por el lisado completo de *Mtb* H37Rv (cerca al 80%) (Fig. 6A), mientras que los HABPs 39260, 39263 y 39264 no inhibieron la entrada del patógeno. Por otra parte, para U937, en seis de los siete HABPs se evidenció inhibición, particularmente en presencia de los péptidos 39266 y 39267, de manera dependiente de concentración (Fig. 6B); éste último inhibió a 200 μ M, más que el control de lisado micobacteriano. Por último, el péptido 39270 inhibió sólo a la máxima concentración y el péptido 39260 (un no-HABP) fue capaz de inhibir la entrada de *Mtb*.

Los ensayos de citotoxicidad permitieron evidenciar que los péptidos, no fueron tóxicos para los macrófagos o para células epiteliales.

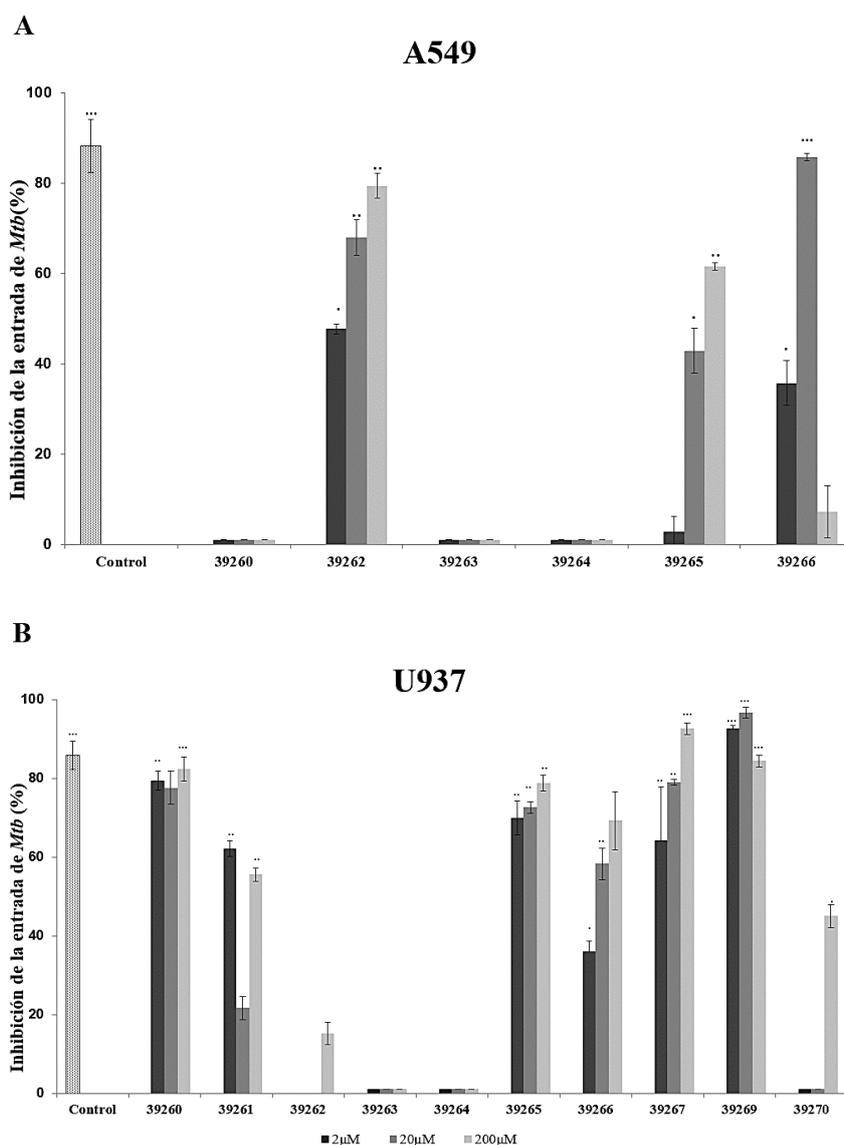


Figura 6. Ensayo de inhibición de la entrada de *Mtb* a las células A549 y U937. Se utilizaron concentraciones de 2, 20 y 200 μM para ambas líneas celulares. Como control de la inhibición, se usó el lisado de *Mtb* H37Rv a concentración 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **A** Inhibición de la entrada a células A549 y **B** a células U937. Los resultados de la prueba *t-Student* se representan por puntos por encima de cada barra: $\cdot \leq 0,05$, $\cdot\cdot \leq 0,01$ y $\cdot\cdot\cdot \leq 0,001$.

7.1.5. HABP 39265 tuvo pobre reconocimiento antigénico

Teniendo en cuenta que nuestro enfoque está dirigido a la búsqueda de antígenos para ser incluidos en una vacuna multi-epítotope anti-tuberculosis, se determinó si los péptidos de la proteína Rv3587c eran reconocidos por sueros de individuos previamente expuestos a la micobacteria. En la figura 7, se muestra el alto reconocimiento en individuos con tuberculosis activa, que tienen diferencias significativas respecto al reconocimiento de aquellos con tuberculosis latente y los donantes sanos. Los péptidos más antigénicos provienen del extremo C-terminal de la proteína ($^{175}\text{Ala} - ^{251}\text{Pro}$), pero no se asociaron con la capacidad de unión o de inhibición.

El HABP 39265, que inhibió la entrada de *Mtb* H37Rv en ambas líneas celulares se destaca por presentar muy baja antigenicidad, lo que está de acuerdo con los hallazgos en experimentos

llevados a cabo para el desarrollo de una vacuna sintética antimalárica, donde los HABPs son inadecuados para obtener alguna respuesta inmune protectora tanto humoral como celular en animales inmunizados; tales secuencias deben ser modificadas (46).

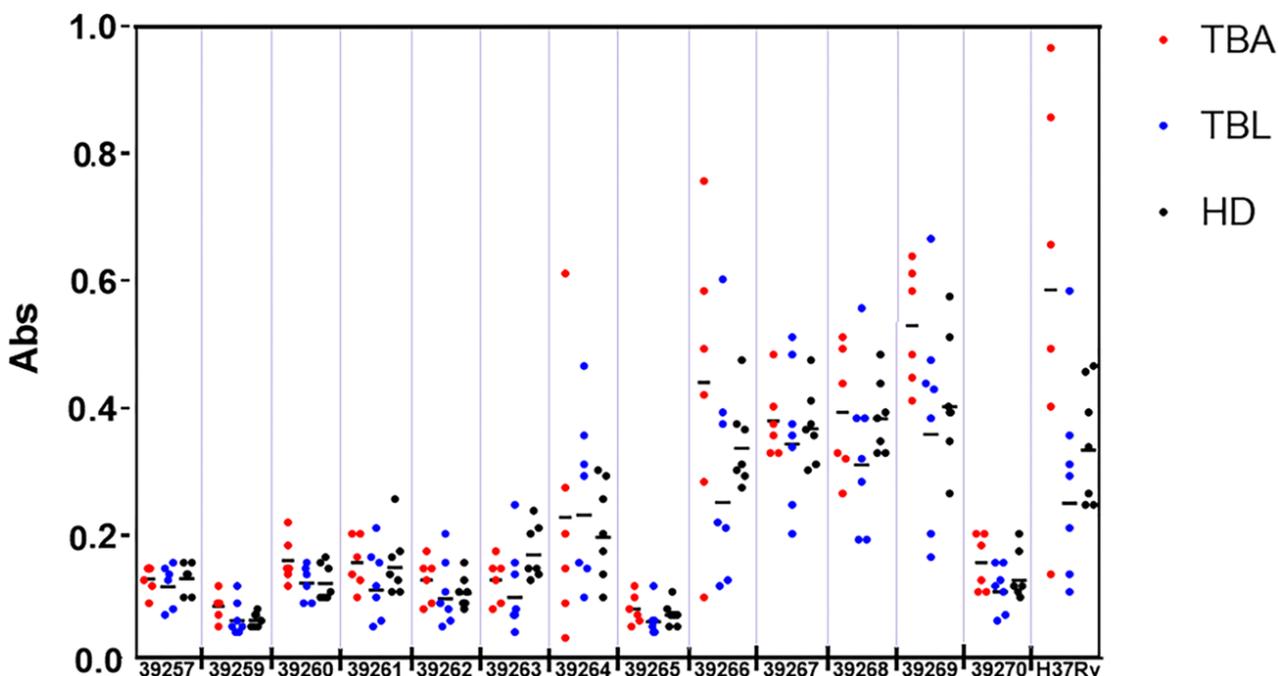


Figura 7. Reconocimiento antigénico de los péptidos de Rv3587c. Se evaluaron sueros de individuos con tuberculosis activa (TBA) y latente (TBL) e individuos sanos (HD). Se usó PBS como control negativo con respecto al reconocimiento y sueros obtenidos de la inmunización de un conejo con el lisado total de *MtbH37Rv* como control positivo.

7.1.6. Estructura secundaria de los péptidos sintéticos

Teniendo en cuenta la evidencia que péptidos con estructura secundaria tipo poly L-proline pueden acoplarse mejor al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH-II), resultando en una mayor estabilidad de la unión péptido-CMH-II, mejorando su presentación y así generando una respuesta inmune protectora, se evaluaron los elementos de estructura secundaria que pudiesen presentar los péptidos de la proteína Rv3587c.

El análisis de las deconvoluciones del dicroísmo circular, reveló elementos, que en su mayoría son diferentes a aquellos predichos por SOPMA (*self-optimised prediction from multiple alignment*- predicción auto-optimizada de alineación múltiple) (figura 8A). Se emplearon tres programas para realizar las deconvoluciones, SELCON3, CONTINLL y CDSSTR, para seleccionar el programa, se usó el menor valor NRMSD (*Normalized root mean square deviation*-Desviación cuadrática media de la raíz normalizada); de estos análisis, se obtuvo que 11 péptidos contienen elementos de estructura de hélice α , mientras que la predicción *in silico* mostraba estructuras *random coil* (Figura 8A y 8B). Las curvas de DC para los péptidos 39257, 39264, 39265, 39266 y 39268 muestran picos característicos de hélices α (192, 209 y 222nm). Los otros péptidos tienen curvas características de estructuras *random coil* a pesar de que el software usado en la deconvolución identificó elementos helicoidales. Los péptidos 39261 y 39269 no pudieron ser analizados por ninguno de los programas; la curva de 39261 parece indicar elementos de poli L-prolina y la de 39269, *random coil*. La Fig. 8C muestra la predicción de la estructura terciaria de Rv3587c, la secuencia fue sometida a los servidores nFOLD3, I-TASSER y Phyre2. El servidor

nFOLD3 proporcionó el mejor QMEAN (0,693), en comparación con I-TASSER (0,345) y Phyre2 (0,275). El valor del modelo cualitativo de análisis de energía (QMEAN) (0 a 1) fue considerado como parte de los criterios para elegir el mejor modelo, donde 1 significa la mayor similitud con el plegamiento de otras proteínas resultante de combinar patrones geométricos comparando el modelo con estructuras cristalizadas similares. El gráfico de Ramachandran ubicó el 91,3% de los residuos en regiones favorecidas (se espera más del 90% en un modelo de buena calidad), 7,8% en regiones permitidas y 0,8% en regiones no autorizadas. Qmean Z-score indicó que la calidad absoluta del modelo arrojado por nFOLD3, que fue al menos una desviación estándar entre la predicción y la posible estructura nativa. Qmean Z-score se obtuvo por comparación con alta resolución de estructuras de rayos X de la misma dimensión (es decir, medir la compatibilidad entre la secuencia y la estructura) (Figura 8C). La colocación de HABPs con respecto a la estructura propuesta de la proteína Rv3587c reveló accesibilidad para la interacción entre los péptidos 39263, 39264, 39265 y 39266 con ambas líneas celulares.

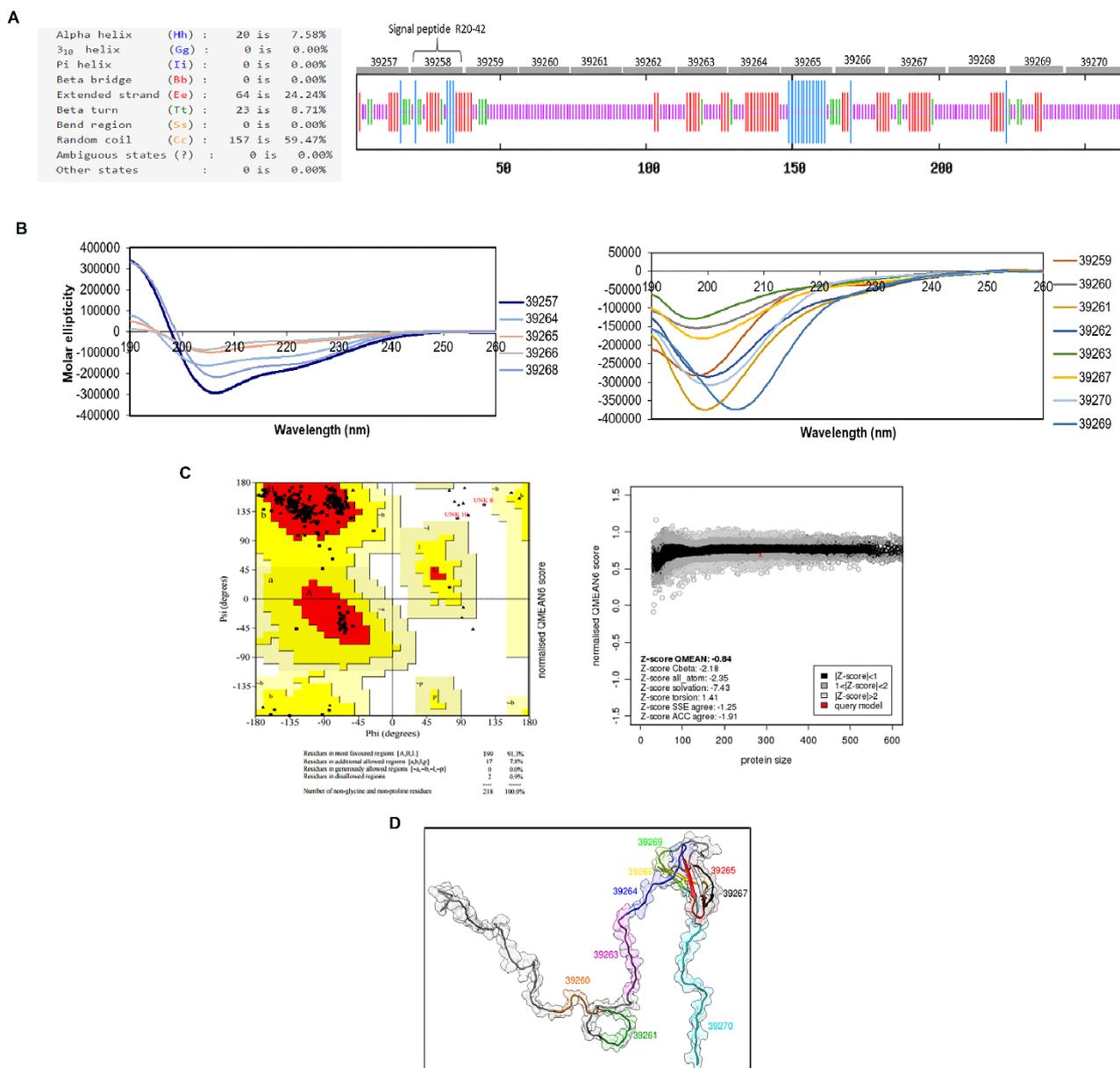


Figura 8. Aspectos estructurales de Rv3587c. **A** Análisis de Bioinformática implicó la obtención de la predicción de un modelo de estructura secundaria por SOPMA, representando cada residuo y el péptido

señal. **B** Dicroísmo circular de los péptidos de 20 aa pertenecientes a Rv3587c. **C** Estructura terciaria predicha para Rv3587c. Un diagrama de Ramachandran se utilizó para evaluar la estructura terciaria; en rojo las regiones favorecidas (núcleo), amarillo las regiones permitidas y rosa las regiones no permitidas. También se muestra el análisis cualitativo de la energía del modelo (QMEAN); se utilizó para evaluar la calidad del modelo de la proteína, que combina la puntuación compuesta con la información relativa a la densidad estructural. **D** Colocalización de péptidos sobre la estructura terciaria predicha.

7.2. Presentación antigénica de péptidos modificados de las proteínas de *Mtb* a Linfocitos

7.2.1. Selección de péptidos nativos y predicción de la unión de HLA-DR β con péptidos modificados

La selección de antígenos se basó en péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv en los cuales anteriormente se evidenció alta actividad de unión específica a células A549 y U937, que podrían inhibir la entrada de la micobacteria a estas células blanco de infección y que presentaban elementos de estructura secundaria característicos. Los péptidos sin modificar derivados de las proteínas se denominaron **nativos**. Estas secuencias fueron modificadas con base en criterios previamente publicados (46), con el fin de que estos encajaran mejor en las moléculas del HLA-DR de las células presentadoras de antígeno, para permitir la presentación de los péptidos a los LT e inducir una respuesta inmune protectora en contra del desarrollo de la enfermedad. En la tabla 5, se muestran tanto las secuencias nativas como las modificadas derivadas de éstas (en negrilla).

Tabla 5. Secuencias nativas y modificadas. Los códigos de los péptidos corresponden a la numeración sistemática de la FIDIC, se observan las secuencias de los péptidos nativos y modificados, los aminoácidos sombreados representan los cambios en los residuos que están en contacto con los bolsillos 1, 4, 6 y 9 del HLA. Adicionalmente se consignan los datos correspondientes al número de aminoácidos cambiados y el porcentaje de la secuencia conservada en los péptidos modificados.

PROTEÍNA	PÉPTIDO	SECUENCIAS	CAMBIOS EN AA	% CONSERVADO
Rv0227c	16951	PRLGSAQFPFPPDAGHPDPG		
	40396	PL F SG S Q E PD S QDAGHPDPG	7	65
Rv1268c	37964	AVALGLASPADAAAGTMYGD		
	40398	AQA L SL S SPAD S AAGTMYGD	3	85
Rv1411c	37096	PDFNATQFPVPATVWIQE		
	40400	PD F NA L Q F V P S T QW I QE	3	85
Rv2560	11024	VVALSDRATTAYTNTSGVSS		
	40404	ALSDRATT A FT P TS G V S SK	3	85
Rv2707	16084	RIGVGTTTYSSTAQHSAAVAA		
	40406	RIGVGT P D F S A D S L S V A AA	10	50
Rv3166c	16295	LITSRRQRKSAPARISGDRY		
	40408	SE L TA L RR L KS P AS L RS G DR	11	45
	16298	MERELSHVPGVAPQDFDTPY		
	40410	MER E L S L V PG A Q P QDFDTPY	3	85
	16300	VSLFAEARFSPHVMNEEHREY		
40412	LQ S L R AM K R L P S HQ M NEE H R	8	60	
Rv0180c	31024	AALYLGGLLNPMTNLRHFPI		
	40416	AA L Y L D P K L N P K T NLRHFPI	4	80
	31025	GPAGQQIVDGLVSLDKNKF		
	40418	GPAGQQIVD G L Q S L G P M N L F	5	75
	31032	KSTAYNPLPNGTGNGLSAFY		
			3	85

	40420	KPSA F N L D N G T A N G L S A F Y		
	31039	LGLPSAGATVPLEAVPAFFRY		
	40422	LGLPSAGATVPLEA L P S FFRY	2	90
	31028	RDFGASAVTPTRTRDREPAITIIY		
	40424	SS Q L R P F G S A Q R P TRTRDRP	10	50
Rv2270	37775	TSSNGARGGIAS ^T NMNP ^T NPY		
	40428	ARG G L S A D P K P N R G P P A T A E	16	20
	37777	ETWINLQVGD ^T LADLPPADLY		
	40430	WI P Q L Q G D T R A P R PPADLSR	10	50
	37780	GFAPY T G Q S V D T S P Y S V A Y L		
	40432	GFAP F T A S E V T V P Y S V A Y L	6	6
Rv1911c	37765	YVPKATTVDAT T PAPAAEPL		
	40436	PKAT S F D A S T F A P A E PL	3	100
	37767	GANVAPPLTWSSPAGAAELAY		
	40438	GANVAP L T W S S P A S A AQLAY	2	90
Rv2004c	9111	AGYAVRSGDTAPASLRDFYI		
	40440	AG F Q A F S S P T S PASLRDFYI	5	75
Rv2301	30960	CPNTRLVPGGYSLGAAVTDV		
	40442	SMANSTPN T R L Q P F G S L SSA	12	40
Rv1980c	36827	TQIQMSDPAYNINISLPSYY		
	40444	SDPAY N L N L S L S YYPDQKS	8	60
Rv3494c	38373	HMRLNSGTAIPSNVTATVRSY		
	40448	AH M RL N S G PS L QADQKGTRQ	11	45
Rv0679c	30987	YKNGDPTIDNLGAGNRINKE		
	40450	LGAGP Y K P L D N L K S N L GAGN	9	55

A los péptidos anteriormente enunciados, se les realizó la predicción de unión de HLA-DRβ1, β3, β4 y β5 empleando el servidor NetMHCIIpan versión 4.0 (128). Se determinó la unión a los linajes alélicos HLA-DRβ1 del *01 al *16, HLA-DRβ3 *01, *02, *03, HLA-DRβ4*01 y HLA-DRβ5*01 y*02 de los péptidos de la tabla 5, observándose que sólo 4 HABPs presentaron uniones débiles o fuertes a los alelos evaluados; las uniones fuertes correspondieron a los péptidos 31024 con un Rank de 2,0 para el linaje alélico HLA-DRβ1 08 y 36827 con Ranks correspondientes a 1,4 y 1,7 para HLA-DRβ1 04 y 14, respectivamente y 0,7 para HLA-DRβ3. Aunque en principio se trata de una aproximación bioinformática, se puede ver reflejado lo comentado anteriormente en donde se dice que *HABPs conservados pueden ser inadecuados para provocar respuestas inmunitarias protectoras*. Por otra parte, péptidos como el 36827 presentan una unión predicha a 13 DRs, seguido del 31024 que podría interactuar con 11 y 37096 con 4 DRs, por último, está 38373 afín a DRβ1*13-14* y DRβ3*02 y*03 (Fig. 9A).

Posterior a la modificación de los péptidos (que se denominarán mHABPs), se evidenció un aumento en la unión predicha de éstos a los diferentes linajes alélicos de los HLA-DRβ1, β3, β4 y β5 como lo muestra la figura 9A para la unión de 15 secuencias modificadas, dado que un poco menos de la mitad de los mHABPs, no presentaron ninguna probabilidad de unión ya sea fuerte o débil a los alelos evaluados dentro de cada linaje alélico, de acuerdo con el percentil Rank. El análisis revela péptidos promiscuos, es decir que se unen a varios DRs entre los que se destacan 40408, presentando unión a un 79% de los alelos evaluados, 40412 (63%), 40426 (73%) y 40444 (63%), por otra parte, existen otras secuencias peptídicas como 40416 y 40438, los cuales se unen a de un linaje alélico específico (HLA-DRβ1 03 y HLA-DRβ1 09, respectivamente). En cuanto a los DRs, DRβ1*01, *04, *07 *09 y *10 son los que presentan el mayor número de péptidos de

unión, dentro de los que se encuentran los alelos de mayor frecuencia en la población. Por último, al realizar el análisis teniendo en cuenta los péptidos por proteína, se obtuvo que, entre las 15 proteínas seleccionadas, 4 no tuvieron epítopes T de unión a algún DR, las demás presentaron péptidos de unión a uno o más alelos (Fig. 9B).

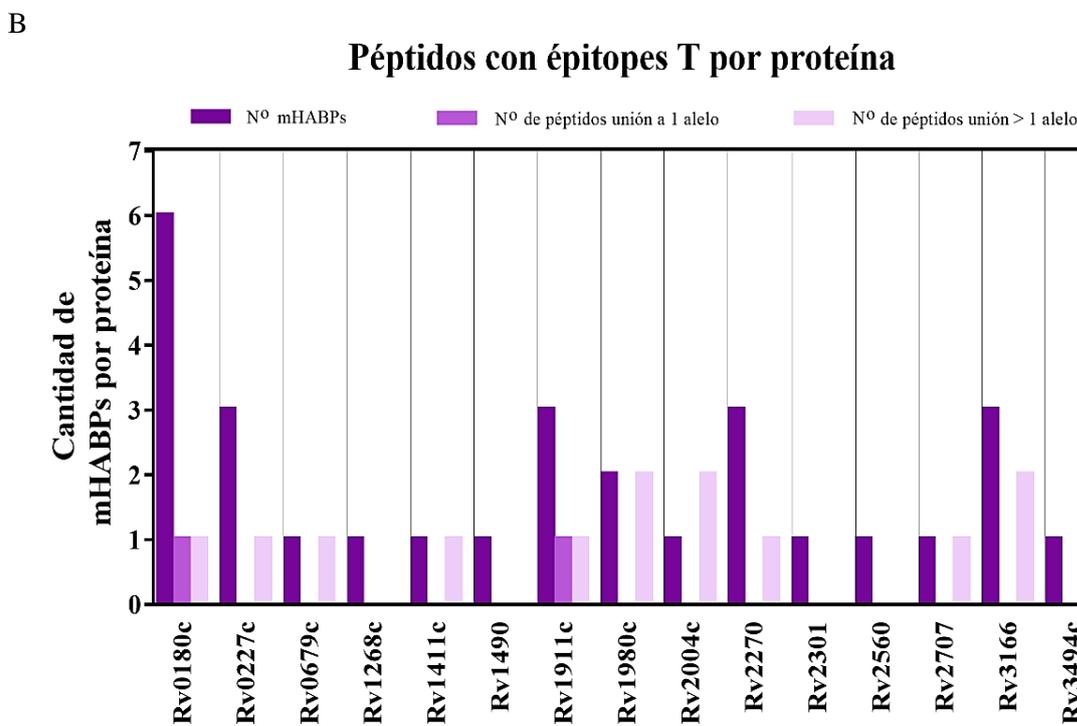
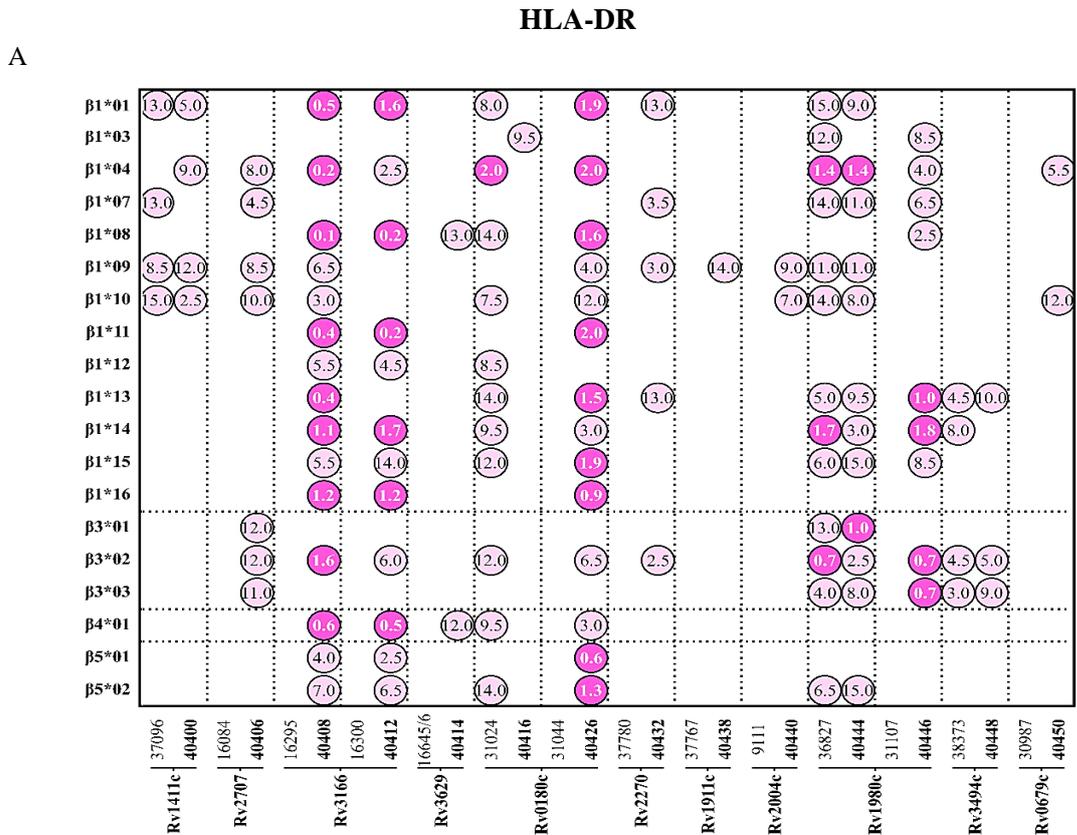


Figura 9. Perfil de unión de péptidos nativos (cHABPs) y modificados (mHABPs) a moléculas HLA Clase II. A En el eje Y se presentan los alelos HLA-DRβ1, β3, β4 y β5, en el eje X los cHABPs y mHABPs (en

negrilla), dentro de los círculos fucsia se encuentra el valor del percentil Rank que indica uniones fuertes (>2,0) y uniones débiles ($\leq 2,0$). **B** Número de epítopes por proteínas.

Del grupo de personas tipificadas mediante la extracción de ADN genómico, procedimiento llevado a cabo por el grupo de Biología Molecular e Inmunología de la FIDIC, se consignan los resultados de la tipificación referente a HLA-DR β 1. La tipificación de los donantes indica que, en esta muestra poblacional, se puede evaluar la respuesta inmune de péptidos candidatos de acuerdo a su afinidad por cada familia alélica a HLA-DR β 1*01, *03, *04, *07, *08, *11, *13, *14, *15 y *16 (tabla 6).

El 87,5% de los donantes resultaron negativos para la prueba de PPD, mientras que el 81,2 %, lo fue para QuantiFERON, en aquellos positivos para PPD y negativos para la prueba de interferón se indicaba contacto con micobacterias, pero no *Mtb*.

Tabla 6 Tipificación HLA-DR β 1 mediante Exón 2, pruebas de PPD y QuantiFERON

DONANTE N°	HLA DRB1		PRUEBA PPD	QuantiFERON
1	04:HTWY	07:01:01	NEGATIVO	NEGATIVO
2	01:02:01	15:01	NEGATIVO	NEGATIVO
3	04:07	07:01	NEGATIVO	NEGATIVO
4	01:02:01	01:02:01	NEGATIVO	NEGATIVO
5	13:02:01	08:02:01	POSITIVO	NEGATIVO
6	15:03:01	03:01	NEGATIVO	NEGATIVO
7	11:04:01	14:02	NEGATIVO	POSITIVO
8	15:01	13:05:01	NEGATIVO	POSITIVO
9	04:05:01	04:11:01	NEGATIVO	NEGATIVO
10	01:AUCN	11:04:01	NEGATIVO	NEGATIVO
11	13:03:01	04:HTWY	NEGATIVO	NEGATIVO
12	01:03	03:01	NEGATIVO	NEGATIVO
13	16:02:01	11:02:01	NEGATIVO	NEGATIVO
14	14:02	07:11	POSITIVO	NEGATIVO
15	01:02:01	04:HTWY	POSITIVO	POSITIVO
16	01:02:01	04:HTWY	NEGATIVO	NEGATIVO

Locus	Código NMDP	Código G	Alelos incluidos
DR β 1	01:AETTD	01:01:01G	01:01:01/01:50/01:67
DR β 1	03:01	03:01:01G	03:01:01/01:03:01:01:02/03:01:08
DR β 1	04:HTWY	04:07:01G	04:07:01/04:92
DR β 1	15:01	15:01:01G	15:01:01:01/15:01:01:02/15:01:01:03/15:01:01:04/15:01:17
DR β 1	15:03:01	15:03:01G	15:03:01:01/15:03:01:02

En cuanto a las uniones entre péptidos y alelos de los donantes disponibles, los cuales fueron tipificados para el HLA DR β 1, se evidenció que en 5 proteínas no hubo péptidos de unión a algún alelo encontrado en los donantes, mientras que en 7 proteínas se observó unión con péptidos nativos y modificados, siendo más predominantes con estos últimos; finalmente, se contó con 3 proteínas en donde hubo unión por parte de las secuencias nativas y modificadas; por otra parte, la mayoría de las uniones *in silico* resultaron ser débiles (41 UD vs 9 UF).

Como se esperaba, nuevamente las uniones de los nativos fueron menores frente a las presentes en los modificados, siendo en las primeras 4, mientras hubo 14 para las modificadas. El análisis del percentil Rank revela varios péptidos con probabilidad de unión a varios alelos entre los que se encuentran: 37096, 40406, 40424 (15,8%), 40400 (21,1%), 40408, 40430, 40432, 36827

(10,5%), 40412 (21,1%), 40436 (42,1,8%) y 40450 (52,6%). Entre los alelos con mayores uniones se destacan el HLA DR β 1 07:01, HLA DR β 1 13:05 (5 uniones), HLA DR β 1 01:01, HLA DR β 1 01:03, HLA DR β 1 03:04, HLA DR β 1 08:02, HLA DR β 1 14:02 (4 uniones), HLA DR β 1 04:07, HLA DR β 1 07:11, HLA DR β 1 11:02 y HLA DR β 1 11:04 (3 uniones), los cuales figuran entre aquellos con mayor frecuencia en la población mundial. Por último, *in silico*, solo los alelos HLA DR β 1 13:03 y HLA DR β 1 16:02, no presentaron unión como se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Unión *in silico* de antígenos peptídicos a los alelos de los donantes incluidos en el estudio. Se representa con 1 presencia de la unión y 0 ausencia de la misma, UF uniones fuertes (Rank 0-2), UD uniones débiles (Rank 2,1-10)

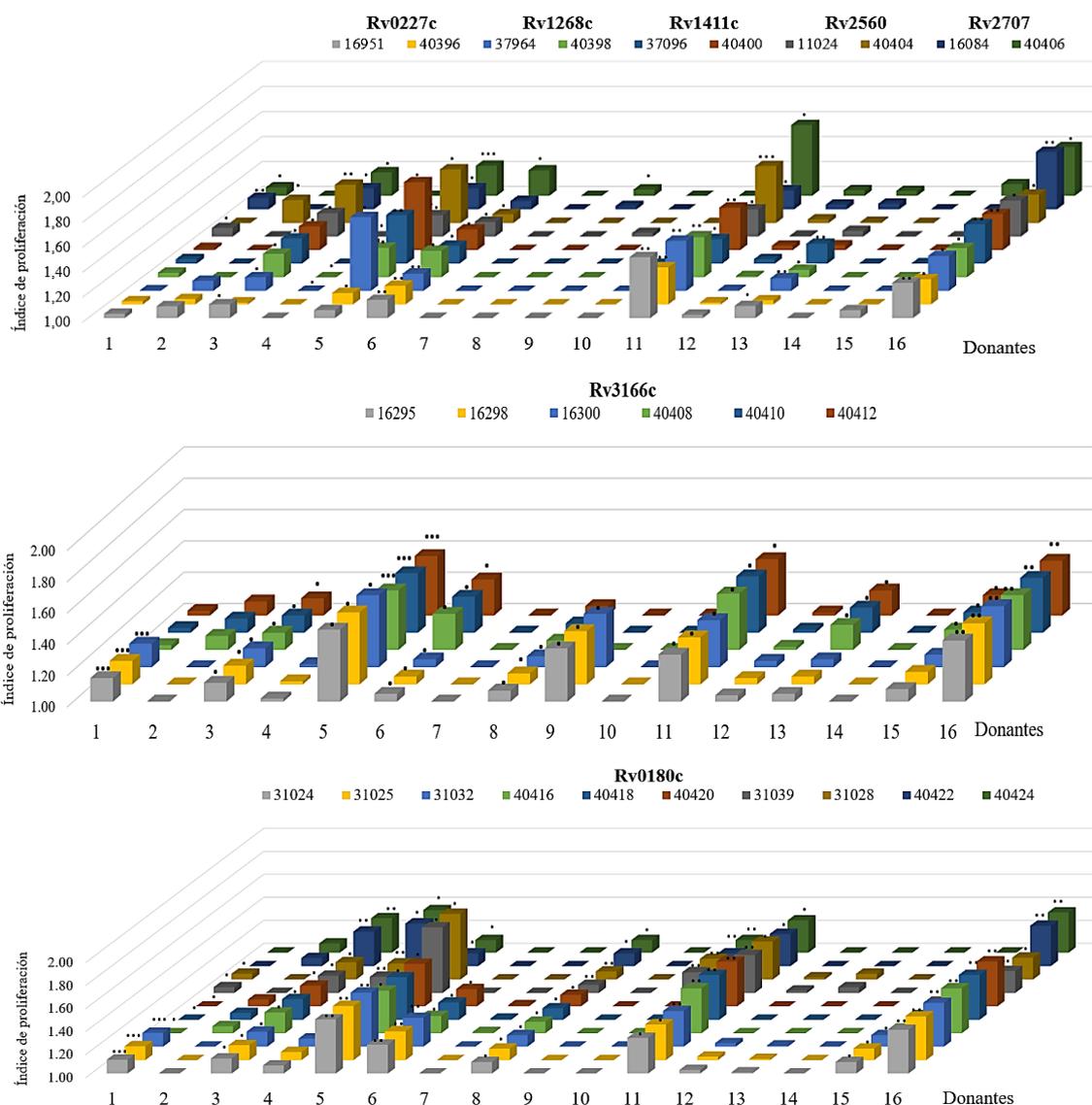
PROTEÍNA	PÉPTIDO	01:01		01:02		01:03		03:04		04:05		04:07		04:11		07:01		07:11		08:02		11:02		11:04		13:02		13:03		13:05		14:02		15:01		15:03		16:02		Uniones totales
		UF	UD																																					
Rv0227c	16951																																					0		
	40396																																						0	
Rv1268c	37964																																						0	
	40398																																						0	
Rv1411c	37096		1														1		1																			3		
	40400				1		1														1									1								4		
Rv2560	11024																																						0	
	40404																1																						1	
Rv2707	16084																																						0	
	40406						1										1		1																				3	
Rv3166c	16295																																						0	
	40408																										1													2
	16298																																						0	
	40410																																						0	
	16300																																						0	
	40412																					1		1	1						1								4	
Rv0180c	31024																1																						1	
	40416								1																														1	
	31025																																						0	
	40418																																						0	
	31032																																						0	
	40420																																						0	
	31039																																						0	
	40422																																						0	
	31028																																						0	
40424																																					1	1	3	

PROTEÍNA	PÉPTIDO	01:01		01:02		01:03		03:04		04:05		04:07		04:11		07:01		07:11		08:02		11:02		11:04		13:02		13:03		13:05		14:02		15:01		15:03		16:02		Uniones totales
		UF	UD																																					
Rv2270	37775																																					0		
	40428						1																															1		
	37777																																						0	
	40430						1															1																2		
	37780											1																											1	
	40432		1														1																						2	
Rv1911c	37765																																						0	
	40436		1				1					1			1		1		1								1		1									8		
	37767																																						0	
	40438																																						0	
Rv2004c	9111																																						0	
	40440																																						0	
Rv2301	30960																																						0	
	40442																																						0	
Rv1980c	36827																										1						1						2	
	40444																																		1				1	
Rv3494c	38373																																						0	
	40448						1																																1	
Rv0679c	30987																																						0	
	40450		1		1		1				1	1			1						1					1				1								10		
Rv0587c	39265																																						0	
	39266																																						0	

7.2.2. Linfoproliferación y evaluación de citoquinas Th1, Th2 y Th17

En reportes previos que involucraban ensayos de unión *in vitro* entre moléculas purificadas de HLA y péptidos, se evidenció que hay un margen de uniones *in vitro* las cuales no son predichas (129). En el presente proyecto, la aproximación *in silico* sólo predijo la unión para 18 de las 48 secuencias a evaluar, sin embargo, se planteó hacer la linfoproliferación con todos los péptidos seleccionados para cada donante, de modo que se presentase los resultados correspondientes a la linfoproliferación de las células estimuladas con los péptidos evaluados.

Mediante el software FCS Express 7, se analizaron los datos resultantes por citometría de flujo, que consistieron en obtener el Índice de Proliferación (IP), el cual indica la capacidad que tienen los linfocitos de la población total para proliferar, es decir, se calcula a partir de la población de inicio.



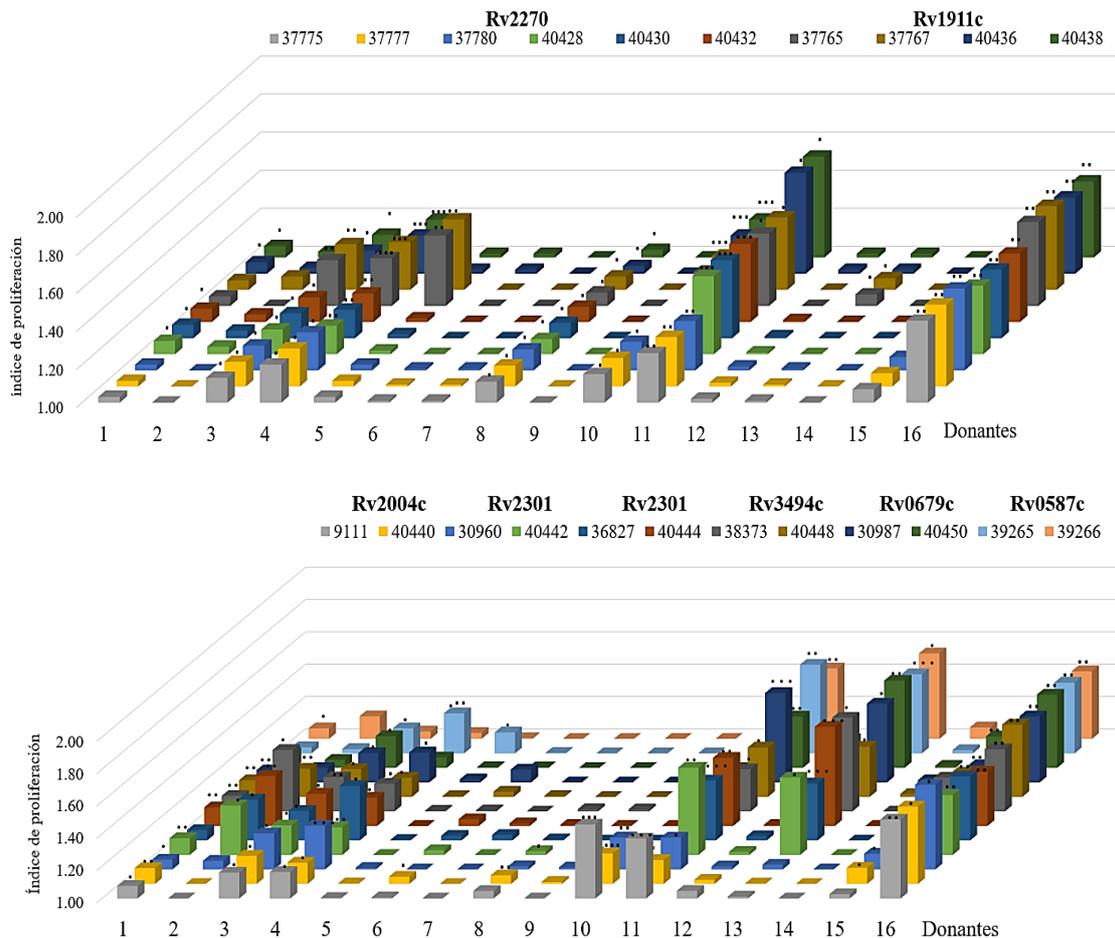


Figura 10. Índice de linfoproliferación en células tratadas con péptidos nativos (cHABPs) y modificados (mHABPs). Se representan los datos obtenidos de los 16 donantes incluidos en el estudio. Los PMBCs de cada individuo fueron tratados con péptidos nativos o modificados, después de 5 días de incubación, las células fueron procesadas. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y las comparaciones se realizaron usando la prueba *t-Student*, $p \leq 0,05$, $^{**} \leq 0,01$ y $^{***} \leq 0,001$.

En la Figura 10, se aprecia el resultado de las linfoproliferaciones realizadas con los PMBCs de los 16 donantes incluidos en el estudio. Se consideraron IP mayores a 1,10, dado que se encontraron diferencias estadísticamente significativas con valores de $P: 0,0414$. En todos los donantes, se esperaba respuesta con alguno de los péptidos, pero para 3 de los individuos que corresponden a los donantes D7, D12 y D14, no se observó linfoproliferación frente a los estímulos antigénicos, es decir, los IP no presentaron diferencias estadísticamente significativas con el control negativo de proliferación que correspondió a células sin estímulo antigénico ($P > 0,05$), mientras que sí hubo respuesta para el control positivo de proliferación (PHA), con IP: 2,25, $P: 0,0083$ (para D7); IP: 4,33, $P: 0,0006$ (para D12); e IP: 2,93, $P: 0,0006$ (para D14). La falta de respuesta no se adjudicó a sus alelos del HLA, pues se evidenció que estos estaban presentes en otros donantes en donde sí se observó proliferación, por otra parte, el resultado parece no estar relacionado con el estatus de contacto con la micobacteria, ya que hubo respuesta en las células de los participantes clasificados como positivos y negativos para las pruebas de PPD y QuantiFERON (Tabla 6).

Así, los resultados observados pueden deberse a factores intrínsecos a los individuos, como su estado inmunológico en el momento en que se emplearon sus células. Respecto a lo anterior, se encuentran reportes que señalan la disminución de la función en los componentes de la inmunidad innata y adaptativa con el aumento de la edad, lo que resulta en una disminución general de la inmunocompetencia, de modo que se puede evidenciar respuestas deficientes a la vacunación, también una activación débil de estas células (130,131); por tanto, si bien las células respondieron al PHA e hicieron expansión clonal, la estimulación de los péptidos pudo ser insuficiente dada la condición de las células de los donantes, indicando una hiporespuesta inmunológica, en donde el sistema inmune puede no reaccionar a un antígeno individual, contrario a como ocurre en la anergia generalizada (no específica), en la cual se evidencia la incapacidad de reaccionar a cualquier antígeno (132–134).

Se evaluaron 48 péptidos siendo 26 nativos y 24 modificados, los péptidos nativos representaron el 50,5% de las proliferaciones y los modificados indujeron el 49,4% en los donantes evaluados (excluyendo a los 3 individuos no respondedores), no habiendo diferencias significativas entre los grupos de péptidos. Respecto al número de linfoproliferaciones registradas entre secuencias nativas y modificadas, 48% fueron mayores en los péptidos originales, mientras que la expansión clonal inducida por los péptidos modificados fue de un 39% de las secuencias modificadas y en el 13% restante las secuencias modificadas no afectaron negativamente las proliferaciones observadas (Tabla 8).

En los experimentos de linfoproliferación se esperaba respuesta, principalmente en los péptidos nativos, ya que en principio, estos péptidos originales son los que están presentes en las proteínas de la superficie micobacteriana, siendo aquellos con los que idealmente habrían tenido contacto los donantes, es decir, con los cuales se debería haber realizado presentación antigénica, por lo cual ya habría en los donantes linfocitos activados con estos péptidos; no obstante, con los péptidos modificados no sólo se mantuvo el estímulo antigénico (13%) sino que mejoró en el 39% de los casos, lo cual muestra lo plausible de los cambios, que hicieron más inmunogénicos a los péptidos al ser modificados. Estos resultados también reflejan la capacidad de los péptidos modificados de inducir respuesta inmune *in vitro*, si bien, no en todos los casos. Como se observó anteriormente, sí se presentaron cambios favorables que influyeron en una unión más estable entre péptido-HLA y, en consecuencia, en el reconocimiento de las secuencias por los TCRs, haciendo que los linfocitos se activen y hagan expansión clonal.

Entre los péptidos nativos que tuvieron respuesta proliferativa en más del 50% de la población evaluada, se encuentran los péptidos 31024, 31025, 31032 (64,5%), 36827 (53,8%), 38373 (69,2%); mientras que, en los modificados se destacan las secuencias correspondientes a 40408 40410, 40412 40422 40424 con 53,8 %, 40440 (53,8%), 40442, 40444, 40448 (61,5%), superando las expectativas en relación con lo observado *in silico* (Tabla 7 y Tabla 8). El 37,5% de los péptidos presentaron unión *in silico* a algún alelo del HLA, lo que dejó por fuera al 62,5% de los péptidos evaluados, no obstante, estos indujeron linfoproliferación *in vitro*. En relación con las secuencias que se unen *in silico* a algún HLA, las linfoproliferaciones observadas en los diferentes donantes podría indicar la unión a complejos adicionales *in vitro*.

Entre los péptidos descritos en el presente trabajo producto del primer objetivo, se encuentran 39265 y 39266, en los cuales no se observó unión *in silico* (Tabla 7), sin embargo, el primero indujo linfoproliferaciones en el 53,8 % y el segundo en el 38,5% de la población evaluada. Respecto a la falta de uniones *in silico* de estos y otros péptidos, en donde se evidenció inducción

de linfoproliferación, puede deberse a que en la base de datos del servidor NetMHCIIpan, no están presentes todos los alelos de CMH-II descritos (135). Por otro lado, también se conoce de antígenos peptídicos (22-29 Mer), resistentes a la inactivación por calor y a proteasas que no están restringidos al CMH y se unen directamente a las moléculas, de esta forma, se presentan a los LT estimulándolos sin procesamiento previo, lo cual conduce a la producción de citocinas como TNF e IL-2; esto se debe a la capacidad de los antígenos para entrecruzar el CMH de clase II y el TCR, específicamente la región variable de la cadena β , formando un complejo trimolecular que activa al LT, pero la carga del péptido al CMH se hace de manera extracelular (136–138).

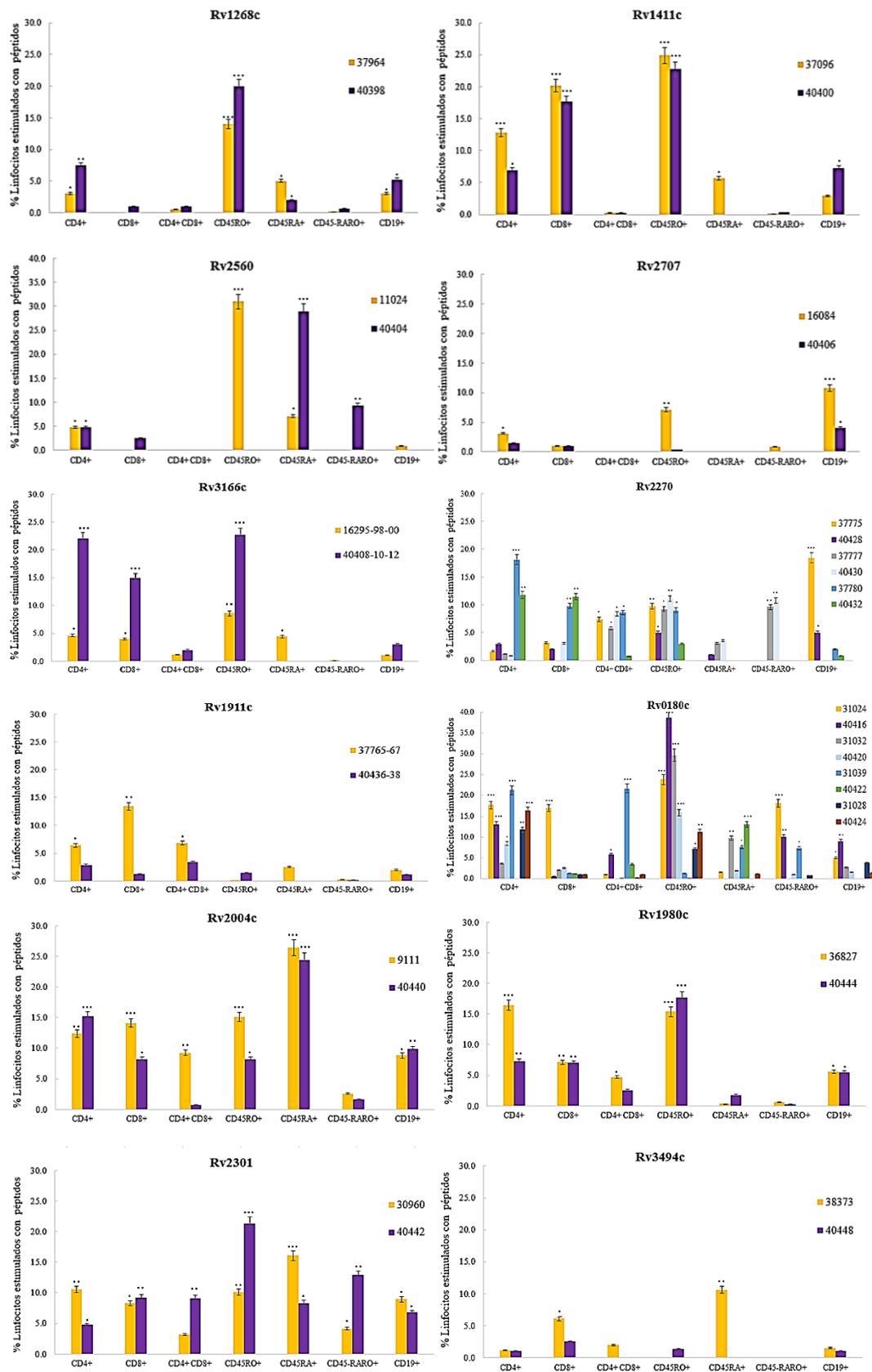
Tabla 8. Resumen resultados de linfoproliferaciones inducidas por péptidos nativos y modificados. Los datos consignados en la tabla representan el porcentaje de proliferaciones presentadas en células provenientes de los donantes incluidos en el estudio por cada péptido. Se encuentran resaltados los péptidos con respuesta linfoproliferativa en más del 50% de la población evaluada.

Péptidos nativos	% de Linfoproliferaciones positivas en la población evaluada por cada antígeno	Péptidos modificados	% de Linfoproliferaciones positivas en la población evaluada por cada antígeno
16951	30,8	40396	23,1
37964	46,2	40398	38,5
37096	46,2	40400	38,5
11024	38,5	40404	38,5
16084	30,8	40406	38,5
16295	46,2	40408	53,8
16298	46,2	40410	53,8
16300	46,2	40412	53,8
31024	61,5	40416	46,2
31025	61,5	40418	46,2
31032	61,5	40420	46,2
31039	46,2	40422	53,8
31028	46,2	40424	53,8
37775	46,2	40428	38,5
37777	46,2	40430	38,5
37780	46,2	40432	38,5
37765	46,2	40436	46,2
37767	46,2	40438	46,2
9111	38,5	40440	53,8
30960	46,2	40442	61,5
36827	53,8	40444	61,5
38373	69,2	40448	61,5
30987	46,2	40450	38,5
39265	53,8		
39266	38,5		

Después de evaluar las proliferaciones inducidas por los péptidos nativos y modificados mediante el IP, se caracterizaron las poblaciones celulares involucradas como LT CD4+, citotóxicos CD8+, marcadores de memoria y también LB (Figura 11). A la vez, se evaluó en los sobrenadantes de estas células las citoquinas que pudiesen enmarcar perfiles de linfocitos Th1, Th2 y Th17 (Figura 12). A partir de los linfocitos CD3+, se analizaron las poblaciones de CD4+; en general, estas células fueron mayores en los tratamientos con los péptidos versus los controles. Entre péptidos nativos y modificados, los primeros dominaron en los LT CD4+, pero no fue significativa la diferencia con los modificados, destacándose su capacidad de inducir una respuesta proliferativa.

El análisis por citometría mostró que linfocitos produjeron citoquinas que corresponden al perfil Th1 tales como IL-2, lo cual es interesante dado el papel que se ha descrito para esta interleucina, pues se sabe que está involucrada en el control de la diferenciación y la homeostasis de las células T proinflamatorias y antiinflamatorias, siendo así fundamental para determinar la regulación molecular de la respuesta inflamatoria (139). Adicionalmente, respecto a esta citoquina, se ha encontrado que podría mejorar la supervivencia de los LT, revertir la anergia de estas células en pacientes con tuberculosis pulmonar, lo que les permite producir citoquinas como IFN- γ , además de mantener el número y la función de estas células (140). De esta manera, la presencia de IL-2 en los sobrenadantes de cultivo muestra la capacidad que podrían tener los péptidos para inducir inmunidad protectora frente al patógeno.

Dentro de las citoquinas que representan este perfil, también se encontraron cantidades significativas IFN- γ , tanto en péptidos nativos como modificados. Esta citoquina es fundamental para la activación de macrófagos mediando inmunidad antibacterial y antiviral, mejora la presentación antigénica, coopera en la activación del sistema inmune innato dado que estimula células NKs y neutrófilos; se ha descrito que induce la señalización autocrina de IL-15 para promover la autofagia y la maduración fagosomal en macrófagos humanos infectados con *Mtb*, promoviendo la muerte de la misma. Además, activa células mieloides infectadas para inhibir la replicación bacteriana, en tanto que regula la interacción de los linfocitos con el endotelio, involucrándose en la extravasación de los linfocitos a los sitios de la infección para que contribuyan en la defensa frente al patógeno, regulando a su vez el balance entre las respuestas Th1y Th2 (140–142). Entre otras funciones, el IFN- γ así como otros estímulos inflamatorios, incrementan la producción de ON al estimular a la enzima encargada de su producción, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), sustancia que media la eliminación intracelular de bacterias como el patógeno en estudio (143–145). Frente al papel que tiene el IFN- γ en la prevención del desarrollo de la patología tuberculosa, el hecho de que los péptidos evaluados induzcan su producción, es favorable para la escogencia de antígenos peptídicos que formen parte de una posible vacuna antituberculosa.



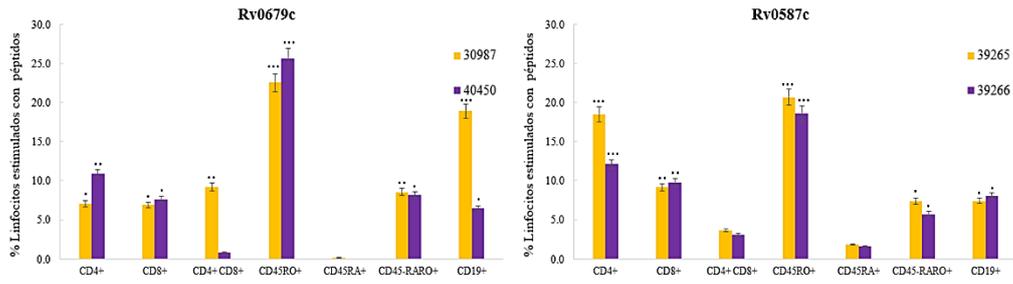
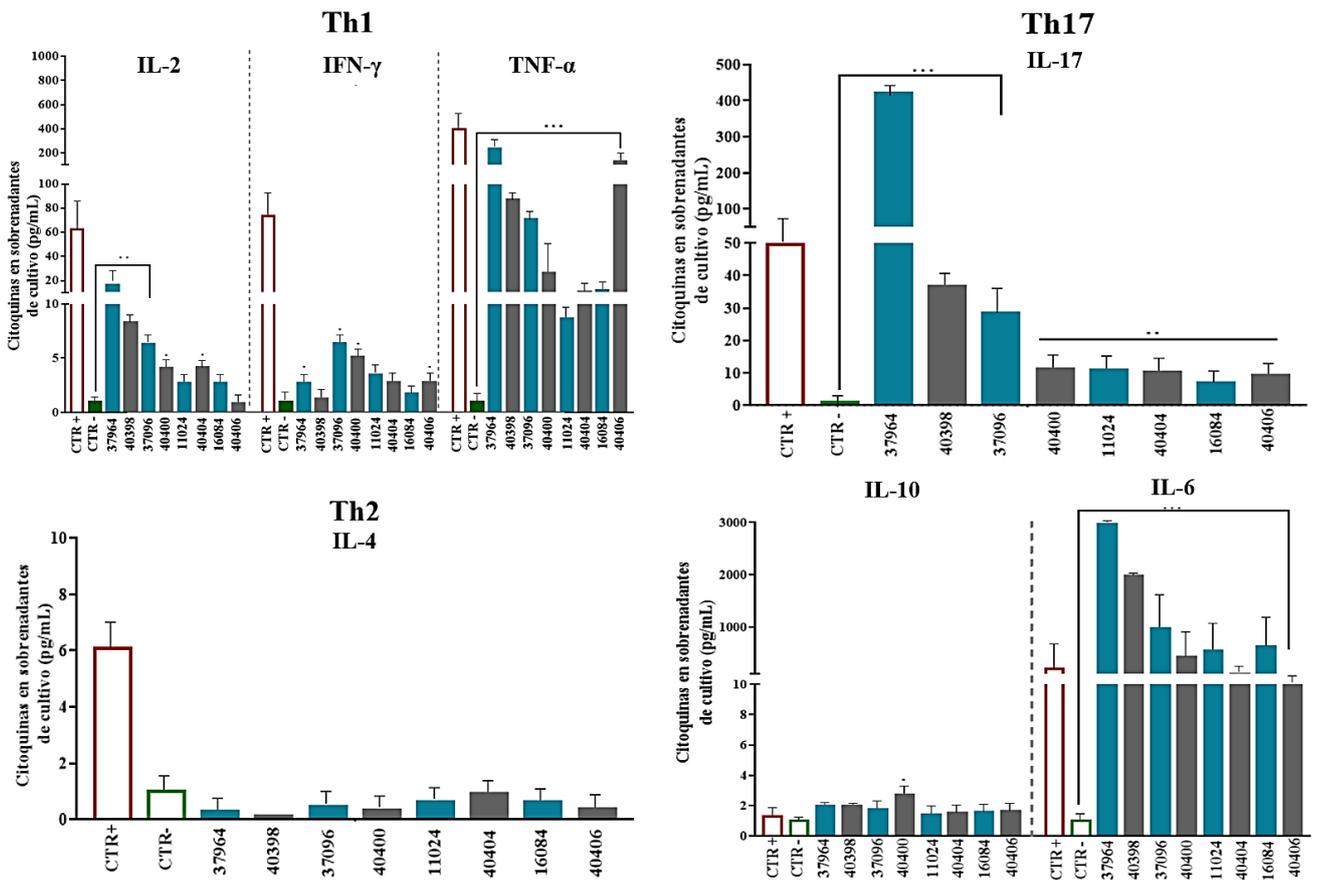
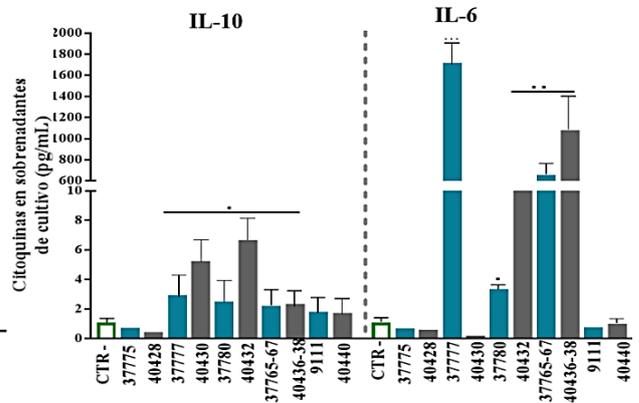
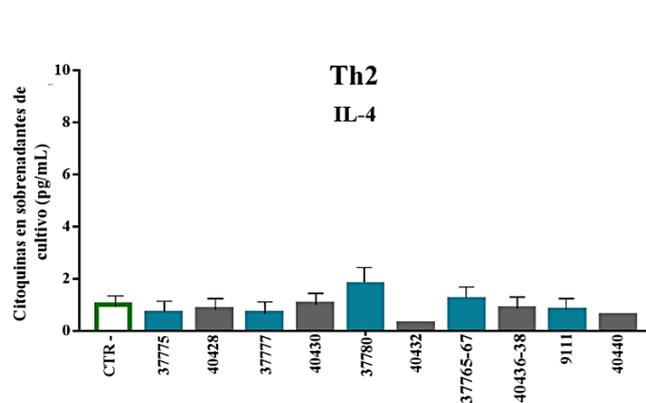
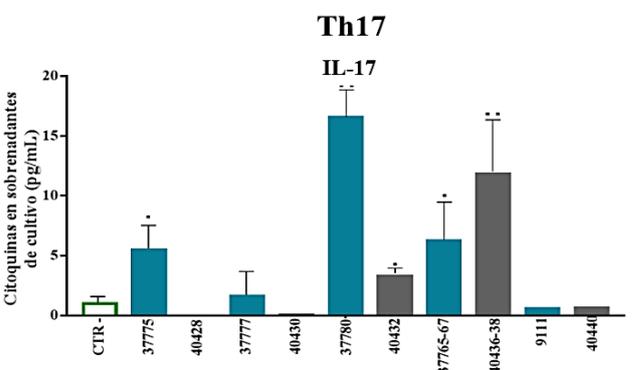
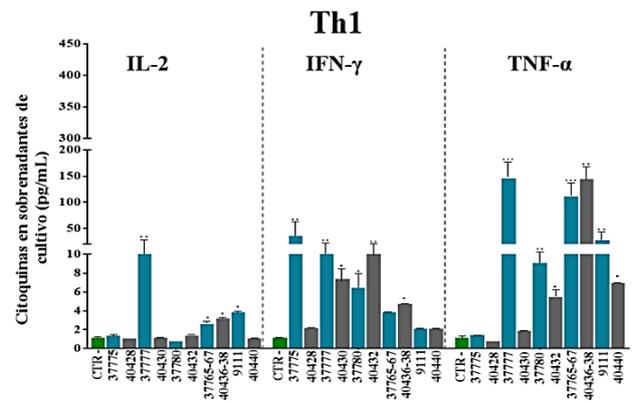
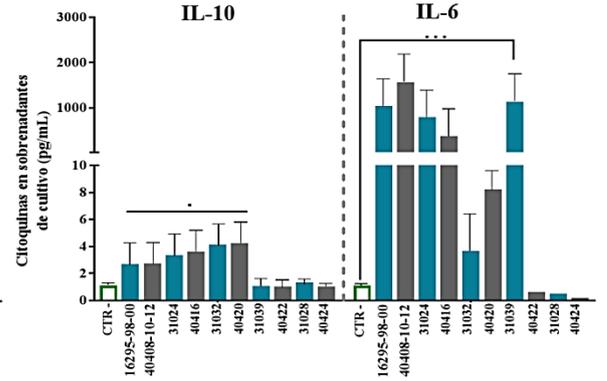
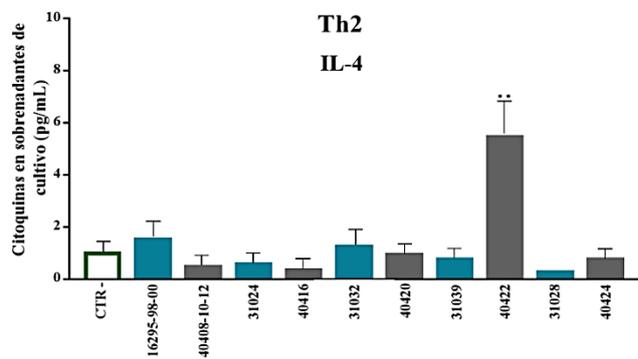
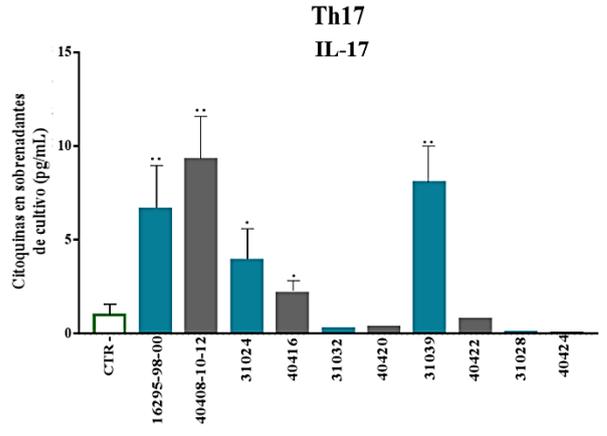
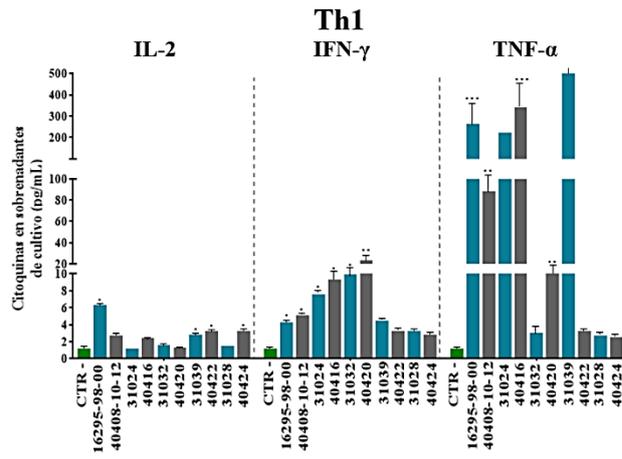


Figura 11. Caracterización fenotípica de las poblaciones de linfocitos humanos que proliferaron en respuesta a la estimulación *in vitro* con péptidos nativos y modificados. Los porcentajes representados en la figura corresponden a datos normalizados con el control de células sin estímulos antígenicos. Los análisis estadísticos para establecer las diferencias entre el control y cada tratamiento se realizaron con la prueba *t-Student*, $p < 0,05$, $^{**} < 0,01$ y $^{***} < 0,001$.





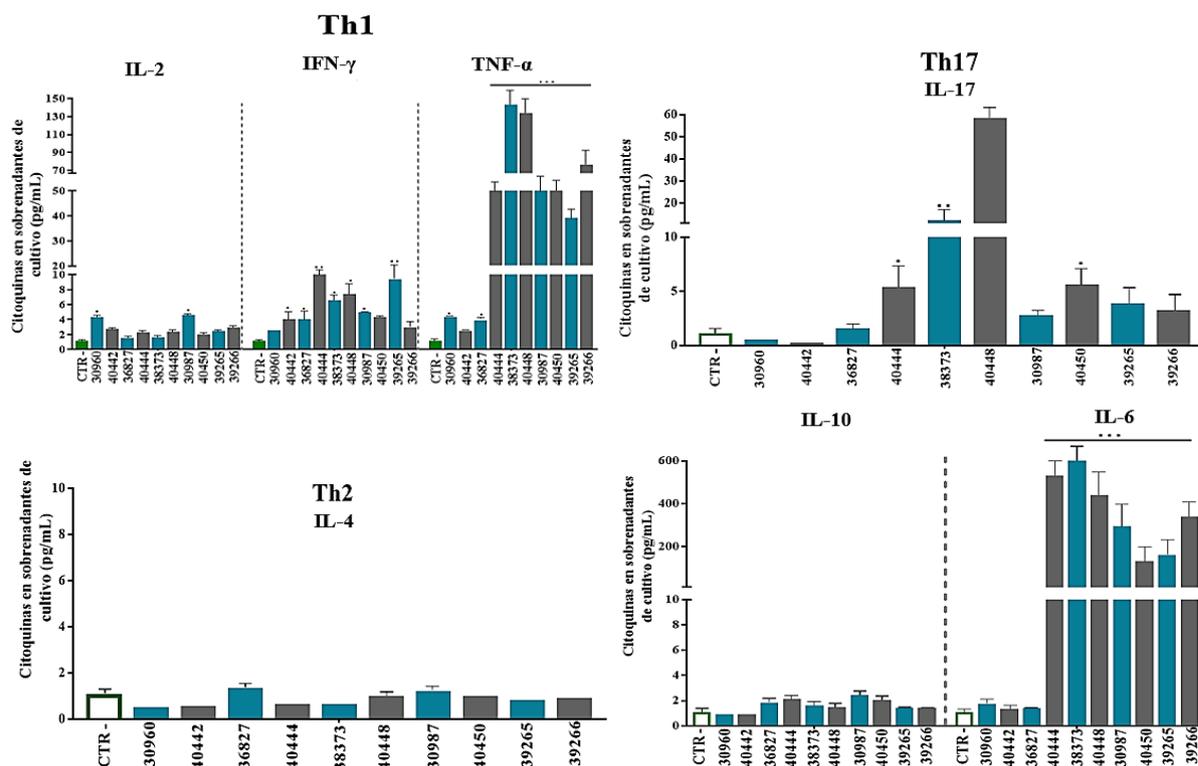


Figura 12. Citoquinas producidas por linfocitos humanos en respuesta a la estimulación *in vitro* con péptidos nativos y modificados. Los porcentajes de las poblaciones analizadas están normalizados sobre el control de células sin estímulos antigénicos. Las diferencias estadísticamente significativas, entre el control y cada tratamiento se determinaron con la prueba *t-Student*, $p \leq 0,05$, $\leq 0,01$ y $\leq 0,001$.

Por último, en este perfil se describe al TNF- α , el cual se encontró en mayor proporción con respecto a las otras dos citoquinas. Éste es un regulador de respuestas inflamatorias, desencadena diversas moléculas inflamatorias incluidas otras citocinas y quimiocinas, tiene efecto en las células endoteliales, lo cual promueve la inflamación con el reclutamiento de células al sitio de la infección, además activa neutrófilos, impulsa la síntesis de proteínas de la fase aguda de la inflamación, la proliferación celular, la supervivencia celular o la apoptosis (según sea el caso) y la regeneración del tejido (146–148). En TB esta citoquina es indispensable para el control de la enfermedad, esto se ha evidenciado en personas que sufren trastornos autoinmunes, para lo cual se administra anti-TNF- α , lo cual resulta en una susceptibilidad a infecciones micobacterianas por *Mtb* y micobacterias no tuberculosas (NTM), además de otras infecciones bacterianas, virales y fúngicas; adicionalmente, la susceptibilidad a infecciones por la deficiencia de esta citoquina se ha evaluado en ensayos realizados en modelo murino y primates no humanos (149–152). Considerando el papel que desempeña esta citoquina en la respuesta inmune frente a TB, tener antígenos peptídicos con capacidad de inducirla sería muy importante en un contexto de vacunación.

También se evaluó la IL-4 característica del perfil Th2, los niveles fueron bajos en general, menores a 2 pg/mL, lo cual es interesante, ya que se ha encontrado que esta citoquina puede perturbar la contención de la micobacteria en macrófagos humanos, probablemente estimulando el aumento los linfocitos Treg y la disminución de células con el perfil Th1, fundamentales para la defensa frente al patógeno (153). Por otra parte, esta citoquina también se ha visto involucrada

con linfocitos T Foliculares, que pertenecen al mismo linaje, pero que están más relacionados con ayudar a los LB a convertirse en células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad hacia el antígeno (76,77,154).

Para el perfil Th17, se evaluó la producción de la citoquina IL-17, presente en la mayoría de los péptidos evaluados tanto nativos como modificados (Fig. 12). Esta citoquina está relacionada con el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección para destruir bacterias y hongos, se sabe que IL-17 estimula la producción de quimiocinas en células endoteliales y macrófagos, así como la producción de otras citocinas como el TNF- α , también aumenta la producción de Factor estimulante de colonia de granulocitos, además, induce sustancias antimicrobianas como las defensinas en numerosos tipos celulares (155,156). En experimentos con ratones depletados para células Th17 e IFN- γ , tras transferencia de células Th17, se observó reducción de la carga micobacteriana, efecto que se debió a un mayor infiltrado inflamatorio caracterizado por un exceso de neutrófilos, de manera que los autores concluyen que los LT Th17 pueden brindar protección independiente de IFN- γ contra *Mtb*, contribuyendo al control temprano de la infección por el patógeno (157).

El análisis de citoquinas permitió evidenciar, que la mayoría de los péptidos, tanto nativos como modificados indujeron la producción de IL-6 en altas cantidades (Fig. 12), la cual se ha asociado fuertemente con inflamación, aunque según el contexto también puede actuar como antiinflamatoria (158), mientras que se produjeron bajos niveles de IL-10 (Fig. 12), la función dominante de la IL-10 es desactivar macrófagos, lo que da como resultado una menor producción de citoquinas Th1, una menor producción de especies reactivas de nitrógeno u oxígeno y una presentación limitada de antígenos que puede tener efectos no positivos sobre la inmunidad innata y adquirida *in vivo* cuando se está enfrentando a un patógeno como *Mtb* (159).

La IL-6 se ha relacionado con la supervivencia, diferenciación y producción de citoquinas en los LT, también se ha demostrado que inhibe la apoptosis de los LT vírgenes, regula el equilibrio Th17/ Treg, por otra parte, la IL-6, junto con TGF- β , promueve la diferenciación a Th17, mientras que TGF- β solo promueve la diferenciación a Treg, al tiempo que se ha descrito que en los LT foliculares, la IL-6 puede inducir la producción de IL-21, que a su vez provoca la diferenciación de LB en células plasmáticas (160–165). En TB, se han realizado ensayos con ratones a los cuales se les ha depletado el gen para la IL-6, a los cuales se les ha inoculado *Mtb* y en ellos se observó susceptibilidad a la infección, adicionalmente estos ratones presentaron disminución en el IFN- γ y un aumento de IL-4 en comparación con los controles (166). En estudios con pacientes, los niveles de IL-6 en los sueros estaban elevados en comparación con los donantes sanos, indicando un posible rol de esta citoquina en la defensa frente al patógeno (167). De acuerdo con las citoquinas resultantes de los sobrenadantes de cultivo, es posible que los péptidos induzcan la producción de IL-6 que pueda mediar respuestas proinflamatorias en contra de la micobacteria y con ello controlar el desarrollo de la enfermedad.

En un escenario de TB se ha evidenciado que la IL-10 induce la aparición tardía de LT efectores en los pulmones después de la infección por aerosol, de manera que esta citoquina antagoniza el

control de la infección por *Mtb* a través de mecanismos asociados con respuestas reducidas de LT CD4+; la migración tardía de las células se debe a una baja expresión de CXCR3 que afecta su capacidad migratoria parenquimatosa y su capacidad para interactuar con las células fagocíticas infectadas, lo que impide el control de la infección (168). Además, esta citoquina se ha relacionado con la capacidad de *Mtb* para evadir respuestas inmunitarias y mediar en infecciones a largo plazo en el pulmón, se ha implicado en la reactivación de la TB en humanos y con la enfermedad de TB en ratones; en este modelo, se ha visto que bloqueando la IL-10 durante la infección crónica, se estabilizó la carga bacteriana pulmonar y mejoró la supervivencia de los animales infectados, relacionándose este resultado con el reclutamiento de LT en los pulmones y una mayor producción de IFN- γ en LT (159).

En la figura 11, donde se caracterizaron las poblaciones celulares producto de la expansión clonal inducida por los péptidos nativos y modificados, se evidenciaron LT CD8+, aunque en una menor proporción con respecto a los LT CD4+ y no para todos los péptidos. Vale la pena resaltar que, si bien el tamaño idóneo de aminoácidos que debe tener un péptido para ser presentado en contexto del CMH clase I es de 8 a 10 aminoácidos, para luego activar eficientemente los LT CD8+, nuestros péptidos evaluados son de mayor longitud. Esto puede explicarse dado que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, se puede facilitar que los péptidos sean procesados a unos más cortos para ajustarse en el CMH-I. (169-171).

El hallazgo de la proliferación de LT CD8+ es interesante, dado que estos linfocitos citotóxicos son importantes efectores en la inmunidad protectora frente a *Mtb*, ya que se producen células de memoria y efectoras capaces de inducir la lisis de macrófagos infectados, además de contribuir a su activación por medio del IFN- γ para que eliminen la micobacteria (62). En la misma figura, se puede apreciar LT CD3+ doblemente marcados como CD4+CD8+, de los cuales se conoce que están presentes en la sangre, además de otros sitios anatómicos donde ejercen diferentes funciones frente a una variedad de infecciones. Estas células desempeñan funciones citolíticas y supresoras, pueden proliferar y matar células diana a través de granzima B y perforina, al tiempo que producen TNF- α , IL-4, IL-2, IL-10, IL-17 e IFN- γ tras la estimulación de CD3 (172,173). En TB, se han caracterizado estas poblaciones doblemente positivas en primates no humanos durante la infección con *Mtb*, usando muestras de PBMCs, lavado broncoalveolar (BAL) y en granulomas pulmonares, encontrando que las LT CD4+CD8+ aumentan en frecuencia durante una fase temprana de la infección con *Mtb* en PBMCs, y en el caso de los BAL antes de la infección, en tanto que en los granulomas evaluados, los LT CD4+CD8+ presentan mayor producción de citoquinas que los linfocitos T CD4+ o CD8+, así, los autores del estudio, concluyen que estos linfocitos recorren el torrente sanguíneo y las vías respiratorias de manera temprana durante la infección, con el propósito de llegar a los granulomas para hacer parte de la respuesta inmune contra a *Mtb* (173).

En los linfocitos T analizados después de la estimulación antigénica se observó población CD45RO+, es decir una población de memoria frente a la mayoría de los péptidos y también se evidenció un fenotipo CD45RA+RO+, que indica una transición de células vírgenes a memoria (Figura 11). En principio, tras la eliminación de un patógeno o un antígeno, los LT efectores se

reducen tras la muerte de la mayoría de estas células efectoras, dando paso al desarrollo de células efectoras precursoras de memoria, que posteriormente se diferencian en LT de memoria, lo cual es muy importante para combatir microorganismos en el sitio de la infección, dado que estas células pueden tener respuestas proliferativas muy rápidas generando muchos linfocitos efectores productores de IFN- γ o convertirse rápidamente en citotóxicos (174–177). Considerando el tiempo y las condiciones de cultivo en que se hicieron las linfoproliferaciones, es más probable que en vez de generarse memoria, se estimulara a las células con afinidad por estos antígenos que ya habían generada memoria por previo contacto con péptidos parecidos a los aquí evaluados, dado que se sabe que las proteínas en la envoltura de *Mtb*, de donde se derivan los péptidos evaluados, no sólo se encuentran en este patógeno sino en otras micobacterias; no obstante, la capacidad que tuvieron los péptidos de estimular a las células podría indicar el potencial de los péptidos en un escenario de vacunación, al poder inducir memoria y permitir la producción de linfocitos efectores que puedan enfrentar al patógeno.

Por último, dentro de las células analizadas se encontraron LB en la mayoría de los péptidos analizados, siendo este hallazgo relevante porque ahora se sabe que estas células tienen un gran valor en la participación de la respuesta inmune frente a TB, a través de la producción de citoquinas, la presentación antigénica y su característica principal: la producción de Acs (que será abordada más adelante en el presente trabajo) (35,36,178).

7.3. Determinación de la función efectora de linfocitos estimulados por péptidos candidatos en macrófagos infectados por *Mtb*

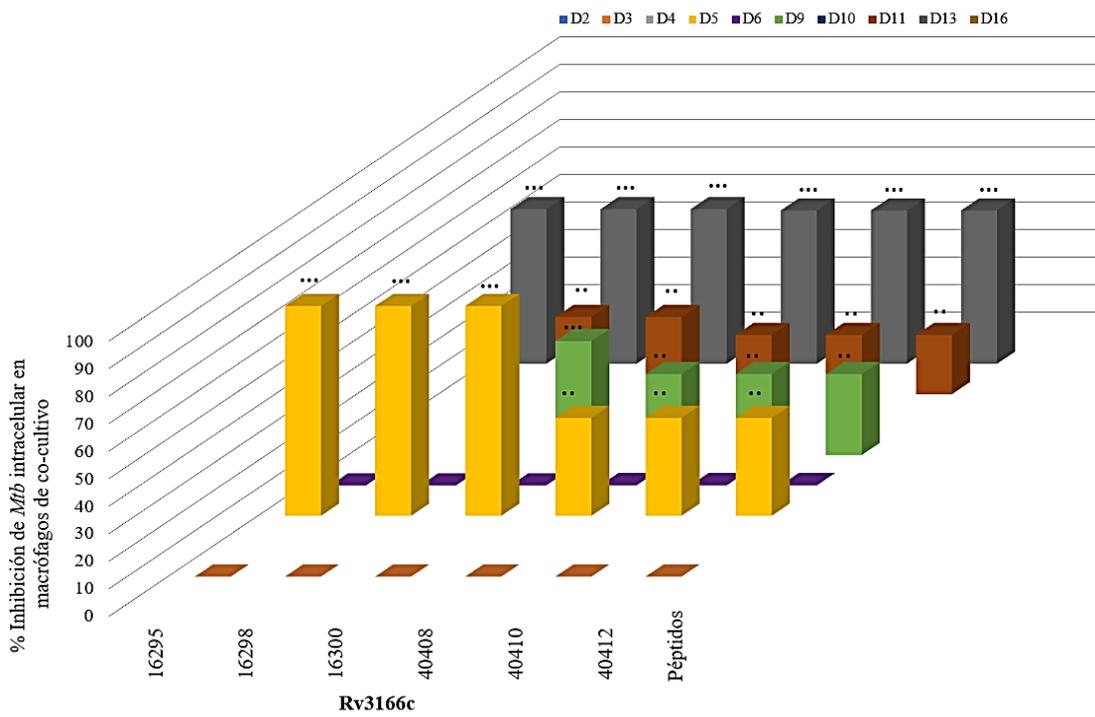
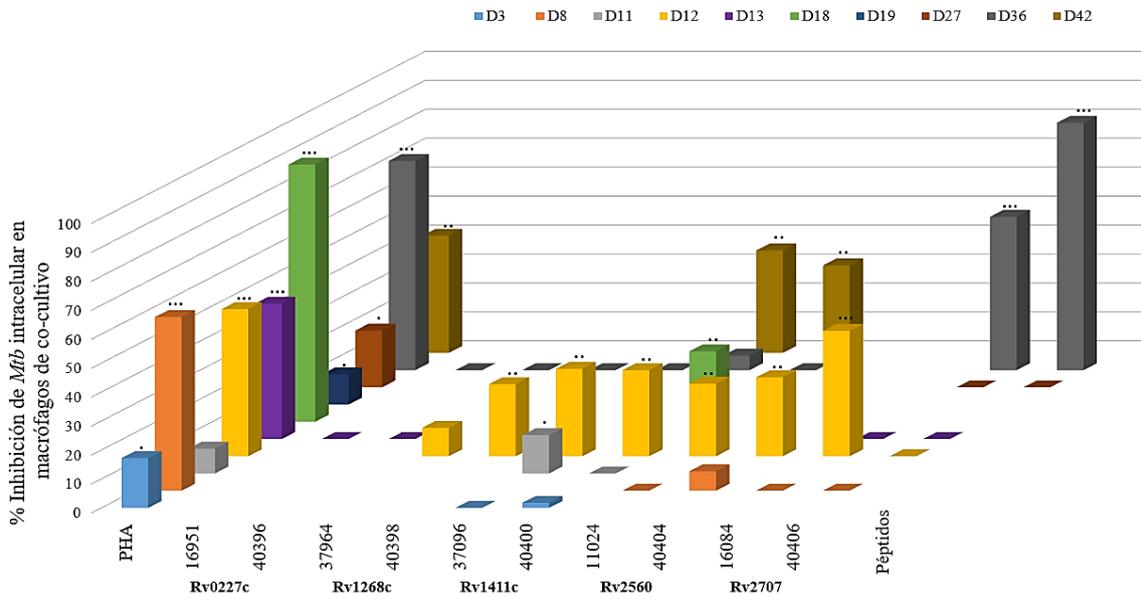
Considerando que los linfocitos y especialmente los T son los principales coordinadores de la respuesta inmune frente a *Mtb*, y teniendo en cuenta que los péptidos evaluados en el presente proyecto son capaces de inducir la proliferación de estas poblaciones celulares, junto a la producción de citoquinas relacionadas con una respuesta inmune de protección; se procedió a establecer la función efectora de estos linfocitos estimulados en macrófagos humanos infectados por la micobacteria.

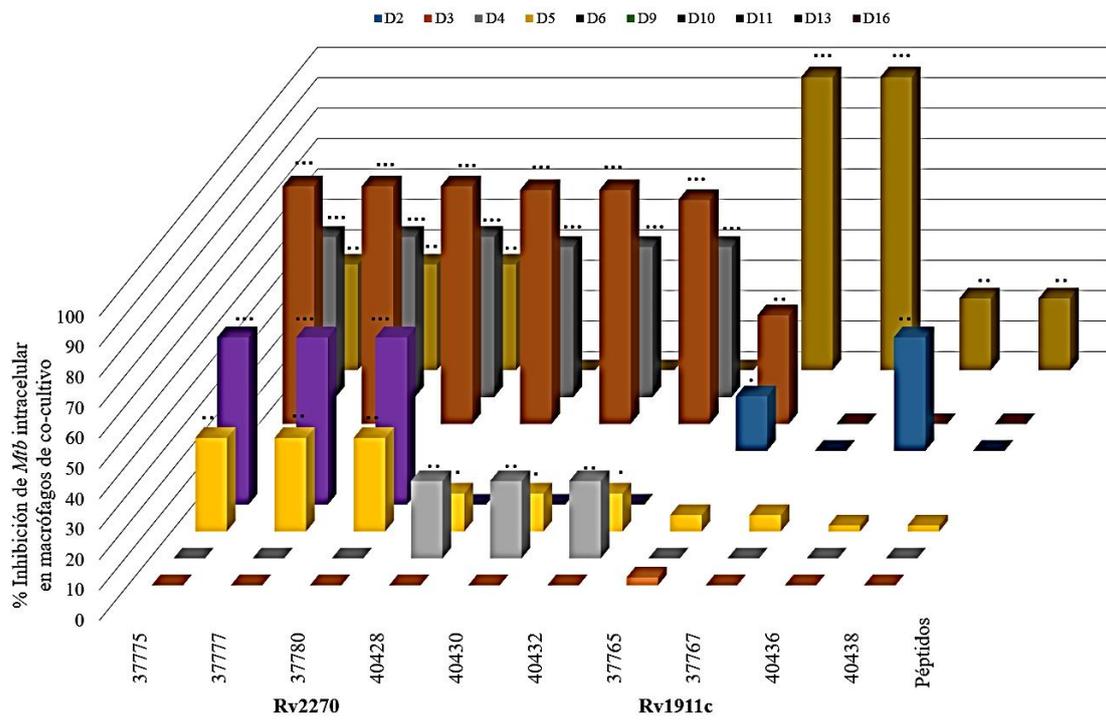
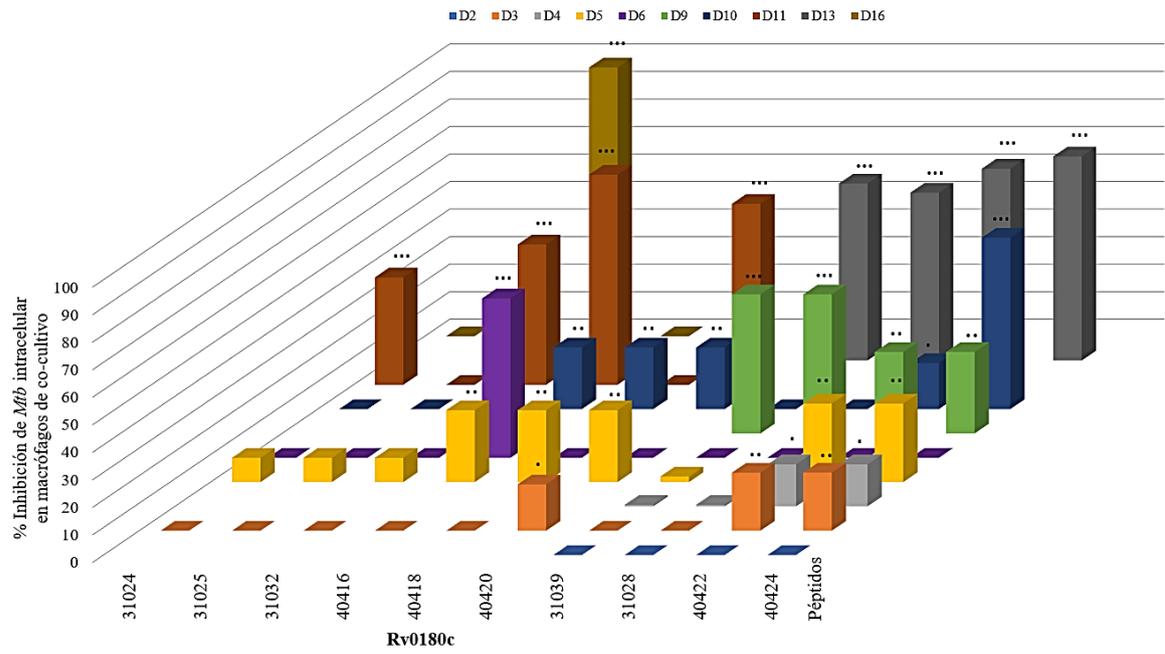
7.3.1. Co-cultivos de linfocitos estimulados por péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv y macrófagos infectados con el patógeno

Los ensayos de co-cultivo se realizaron con muestras provenientes de 10 donantes, los otros 6 individuos reclutados (D1, D7, D8, D12, D14 y D15) no fueron incluidos dado que, 3 no respondieron en las linfoproliferaciones y las otras 3 personas no continuaron en el estudio.

Para escoger los péptidos evaluados en el ensayo de co-cultivo, se consideraron como candidatos a aquellos que indujeron expansión clonal de los linfocitos, en conjunto con su respectivo péptido nativo o modificado. También se tuvo en cuenta los que presentaron unión *in silico*, pero no proliferaron, teniendo en mente que quizás las condiciones del medio no favorecieron la linfoproliferación cuando se evaluó en los ensayos iniciales, pero que tal vez pudiera darse una estimulación en los linfocitos y esto tendría efecto en macrófagos infectados. Adicionalmente se usaron péptidos control, que no se unieron *in silico* ni produjeron proliferación significativa, según el perfil de cada donante (Tabla 6, Tabla 7, Figura 10). Los péptidos que se evaluaron por persona, dependieron de la cantidad de células obtenidas de las muestras de sangre provenientes

de cada donante, siguiendo los lineamientos referentes a la protección y regulación ética de la investigación en seres humanos consignada en la declaración de Helsinki del 1964.





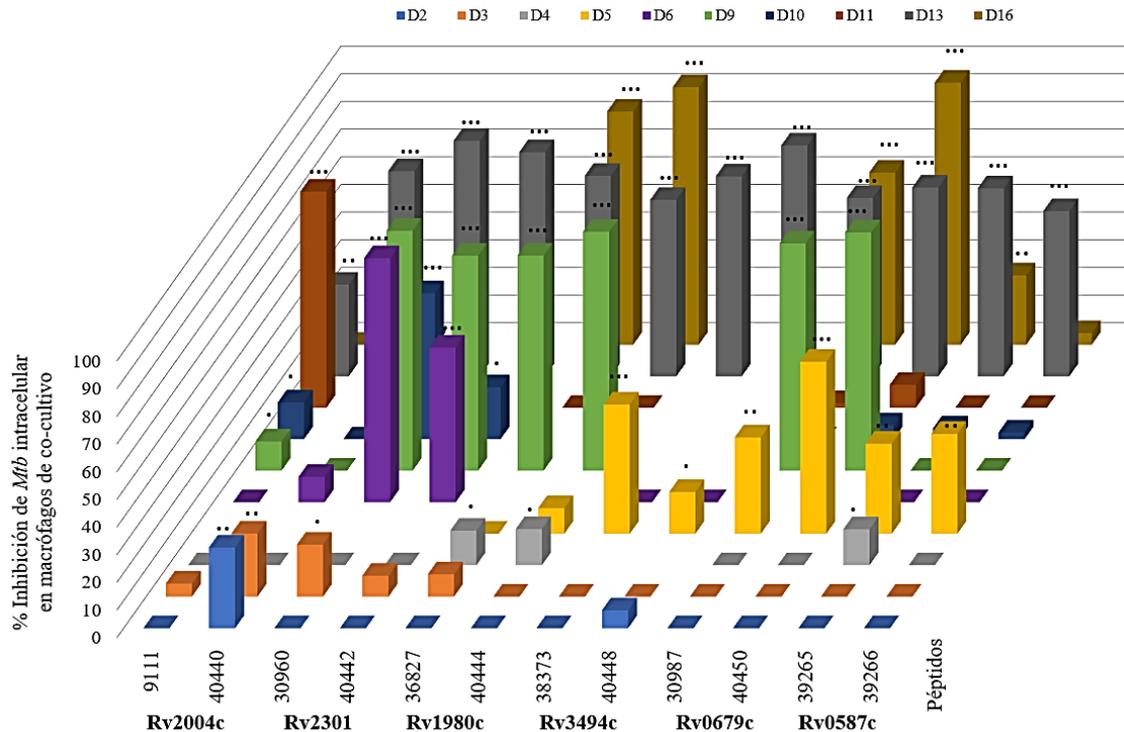


Figura 13. Ensayo de inhibición intracelular de *Mtb* en macrófagos humanos, co-cultivados con linfocitos producto de linfoproliferación de células tratadas con cHABPs y mHABPs. La actividad de inhibición se evaluó por triplicado al tercer día del co-cultivo, la micobacteria intracelular se detectó por citometría de flujo. Como control de inhibición de linfocitos estimulados se tomó el tratamiento con PHA. Las letras D seguidas de un número representan los donantes, a continuación, se enuncian los péptidos escogidos como control negativo en cada donante para lo cual se consideró que no se unieran *in silico* ni indujeran proliferación significativa: D2, 9111; D3, 39266; D4, 16084; D5, 36827; D6, 9111; D9, 40440; D10, 30987; D11, 40440; D13, 40396 y D16, 39266. Se realizó *Kruskal Wallis*, para determinar diferencias entre controles y tratamientos, $p \leq 0,05$, $^{**} \leq 0,01$ y $^{***} \leq 0,001$.

Los linfocitos se estimularon con los péptidos de las 15 proteínas evaluadas y posteriormente se cultivaron con macrófagos autólogos previamente infectados con *Mtb*, evidenciándose que en los únicos casos donde no se observó inhibición, fue donde se estimuló con péptidos de la proteína Rv0227c (Fig. 13). En estos péptidos los IPs fueron muy bajos en comparación con las otras secuencias (Fig. 10) por lo cual, no se caracterizaron sus poblaciones; no obstante, se incluyeron en los ensayos de co-cultivo para descartar que los linfocitos tuvieran algún efecto que se pudiera evidenciar en los macrófagos. En cuanto a los demás tratamientos, se registró inhibición ya sea con el péptido nativo o modificado, la cual se consideró estadísticamente significativa en 10%, cuando se comparó con el control de células infectadas sin tratamiento (Fig. 13). Entre las proteínas donde se observaron péptidos que indujeron inhibición en más de un donante se encuentran, Rv1911c, Rv3494c, Rv1411c, Rv2207, Rv3166c, Rv0180c, Rv2270, Rv2004c, Rv2301, Rv1980c y Rv0679c, mencionadas en orden ascendente de inhibición. Por otra parte, se apreciaron mayores porcentajes de inhibición inducida por linfocitos estimulados por péptidos modificados, en las proteínas Rv1268c, Rv2560, Rv0180c, Rv1980c y Rv0679c, alcanzado un 94,7%, mientras que el porcentaje fue mayor para las secuencias de péptidos nativos de las proteínas Rv2707, Rv3166c, Rv2270, Rv1911c, Rv2004c, Rv2301 y Rv3494c, dentro de las cuales se registraron porcentajes de hasta 96,3%. Los péptidos de la proteína Rv0587c, 39265 y

39266 resultaron inducir inhibición intracelular del microorganismo en varios de los donantes, encontrándose el mayor porcentaje en 67,9% para el péptido 39265 y 59,7% para el péptido 39266.

Estos resultados de inhibición son muy importantes para el presente estudio, dado que permiten establecer que los péptidos ya sea nativos o modificados contribuyen en la eliminación de la micobacteria intracelular; lo cual plantea un escenario favorable en disminuir la proliferación bacteriana y con esto prevenir el desarrollo o las formas más graves de la enfermedad, dado que los macrófagos juegan un papel crucial en la patología, siendo lugar de la infección primaria, inductores y efectores de la inflamación mediada por la inmunidad innata y adaptativa, y con capacidad de intervenir en la destrucción y reparación de tejidos (179).

Este tipo de ensayos *in vitro*, son relevantes pues brindan un escenario en donde se puede visualizar el posible efecto de la estimulación de un antígeno en las células involucradas en la defensa frente a este patógeno. Considerando que el uso de un ensayo *in vitro* en lugar de uno *in vivo* con reto frente a *Mtb* representa un refinamiento significativo del procedimiento usado en pruebas tempranas de eficacia de vacunas, en las cuales usualmente se usan animales que desarrollan la enfermedad, que deben mantenerse en instalaciones de alto nivel de contención, de las cuales no disponen todos los investigadores (180).

Los ensayos *in vitro* con candidatos vacunales permiten evidenciar su influencia positiva en el control del crecimiento micobacteriano intracelular, siendo lo anterior importante, pues la fagocitosis de este patógeno puede llevar a la muerte de macrófagos y no resultar en la eliminación o disminución de *Mtb*, sino conducir a un crecimiento intracelular acelerado que aún es independientemente de la activación previa o el tipo de macrófago que fagocita la micobacteria (181). En ensayos previos donde se han usado PMBCs de personas vacunadas con la BGG, se ha observado disminución del crecimiento micobacteriano en macrófagos infectados (108); lo cual hace muy interesante los resultados obtenidos en el presente trabajo, pues los estímulos aquí implementados son pequeñas moléculas (péptidos de 20 aa) en comparación a la BCG y se han conseguido importantes porcentajes de inhibición del crecimiento intracelular del patógeno (Figura 13); mientras que en otros reportes también con BCG y evaluando PMBCs, aunque se observó producción de citoquinas proinflamatoria esto no se correlacionó con control del crecimiento de la micobacteria (182). En sistemas *in vitro* desarrollados más adelante, se ha determinado la capacidad de los linfocitos activados con antígenos de *Mtb* para controlar la replicación bacteriana durante co-cultivo con macrófagos infectados, demostrando que el control del crecimiento *in vitro* en los linfocitos de ratones vacunados reflejó la protección *in vivo* en el reto con la micobacteria (183); en estas aproximaciones se manifiesta lo plausible de realizar ensayos *in vitro* que revelen información acerca de la posible capacidad que tienen los candidatos de inducir respuestas inmunes de protección frente al patógeno.

En todos los casos donde se registró inhibición, los péptidos indujeron proliferación de los linfocitos, no obstante, no todos los péptidos que produjeron expansión clonal de linfocitos fomentaron la reducción de la micobacteria en todos los donantes evaluados, esto posiblemente debido a diferencias relacionadas con la producción de sustancias microbicidas como el ON, por lo cual se evaluó su presencia en el siguiente paso de la investigación.

7.3.2. ON como agente microbicida encontrado en los sobrenadantes de co-cultivos de linfocitos estimulados con péptidos y macrófagos infectados por *Mtb*

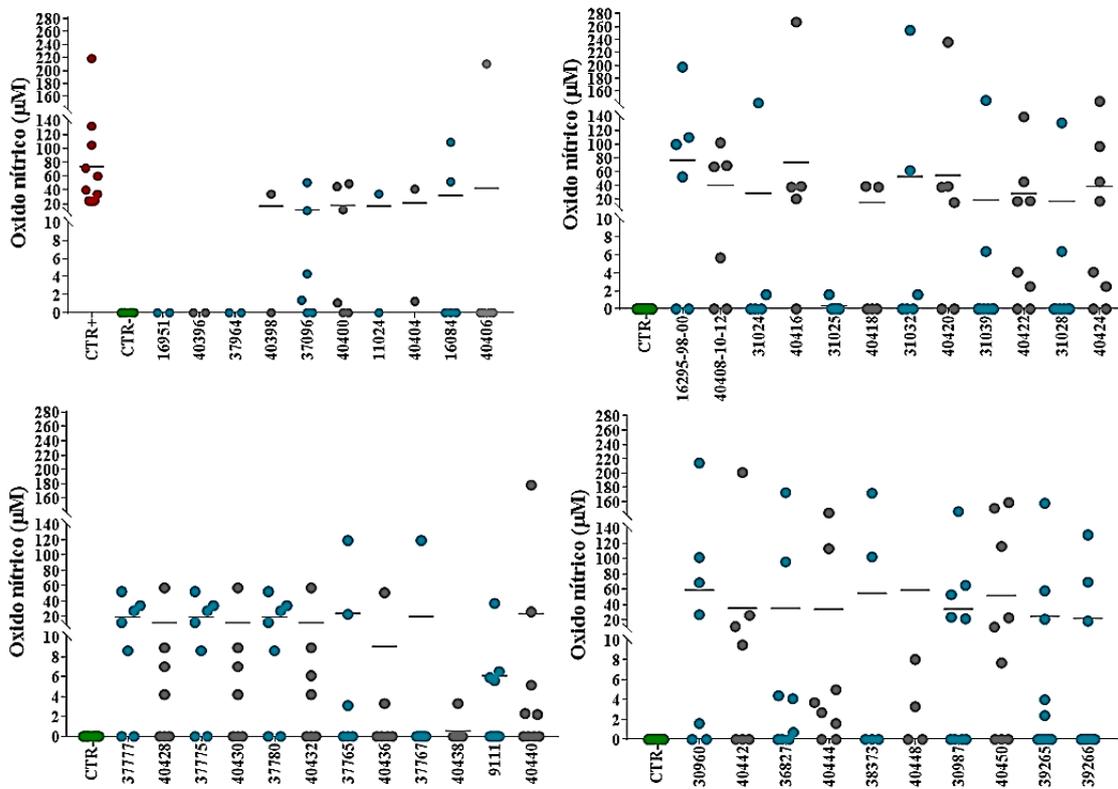


Figura 14. Producción de Óxido nítrico en macrófagos infectados activados por linfocitos estimulados con péptidos cHABPs y mHABPs. La determinación del óxido nítrico se midió indirectamente en los sobrenadantes de co-cultivo, a través de la detección de nitrito uno de los dos productos de descomposición primaria estable y no volátil del ON. Los puntos representan los donantes en los cuales se evaluó cada péptido.

El ON es una molécula microbicida ya que tiene la capacidad de desaminar y dañar directamente el ADN bacteriano al generar sitios abásicos y roturas de cadenas, además de interactuar con proteínas accesorias, todo esto aunado reduce la viabilidad de los microorganismos (184,185). En experimentos con macrófagos alveolares de sujetos con TB latente, se observó que estos producen ON, hecho que se relacionó con la inhibición intracelular del crecimiento de la micobacteria (186). Por otra parte, en macrófagos alveolares se ha evidenciado capacidad microbicida en contra de *Mtb* que se relaciona con iNOS y la producción de ON (187). De manera que, esta molécula puede estar jugando un rol importante en la defensa del hospedero contra la infección por micobacterias.

La producción de ON es catalizado por iNOS, a partir de la arginina, la cual se convierte en citrulina y ON, radical producido no sólo en macrófagos sino en otras células como neutrófilos, células epiteliales entre otras, que es altamente tóxico para las micobacterias intracelulares. La relación entre iNOS y ON es tan estrecha que la enzima se puede usar también como marcador de la concentración de ON (184,185,188).

En la figura 14, se consignan los datos correspondientes a la evaluación del ON con cada uno de los péptidos nativos y modificados evaluados en los sobrenadantes de los co-cultivos, si bien se observaron valores diferentes entre los diez donantes analizados, en general estos concuerdan con los resultados de inhibición que se apreciaron anteriormente, es decir la presencia de ON se relaciona con inhibición y viceversa (Fig. 13). La relación entre los porcentajes de inhibición y las concentraciones de ON halladas por donante no fue tan clara, en parte debido a la diferencia en la producción de la molécula entre individuos, no obstante, según los resultados obtenidos, las cantidades del metabolito producida por las células de los individuos analizados parecen ser suficientes para ofrecer algún efecto nocivo sobre el crecimiento intracelular de las micobacterias, lo cual se evidenció en la disminución del mismo, comparado con los controles de linfocitos sin estímulos antigénicos y péptidos en donde no se detectó ON.

Respecto a la variabilidad de resultados entre donantes, Rutschmann *et al.*, (189), describen los hallazgos clínicos después de una infección con *Mtb*, en donde se encuentran diferencias entre pacientes. Evaluando macrófagos individuales se vio que la tasa de crecimiento bacteriano intracelular varía notablemente, e investigando las diferencias entre estos fagocitos, resultó que la heterogeneidad estaba impulsada por la variación de célula a célula de la actividad de iNOS; variabilidad que ocurría hasta en una sola célula, pues, se encontró que la expresión de iNOS fluctúa con el tiempo, independientemente de la infección o activación con citoquinas como IFN- γ . De manera que, los autores concluyen que los encuentros entre bacterias y células pueden permitir o no la activación de genes antibacterianos para prevenir las infecciones, y que esta podría ser una de las razones por las cuales algunas personas expuestas si eliminan la bacteria mientras que otras desarrollan una enfermedad progresiva. Al tiempo que, se conoce que la micobacteria presenta su propia defensa frente al ON y otras especies reactivas de nitrógeno y ROS, en la que intervienen varios genes que expresan proteínas que le ayudan a protegerse del estrés oxidativo y a sobrevivir dentro de los fagocitos (100,190).

Según estudios previos, el ON además de ser inducido por citoquinas, mejora la secreción de estas moléculas, entre las que se encuentran TNF- α e IL-1 β , moléculas proinflamatorias, que posteriormente también incrementaron la producción de ON, lo que constituye un proceso de retroalimentación positiva, indicándose un papel autorregulador del ON que está colaborando con la respuesta inmune frente a los patógenos (184).

Ahora bien, la producción del ON en las células se ve impulsada en parte por las citoquinas proinflamatorias, entre las que se encuentran IFN- γ y TNF- α , las cuales fueron medidas en los sobrenadantes de cultivo producto de las linfoproliferaciones y se observaron valores significativamente diferentes a los controles (Fig. 12). Comparando los resultados de ON, con las citoquinas anteriormente mencionadas podría decirse que existe relación entre estas citoquinas y la producción de ON. Los estudios en pacientes con TB han mostrado que IFN- γ y TNF- α , actúan sinérgicamente para controlar el desarrollo de la enfermedad, dado que estas citoquinas producidas principalmente por los linfocitos T activan macrófagos para inducir moléculas efectoras como iNOS, en consecuencia, ON y otras moléculas como 3-nitrotirosinas, todas involucradas en el control de enfermedad (143,188).

El TNF α , también parece tener un rol importante en evitar el desarrollo de la enfermedad, se ha descrito que la falta de este se relaciona con susceptibilidad a la TB, es decir, un mayor número de micobacterias y daño en el tejido asociado, dado que éste además de activar a iNOS para que se produzca ON, también está asociado con la formación del granuloma, el cual es una estructura

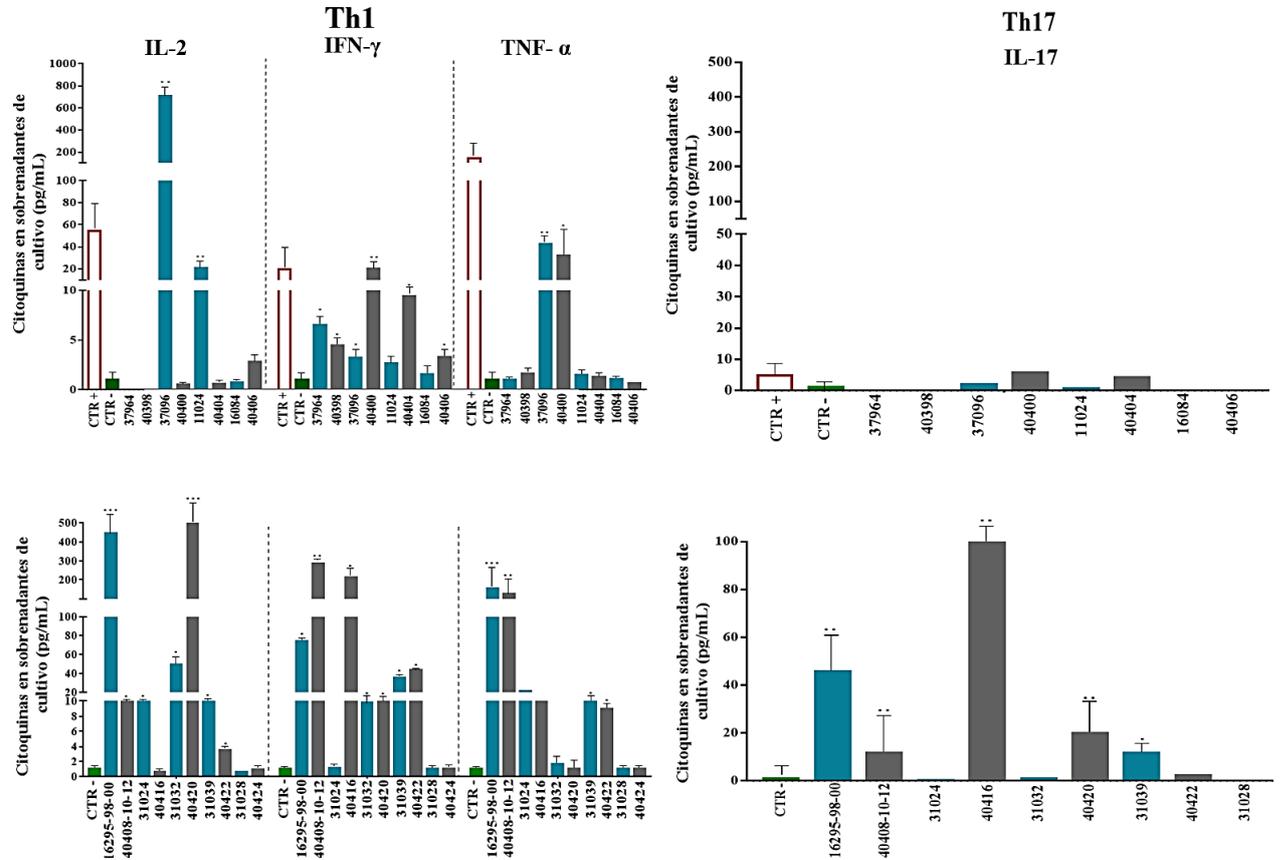
de contención de la micobacteria (191). Se sabe que aproximadamente un cuarto de la población mundial presenta TB latente, portando en granulomas la bacteria, la cual puede permanecer en estado de latencia toda la vida, no obstante, se ha descrito que en el tratamiento anti-TNF para otras enfermedades, se produce la reactivación de la TB en pacientes, pasando de un estado latente a uno activo, lo cual se conoce como una complicación mayor (191).

Adicional a la medición de ON, se analizó por citometría de flujo la concentración de citoquinas en los sobrenadantes de co-cultivos, para algunos péptidos hubo incremento, mientras que para otros disminución (Fig. 15). La dinámica de estas moléculas puede hacer que se produzcan y se consuman activamente según los requerimientos celulares para enfrentar a los patógenos, dicha dinámica puede estar involucrada en la inducción de moléculas como ON, que se mencionó anteriormente, u otras moléculas no medidas en el presente trabajo pero que pudieran contribuir a la defensa frente a la micobacteria, considerando lo evidenciado en los resultados de inhibición. Además de producir otro tipo de actividades de activación celular con el fin de defenderse del patógeno. En varios de los péptidos se observó un incremento de la IL-2, la cual es fundamental para la proliferación y mantenimiento de la población celular de linfocitos que está enfrentado el ataque por el microbio. Mientras que, en IFN- γ y TNF- α , no se vio una tendencia marcada en forma general, no obstante, se evidencia que los linfocitos en co-cultivo con los macrófagos infectados, están activos de manera que se aprecia estos cambios en la concentración de las citoquinas que pueden estar mediando activación de células para enfrentar a la infección por la micobacteria.

En experimentos publicados del 2016, aislaron PBMC de sangre de lactantes vacunados y sin vacunar con la BCG, posteriormente las células se estimularon con *Mtb*, PPD y se caracterizaron las poblaciones celulares de linfocitos, encontrando que LT CD4+ IFN γ +TNF α +IL-2+ específicos para PPD constituyeron el porcentaje dominante a los 4 meses y 1 año después de la vacunación con la BCG, poblaciones que fueron indetectables en lactantes no vacunados de la misma edad. Estas poblaciones celulares se correlacionaron con la inhibición del crecimiento micobacteriano, que no se dio en las muestras obtenidas de infantes no vacunados usados como controles (192).

Entre las citoquinas detectadas, se encontró la IL-17, que hace referencia a la presencia del linaje Th17 en los LT CD4+ caracterizados en el presente proyecto. En ratones se ha visto que LT CD4+IFN- γ +IL-17+ específicos para ESAT-6 (E6, antígeno micobacteriano), se correlacionaron positivamente con la protección frente a *Mtb* tanto antes como después del desafío con micobacterias; en el experimento se pusieron macrófagos tratados con el sobrenadante de células pulmonares reestimuladas de ratones inmunizados con HSP90-E6, restringiendo significativamente el crecimiento de la micobacteria, siendo este fenómeno anulado al adicionar anticuerpos anti-IFN- γ y/o anti-IL-17 (193). Si bien, en este trabajo no se abrogaron estas poblaciones celulares o sus citoquinas, ambas se encontraron aumentadas frente a los controles sin estímulos peptídicos, y en los ensayos de co-cultivo con macrófagos se observó inhibición intracelular del patógeno, así que no se descarta que la presencia de estas poblaciones celulares y sus citoquinas también hayan contribuido a los resultados observados. En la Fig. 15, se aprecia que los valores de esta citoquina disminuyeron, esto debido probablemente a su utilización para el reclutamiento de otras células, así como la producción de TNF- α , que como se mencionó antes, se vio aumentado para algunos tratamientos. Finalmente, la producción de las citoquinas IL-4,

IL-6 e IL-10, no sufrieron cambios sustanciales, por lo cual no se describen en las gráficas presentadas.



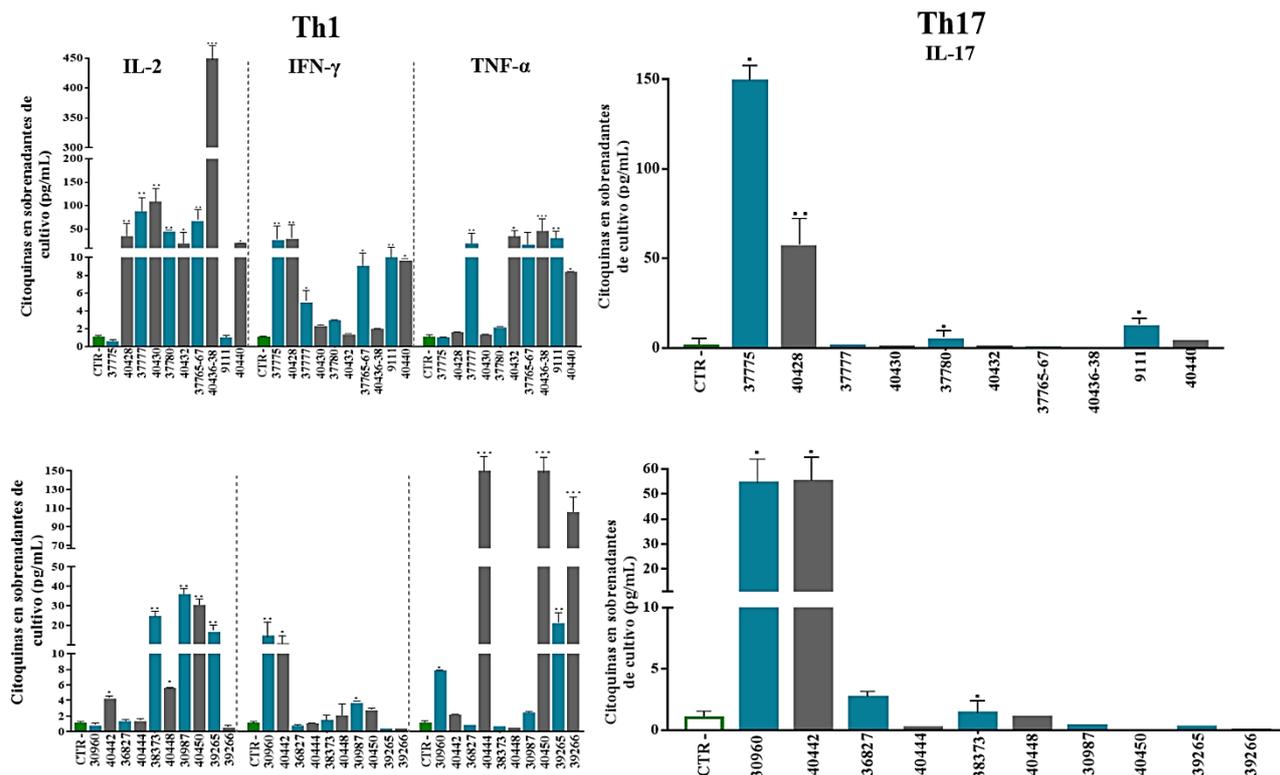


Figura 15. Análisis de citoquinas evaluadas por citometría en sobrenadantes de co-cultivos en presencia de linfocitos humanos estimulados con péptidos nativos y modificados. Los porcentajes de las poblaciones estudiadas están normalizados con el control de células sin estímulos antigénicos. Las diferencias estadísticamente significativas, entre el control y cada tratamiento se determinaron con la prueba *t-Student*, $p \leq 0,05$, $\leq 0,01$ y $\leq 0,001$.

7.4. Establecer la función efectora de los anticuerpos generados por linfocitos B que reconocen péptidos modificados de las proteínas de *Mtb*.

Aunque el papel de la inmunidad humoral en la tuberculosis sigue en desarrollo, diferentes autores han descrito que los Acs contribuyen a contrarrestar la infección por *Mtb* (194–196). Este trabajo ha evaluado la posible función efectora *in vitro* de Acs a partir de péptidos candidatos a formar parte de una vacuna antituberculosa, para lo cual se siguieron los ítems enunciados a continuación:

7.4.1. Selección de péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv

Como se expuso anteriormente, de acuerdo con los lineamientos establecidos por la FIDIC para la escogencia de antígenos candidatos, en donde los péptidos nativos estudiados en ensayos preliminares presentan capacidad de inhibir la entrada de la micobacteria a células hospederas (3-22); se evaluó esta misma capacidad en las secuencias modificadas, a partir de los cuales también se obtendrían los anticuerpos péptido-específicos. En la figura 16, se observa la capacidad que tienen los péptidos modificados para inhibir la entrada de la micobacteria a los macrófagos U937 en diferentes concentraciones. Se consideró un umbral de inhibición mayor a un 10% que representa el porcentaje en donde hay diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control de células infectadas sin tratamiento.

Del total de las secuencias evaluadas, un 75% de los péptidos modificados inhibieron la entrada de la micobacteria a los macrófagos en más de un 10%, estas secuencias corresponden a los péptidos 40396, 40400, 40404, 40408, 40410, 40412, 40416, 40418, 40422, 40428, 40430, 40432, 40436, 40438, 40440, 40448, 40450. El 25% de los péptidos modificados restantes sin acción inhibitoria fueron excluidos de los ensayos posteriores junto a su contraparte nativa, dado que, en ensayos preliminares se observó, que sí los péptidos no inhibían la entrada de la micobacteria a las células hospederas, los Acs que reconocían a dichas secuencias tampoco presentaban esta capacidad, no obstante, algunos se incluyeron como controles.

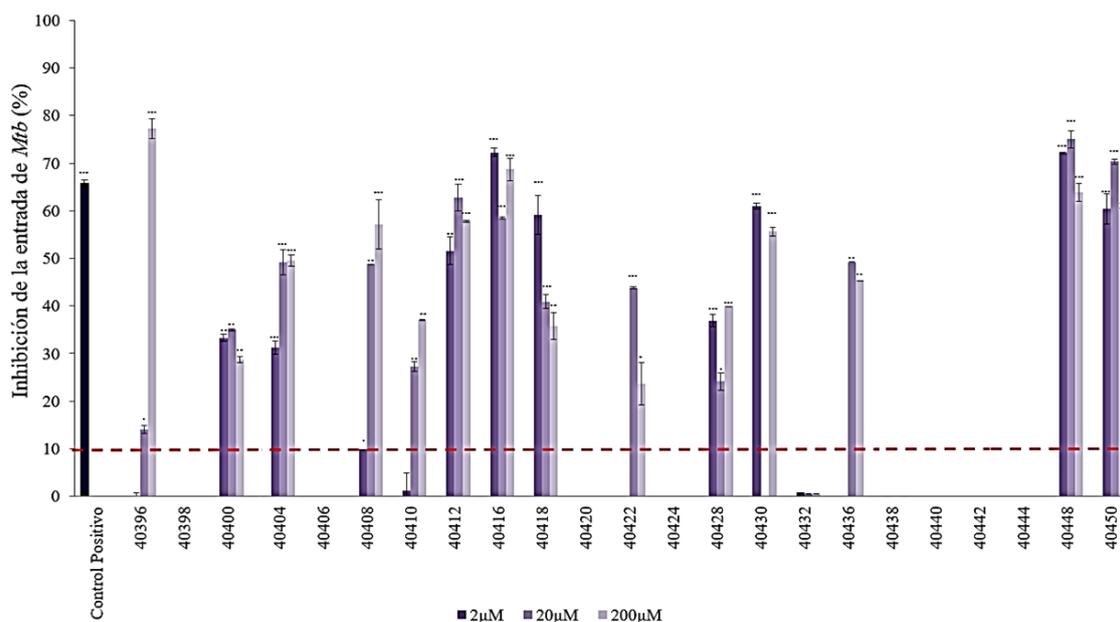


Figura 16. Ensayo de inhibición de la entrada *Mtb* a macrófagos U937 en presencia de las secuencias modificados. La actividad de inhibición de los péptidos modificados se evaluó en las concentraciones de 2 μM, 20 μM y 200 μM, por triplicado. El control de inhibición corresponde a colchicina (70,93%). Se llevó a cabo una prueba de *Kruskal Wallis*, las barras de error muestran la desviación estándar, $p \leq 0,05$, $** \leq 0,01$ y $*** \leq 0,001$.

Considerando los anteriores resultados de inhibición con péptidos nativos y modificados, se seleccionaron 46 secuencias peptídicas que hacen parte de 14 proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv (Fig. 17). Para estas secuencias que inhibieron la entrada de la micobacteria a células U937, se identificaron regiones que pudieran ser reconocidas por anticuerpos presentes en los sueros de los donantes. Se usó el servidor *B-Pred*, encontrándose epítopes B con una longitud mínima 5 aminoácidos. La presencia de los epítopes se observó tanto en los péptidos nativos como en los modificados, lo cual sugiere que las modificaciones no afectaron negativamente las epítopes B (Fig. 17). Estas epítopes tenían características hidrófilas, regiones flexibles y una superficie expuesta (197), lo que significa, que se podrían producir Acs a partir de estos péptidos si fueran inoculados en humanos y que también es plausible encontrar Acs que reconociesen estos epítopes en sueros humanos de individuos expuestos a la micobacteria.

de IFN- γ , lo que sugiere formas de respuesta alternativas a la clásica, principalmente ligadas a esta citocina que también puede conferir protección contra el desarrollo de la enfermedad.

En las secuencias modificadas se observó un mayor reconocimiento por parte de los sueros empleados, evidenciándose el mejoramiento de la inmunogenicidad conferida por los cambios de estas secuencias en comparación con los péptidos nativos. Por otra parte, las mayores absorbancias se presentaron en los péptidos de las proteínas Rv3166c, Rv0180c, Rv2270 y Rv1911c (Fig. 18).

El reconocimiento de péptidos encontrado en este trabajo por parte de individuos que no presentan tuberculosis activa o latente, podría deberse en parte a la sensibilización previa con otras micobacterias, ya que se ha visto que las secuencias de péptidos derivados de proteínas de *Mtb* no están restringidas a esta especie.

La respuesta de Acs observada en los donantes, indica que los cambios en las secuencias de aminoácidos de los antígenos aumentaron su capacidad para unirse al paratope de las IgG en los sueros; esto habría estado directamente relacionado con la capacidad de los péptidos para inducir una respuesta policlonal de linfocitos B. Con respecto a los resultados observados en los péptidos nativos y modificados, se evidenció el reconocimiento de secuencias modificadas con Acs adquiridos naturalmente, lo que podría brindar información sobre los parámetros para modificar los péptidos y que puedan inducir una respuesta mejorada en un escenario de vacunación.

Como se evidenció en la predicción de epítopes B, también, en los sueros de los donantes se encontraron anticuerpos que reconocieron todas las secuencias en estudio (nativas y modificadas), por lo cual se procedió a extraer dichas inmunoglobulinas con el fin de evaluar algunas de sus funciones efectoras que podrían contribuir en la respuesta inmune frente a la TB. Se excluyeron los péptidos 39265 y 39266 de la proteína Rv3587c, identificados en este trabajo, dado que fueron pobremente reconocidos por los sueros humanos probados en la primera parte; se estimó que el rendimiento en la extracción de las inmunoglobulinas que los reconocieran también sería bajo e insuficiente para continuar con la metodología propuesta, por lo tanto, se espera poder evaluarlos y a sus secuencias modificadas más adelante.

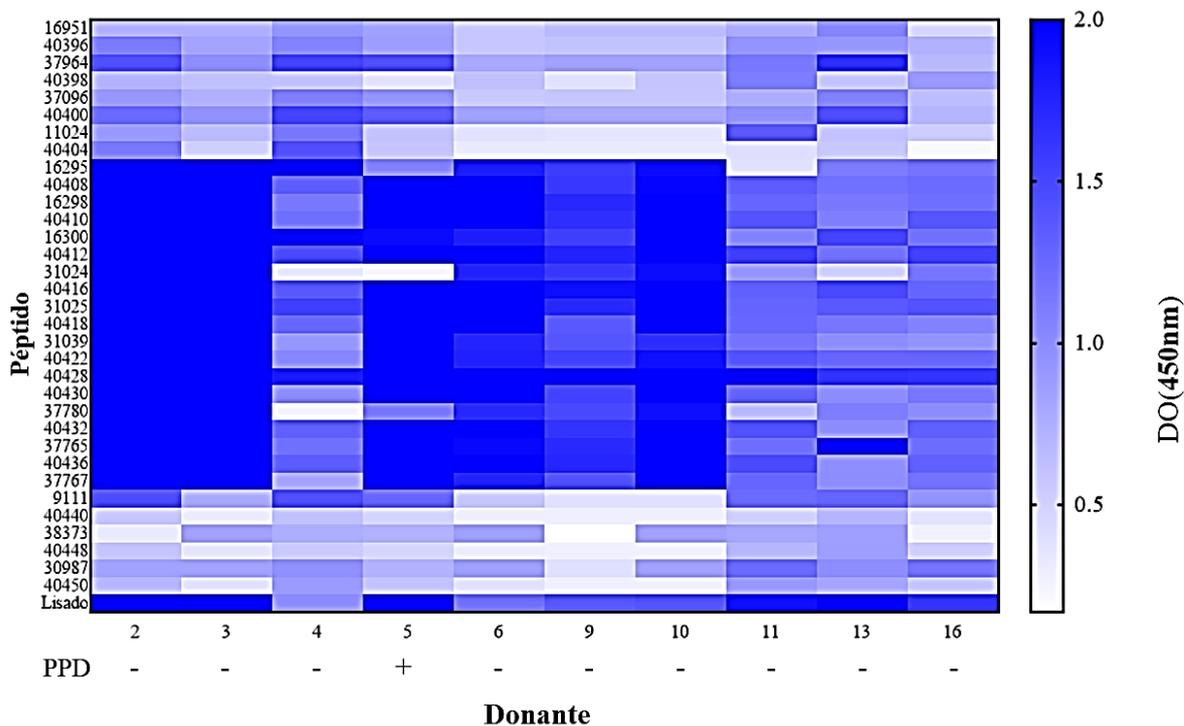


Figura 18. Reconocimiento de péptidos nativos y sus secuencias modificadas. Los datos representan el resultado de 10 muestras por duplicado. Los números de los péptidos están en el eje Y, los donantes seleccionados para el estudio se encuentran en el eje X. En una escala que va de 0 a 2 se encuentra el promedio de la absorbancia.

Una vez detectados anticuerpos dirigidos contra los péptidos aquí estudiados en los sueros de los donantes, se evaluó el efecto de la pre-incubación de los sueros en la *Mtb* sobre su ingreso a macrófagos, esto se llevó a cabo con cada uno de los sueros de forma individual y con el pool de todos los sueros. La entrada de *Mtb* se evaluó en macrófagos derivados de monocitos humanos U937, ya que estas células tienen receptores para la fracción de la región Fc de IgG que puede mediar en los procesos celulares y es la principal inmunoglobulina en sangre y a la cual se le han descrito la mayor cantidad de funciones efectoras (200,201).

La entrada de la micobacteria disminuyó en un 60% cuando se empleó el *pool* de sueros que reconocían antígenos micobacterianos (Fig. 19), mientras que, con los sueros individuales se obtuvo inhibiciones de la entrada del patógeno del 49,1% y 51,1%, las cuales no representaron diferencias significativas con respecto a los resultados del *pool*. En el control negativo, que correspondió a un suero en el cual no se detectaron IgGs que reconocieran al lisado de la micobacteria o a los péptidos, no inhibió la entrada del patógeno a células blanco de infección.

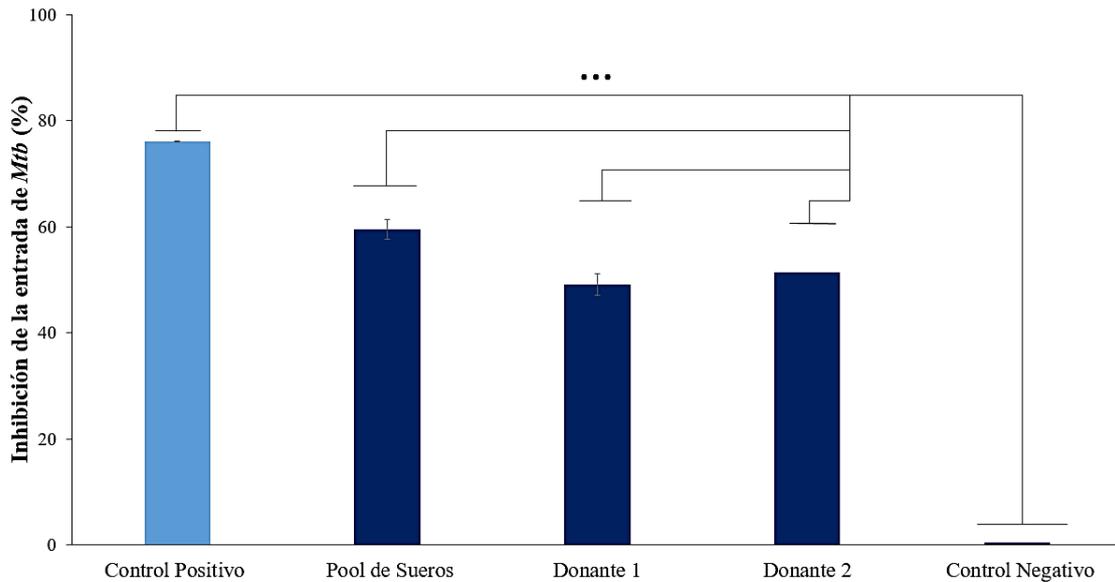


Figura 19. Ensayos de Inhibición de la entrada de *Mtb* pre-incubada con sueros que reconocen antígenos micobacterianos en macrófagos humanos U937. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se usó Kruskal Wallis, las barras de error muestran la desviación estándar, $p \leq 0,05$, $** \leq 0,01$ y $*** \leq 0,001$.

Considerando los anteriores resultados de inhibición donde inmunoglobulinas presentes en sueros de los donantes, que reconocen el lisado de micobacteria son capaces de inhibir la entrada de *Mtb* H37Rv a las células blanco de infección, se evaluó si anticuerpos que reconocen los péptidos en estudio, pueden conferir algún tipo de protección *in vitro* como actividad inhibitoria sobre la entrada de la micobacteria. Para ello, se aislaron las inmunoglobulinas que reconocen péptidos nativos y modificados a partir de los sueros colectados de los diferentes donantes.

En la figura 20, se muestra uno de los pasos en la purificación de IgG que reconoce lisado de *Mtb*, en la SDS PAGE denaturante de IgG se evidencian las bandas características de 50 y 25 kDa, correspondientes a las cadenas pesadas y livianas (respectivamente) de la IgG. Mediante la técnica de Dot blot, se vio como el reconocimiento antigénico por parte de las IgGs hacia el lisado se mantiene durante el proceso de purificación. Siguiendo la misma metodología se determinó el reconocimiento de los anticuerpos dirigidos contra cada uno de los péptidos nativos y modificados como se indica en la figura 21, se encontró que tanto los sueros como las IgGs purificadas reconocen los péptidos modificados y las secuencias nativas que se encuentran en las proteínas de *Mtb* H37Rv de donde se derivaron.

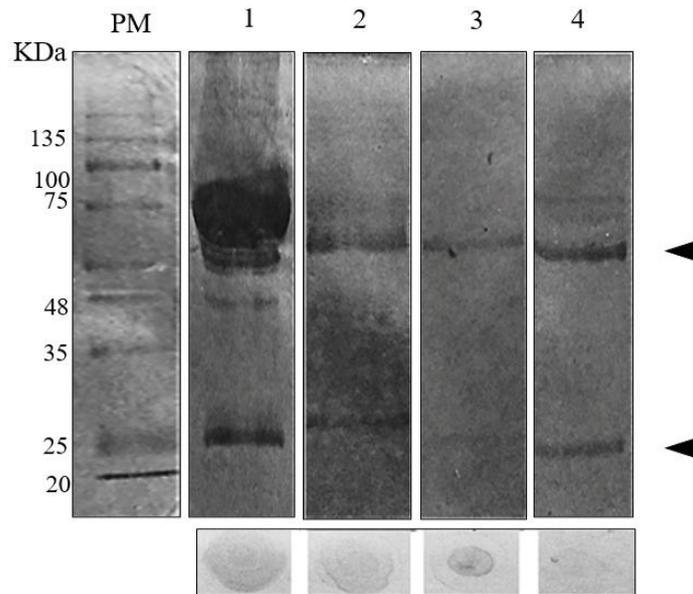


Figura 20. Purificación de anticuerpos que reconocieron el lisado de *Mtb* H37Rv. Carril 1: Suero completo que reconoció mediante ELISA el lisado micobacteriano; carril 2: IgG total precipitada; carril 3: IgG anti*Mtb* H37Rv purificada; carril 4: FnR Fracción no retenida. Debajo de cada línea se presenta el reconocimiento por Dot blot de las IgGs obtenidas frente a lisado *Mtb* H37Rv.

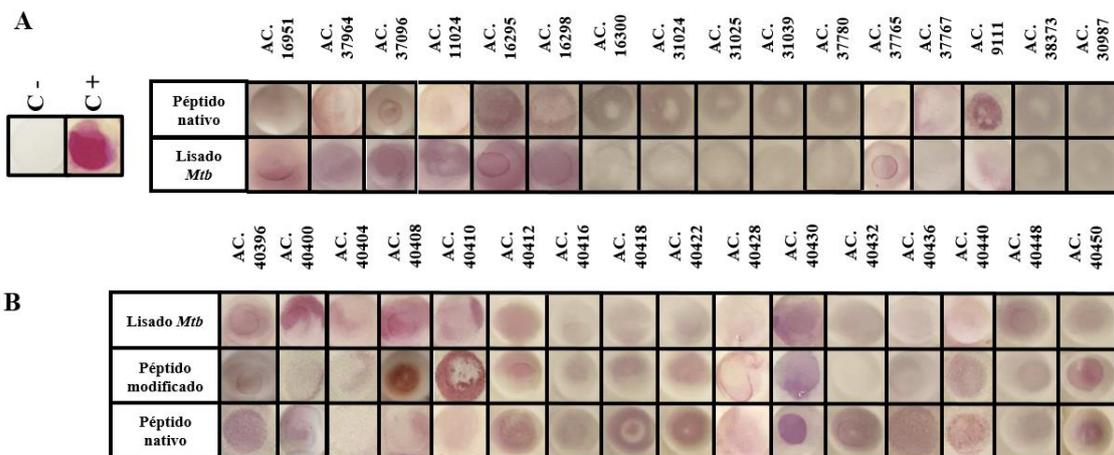


Figura 21. IgG purificadas y aisladas de donantes que reconocieron péptidos nativos y modificados. **A** Se observa el reconocimiento del lisado de *Mtb* H37Rv por IgGs purificadas dirigidas a péptidos nativos y el reconocimiento de estas IgGs contra los respectivos péptidos nativos. **B** IgGs dirigidas a péptidos modificados, que reconocen lisado completo de la micobacteria, el mismo péptido modificado contra el cual se aislaron y por último se muestra el reconocimiento de IgGs purificadas a las respectivas secuencias nativas de las cuales se derivaron los péptidos modificados.

Ahora bien, una vez aislados los anticuerpos séricos para determinar si las inmunoglobulinas que reconocían los péptidos ejercían la misma función efectora de inhibición evidenciada en los sueros, se procedió a realizar el ensayo de inhibición de la entrada del patógeno a células hospederas por preincubación con las IgG-péptido específicas purificadas (Fig. 22). Se observó que todos los anticuerpos que reconocen las secuencias nativas inhibieron con porcentajes desde

13% (Ac. 16295) hasta cerca del 90% (Ac. 9111), presentando diferencias significativas con respecto al control de infección. Lo que confirma la importancia de dichas secuencias con respecto a la entrada de micobacterias a las células hospederas (3-22).

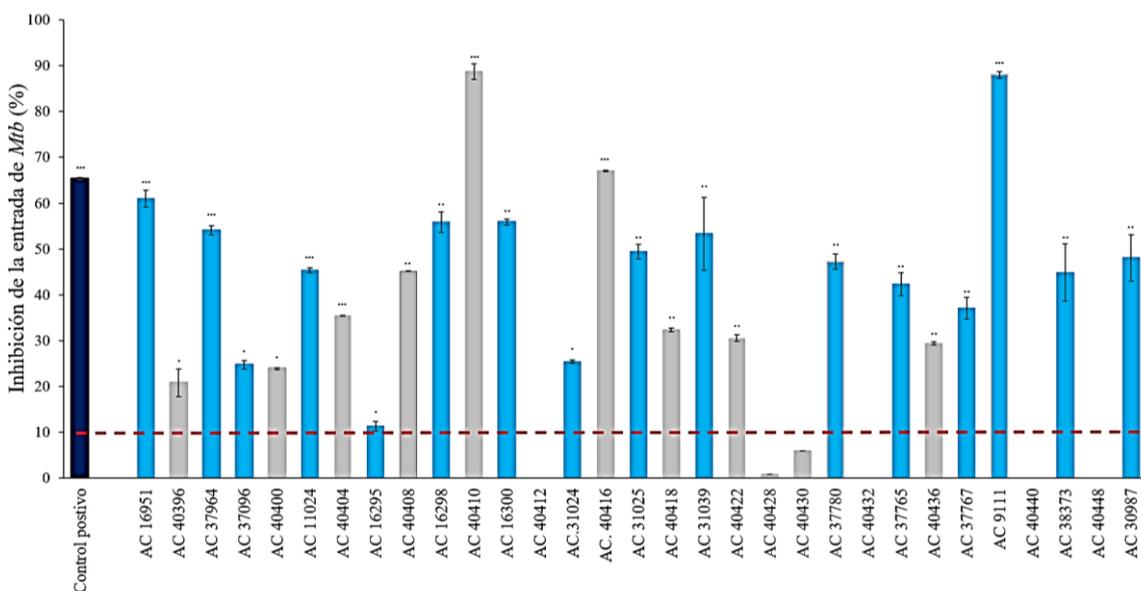


Figura 22. Inhibición de la entrada de micobacterias preopsonizadas con anticuerpos aislados con las cuales se infectaron macrófagos U937. Ac: número del anticuerpo para cada péptido. Se realizó una prueba de *Kruskal Wallis*, las barras de error muestran la desviación estándar, $p \leq 0,05$, $\leq 0,01$ y $\leq 0,001$.

En cuanto a los Acs que reconocían las secuencias modificadas evaluadas el 37,5% de éstas no mostraron capacidad de inhibición; no obstante, se destacaron las IgGs que reconocen los péptidos modificados 40410 (Rv3166c) y 40416 (Rv0180c) superando los porcentajes observados con el control de inhibición del experimento, además resultaron ser interesantes dado que la inhibición ejercida por los Acs contra secuencias modificadas fue mayor a la presentada en las inmunoglobulinas que reconocen las secuencias nativas. Lo anterior muestra el potencial de modificar secuencias para el diseño de candidatos a antígenos vacunales antituberculosos, ya que la modificación de algunos péptidos condujo a la obtención de Acs que reconocían las secuencias de las que habían sido derivadas y retenían la actividad de inhibición mostrada por las inmunoglobulinas dirigidas contra los péptidos nativos, incluso los cambios mejoraron la actividad inhibitoria. En principio, se realizaron modificaciones para mejorar los epítopes T, obteniendo así complejos péptido-CMH-II altamente estables para que pudieran ser presentados a los linfocitos T, por lo que se esperaba que produjesen una respuesta inmune relacionada con estas células, sin embargo, se observó que los cambios también podrían favorecer producción de epítopes B (Tabla 5) (46).

Se encontró que el 62,5 % de Acs dirigidos contra péptidos modificados inhibieron la entrada de la micobacteria, y que algunas de las éstos tuvieron porcentajes mayores a lo encontrado en las inmunoglobulinas de los nativos, no, obstante se presentaron resultados en donde los Acs no inhibieron; por lo cual, se analizaron las principales características de los péptidos modificados para encontrar las posibles razones de tales resultados.

En las secuencias modificadas que dan lugar a Acs con capacidad de inhibición se conserva hasta el 40% de los aa de los péptidos originales. Los resultados sugirieron que, si bien los Acs obtenidos reconocían a sus antígenos peptídicos, más cambios en las secuencias hacían que las IgG que las reconocían no pudieran inhibir la entrada de patógenos a las células hospederas (Tabla 5).

Lo anterior, significó que tanto el esqueleto peptídico como la orientación de las cadenas laterales de aminoácidos que lo componen son relevantes para la acción de los Acs. Los cambios de aminoácidos específicos en las secuencias han demostrado ser esenciales con respecto a la función peptídica. Al igual que los resultados encontrados por FIDIC en el diseño de la vacuna sintética contra malaria, se observó que algunos mHABP no indujeron inmunidad protectora en monos *Aotus* y que las modificaciones en las secuencias peptídicas resultaron ser la clave contra la infección con *P. falciparum* en un reto *in vivo* (99). Así, se puede observar que, los cambios en los péptidos pudieron ser acertados en el sentido en que los paratopes de los anticuerpos con función inhibitoria los reconocieron, sin embargo, se evidenciaron cambios que no favorecieron este hecho o en dónde simplemente la unión entre epítipo y paratope no fue lo suficientemente fuerte dado los cambios en los aminoácidos de los péptidos, lo que condujo a la disminución de la actividad inhibitoria o su anulación. Por otra parte, se evidenció que los Acs de los péptidos que no inhibieron, tampoco tenían esta capacidad como es el caso del péptido 40432 (Rv2270) (Tabla 5). En tanto que, en los péptidos que disminuyeron el ingreso de la micobacteria a células hospederas pero que conservaban un porcentaje bajo de la secuencia nativa (menor a 40%), se evidenció que los Acs que los reconocían no tenían esta capacidad o fue casi nula comparado con los demás, como sucedió con los péptidos 40428 y 40430 (Rv2270). Los resultados obtenidos son muy valiosos pues contribuyen a refinar la metodología empleada para obtener secuencias que confieren inmunidad frente a la TB.

Con el propósito de evidenciar si los péptidos modificados podrían inducir antigenicidad que confiera protección contra la infección *in vitro*, se inocularon primates *Aotus* con péptidos modificados como 40412, 40416, 40418, 40422, 40432, 40448 y 40450 (Fig. 23). Se encontró respuesta de IgGs no sólo para las mismas secuencias inoculadas sino también contra las secuencias nativas (16300, 31024, 31025, 31039, 37780, 38373 y 30987). Éste fue el resultado esperado considerando que la modificación de los péptidos busca aumentar el reconocimiento antigénico de las secuencias nativas las cuales se derivan de proteínas presentes en envoltura de la micobacteria, y que dicho reconocimiento pueda contribuir a la protección frente al patógeno.

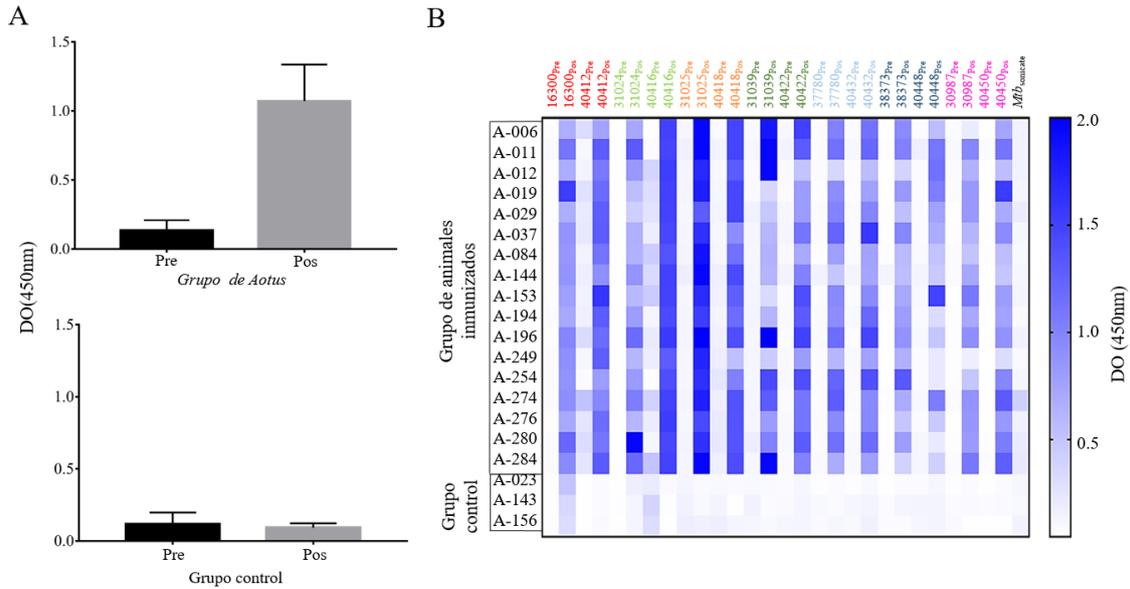


Figura 23. Reconocimiento antigénico de péptidos nativos y sus secuencias modificadas por primates *Aotus*. **A** Superior, promedio de reconocimiento en el grupo de 17 primates inmunizados con la mezcla de los 7 péptidos sintéticos modificados. Inferior, respuesta del grupo control. **B** Antigenicidad evaluada con respecto a los péptidos nativos y modificados, En el eje X se encuentran los números de los péptidos, donde se observa la respuesta Pre-I y Pos-I, por primate, codificados con la letra A y su respectivo número. Lisado de *Mtb* (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv), Pre-inmunización (Pre) y Post-Immunización (Pos). Las absorbancias corresponden al promedio de 3 réplicas, se encuentran en la escala de 0 a 2

Una vez inoculados con los péptidos modificados, los sueros de *Aotus* se usaron para ensayos de inhibición y se observó que, al ser preincubados con la micobacteria, redujeron la entrada de *Mtb* a las células U937 (Fig. 24), correlacionándose con los resultados obtenidos para Acs humanos previamente aislados y este patrón se ha observado con sueros humanos dirigidos a antígenos no proteicos (202). Así, la inoculación de los primates permitió evidenciar las propiedades inmunogénicas de los péptidos modificados.

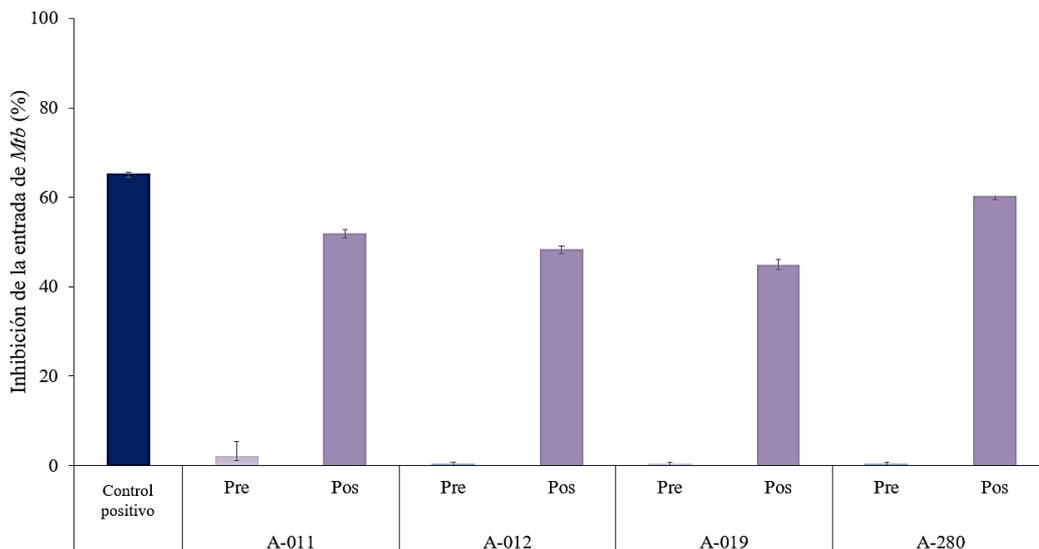


Figura 24. Macrófagos infectados con *Mtb* preincubada con sueros de primates no humanos inmunizados con la mezcla de péptidos sintéticos modificados. Las diferencias se evidenciaron mediante la prueba de *Kruskal Wallis*, las barras de error muestran la desviación estándar, $p \leq 0,05$, $** \leq 0,01$ y $*** \leq 0,001$.

Inducir protección *in vitro* en primates no humanos es muy interesante dado que con este modelo se han observado importantes resultados de inhibición; los porcentajes encontrados fueron similares a los obtenidos por experimentos con sueros humanos. Esto proporcionó una prueba de concepto con respecto a la metodología empleada sobre el posible papel de los péptidos en la inmunidad contra la TB y, lo que es más importante, que la respuesta inducida por péptidos demostrada hasta ahora *in vitro* con monos *Aotus* podría conferir protección en humanos.

Además, así como los péptidos han inducido protección *in vitro* en *Aotus*, su exposición en humanos para su posible uso como antígenos en la formulación de vacunas podría ayudar a conferir protección, ya que se encontraron individuos cuyo suero tenía Acs que reconocían los péptidos y que tenían actividad de inhibición. Esto resaltó la importancia de poder utilizar estos péptidos en una vacuna multiepítotope sintética contra la TB.

Dado que las IgGs que inhiben la entrada de patógenos a las células blanco de infección se aislaron de sueros en donantes que no tenían tuberculosis activa y en vista de la creciente evidencia sobre el papel de los Acs en la inmunidad contra la TB, se puede sugerir que los Acs responsables del reconocimiento de los péptidos modificados participan en la protección contra la infección por patógenos, mediante un mecanismo aún por estudiar.

Por último, la unión bacteriana a la superficie de la célula hospedera es el primer paso en la patogenicidad porque permite que el patógeno interactúe con células específicas. Esto involucra a su vez, diferentes moléculas en la superficie del patógeno (201). La capacidad de un patógeno para colonizar e invadir el tejido del hospedero depende estrictamente de esta interacción, por lo que los patógenos tienen un repertorio eficiente de factores de virulencia que causan daño a las células del hospedero (203). *Mtb* no es diferente, por lo que uno de los eventos fundamentales en el desarrollo de la tuberculosis es la infección por micobacterias de las células hospedera; por lo tanto, la inhibición de este evento es clave con respecto a la protección del hospedero (42,203) ya que, este patógeno puede usar a los macrófagos como hábitat natural y herramienta para propagarse dentro del hospedero, causando una patología más grave (40).

Por lo tanto, es especialmente importante evaluar la capacidad de las vacunas candidatas para inhibir la entrada de *Mtb* (42). Con respecto a las bacterias en general, se han descrito Acs capaces de prevenir directamente el paso inicial de la unión del microorganismo a las células hospederas (201). Sin embargo, la función de las inmunoglobulinas no es solo este mecanismo; se ha informado que la neutralización previa a la unión hace que los agregados de patógenos eviten el contacto con las células hospederas, inmovilizarlos paraliza el microorganismo y hace que no sean infecciosos. Las inmunoglobulinas también pueden inducir poros en las membranas causando la muerte; otros pueden afectar el metabolismo del patógeno y la neutralización intracelular puede interrumpir el ciclo de vida del patógeno (201). En *Mtb*, Acs puede tener actividad microbicida o neutralizante directa; mejorar la fagocitosis para matar al patógeno; el aumento de la fusión fagosoma-lisosoma restringe el crecimiento de *Mtb* y se ha demostrado que los Acs promueven la activación del inflammasoma en los macrófagos para matar al microorganismo (35). Los Acs pueden tener muchos mecanismos que favorecen al hospedero para hacer frente a patógenos bacterianos y *Mtb*, entre los que destaca prevenir la entrada de

patógenos teniendo en cuenta las implicaciones antes mencionadas, como mecanismos potenciales para la protección del hospedero.

Los resultados de este trabajo llevan a afirmar que las secuencias peptídicas modificadas a partir de péptidos proteicos en la superficie de *Mtb* H37Rv pueden producir Acs inhibidores de infecciones y, por lo tanto, representan candidatos prometedores a la hora de diseñar una vacuna antituberculosa sintética.

7.5. Evaluación de activación de polimorfonucleares dependiente de anticuerpo

Siguiendo con la evaluación de la función efectora de los anticuerpos aislados que reconocen a los péptidos en estudio, se propuso evidenciar el tipo de muerte que estos inducían en neutrófilos humanos.

7.5.1. Estandarización para la obtención de neutrófilos

La metodología estandarizada permitió aislar en promedio 8×10^6 neutrófilos (Fig. 25A), con una viabilidad del 95-99% y una pureza del 95%, en la figura 25B se observaban los neutrófilos con un núcleo multilobulado y un citoplasma rosado, la pureza fue confirmada por citometría de flujo utilizando un anticuerpo dirigido al receptor CD16b (Fc γ R111b), que se encuentra exclusivamente en los neutrófilos (Fig. 25C).

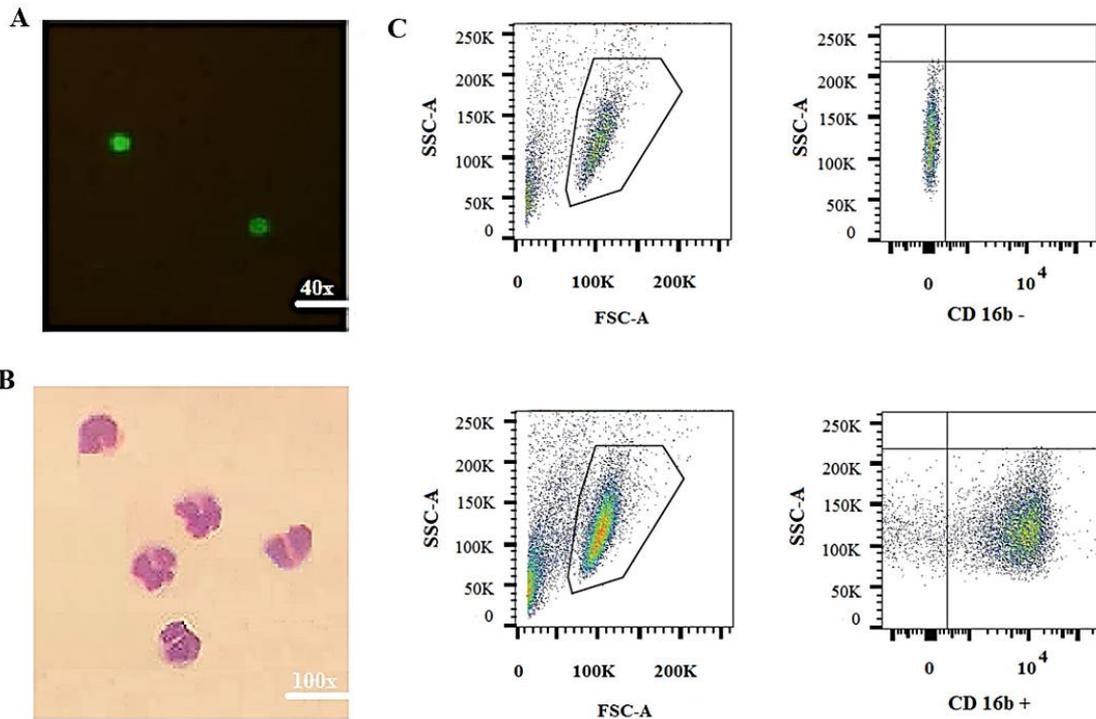


Figura 25. Análisis de neutrófilos aislados de sangre periférica. **A** PMNs observados con naranja de acridina. **B** Coloración Giemsa, **C**. En el panel superior neutrófilos sin CD16b-PE (Fc γ R111b) y en el panel inferior células marcadas con CD16b-PE (Fc γ R111b).

En la figura 26, se indica la estandarización del MOI de infección para lo cual se implementó MOI 1:5, 1:10 y 1:15, se evaluó por citometría de flujo, encontrándose que el MOI 1:5 presentó un porcentaje de 38,9 % de infección, escogido para realizar los posteriores ensayos, ya que a mayor infección más deterioro celular producto de la muerte necrótica inducida por la micobacteria.

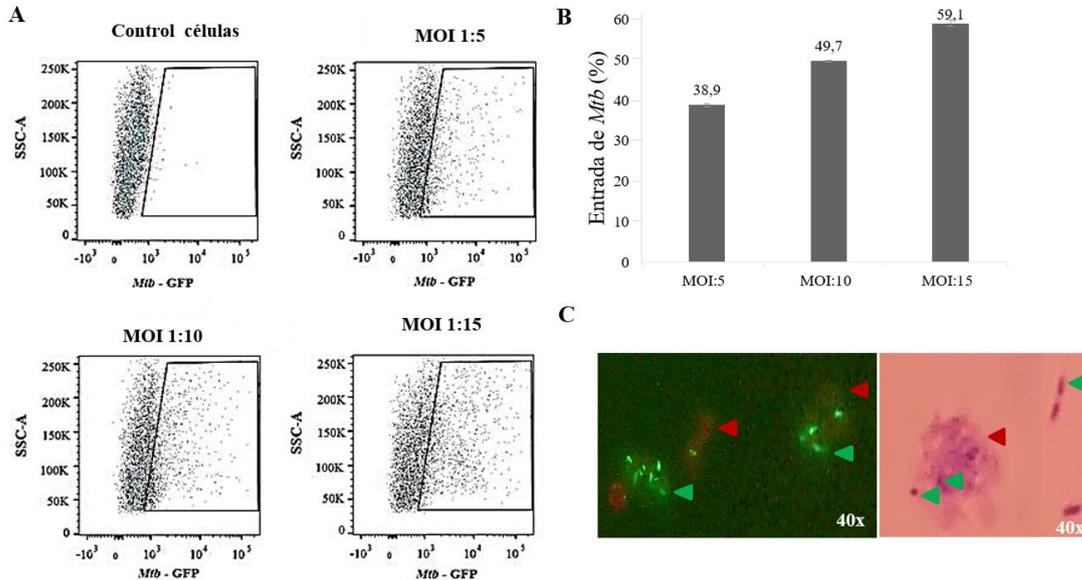


Figura 26. Estandarización MOI de infección para Neutrófilos. **A** Porcentaje de fagocitosis evaluado mediante citometría de flujo, se utilizó un control de células no infectadas y otras infectadas en MOIs 5, 10 y 15. **B** Análisis estadístico del porcentaje de fagocitosis evaluado por triplicado **C** Neutrófilos previamente infectados observados por microscopía de fluorescencia (izquierda) y Giemsa (derecha). Las flechas rojas indican a los neutrófilos mientras que las verdes a la *Mtb* transformada con GFP.

En neutrófilos recién aislados se evidenció apoptosis en un 5 % de la población, para células incubadas durante 24h (que se usaron como control) se alcanzó hasta un 84,2 % y en neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv, se observó el menor porcentaje de apoptosis que correspondió al 3,32 % (Fig. 27). Además de la coloración con Anexina V y PI, la muerte de los neutrófilos se caracterizó por microscopía realizando tinción de Wright. En la figura 26, se observa la apoptosis determinada morfológicamente por la contracción y fragmentación nuclear, la condensación celular, la formación de ampollas en la membrana y cuerpos apoptóticos, por otro lado, en la muerte necrótica se vio el citoplasma gradualmente translúcido y la ruptura de la membrana celular.

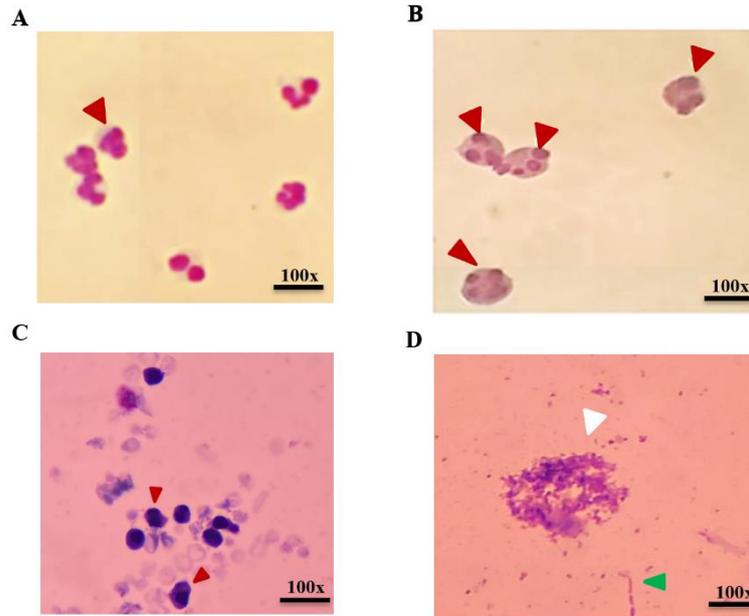


Figura 27. Muerte celular de neutrófilos. Neutrófilos en apoptosis: **A** Células recién aisladas, **B** PMN 24 horas pos-aislamiento. **C** Neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv en apoptosis en donde se observan los cuerpos apoptóticos ya formados. **D** Células pos-infección con *Mtb* H37Rv en necrosis. Las fechas rojas indican a los neutrófilos en apoptosis, las blancas aquellos en necrosis y en verde a *Mtb*-GFP.

Después de caracterizar a los PMNs y sus tipos de muerte por microscopía, se procedió a evaluar el efecto de la infección micobacteriana previo contacto con los anticuerpos anteriormente empleados en neutrófilos humanos. La citometría de flujo permitió analizar la necrosis y apoptosis, los dos principales tipos de muerte celular en esta población, empleando Yoduro de propidio (IP) que interactúa con el ADN, al cual tiene acceso por un proceso necrótico en la célula y la Anexina V (AV) que se une a la fosfatidilserina presente en la cara interna de la membrana celular, la cual resulta expuesta al exterior cuando las células entran en apoptosis (204,205).

Para evaluar la muerte celular en neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv mediada por IgG, se extrajeron neutrófilos de los 10 donantes con los cuales se realizaron también se llevaron a cabo los ensayos de co-cultivo. Los PMNs fueron puestos en contacto con la micobacteria pretratada con cada uno de los Acs que reconocieron secuencias nativas y modificadas por separado, de manera que se establecieron unidades experimentales independientes. No obstante, para dos de los donantes no fue posible recuperar los neutrófilos suficientes para la lectura por citometría después de la infección con la micobacteria a pesar de que se realizó el procedimiento en varias ocasiones.

Para cada donante hubo un control específico de infección con la micobacteria sin previo contacto con los Acs, el cual fue marcado con IP y AV para evidenciar los porcentajes de necrosis y apoptosis presentados en condiciones normales de infección, y a partir de éstos establecer, sí el anticuerpo con el que fue preincubada la micobacteria aumenta o disminuye los porcentajes de necrosis y apoptosis en los neutrófilos de cada donante. Estos resultados también se analizaron por microscopía para evidenciar morfológicamente los cambios generados a partir de los tratamientos a los que fueron expuestos los neutrófilos. En la figura 28, se ve la forma

convencional de los neutrófilos previa infección con *Mtb* H37Rv, con citoplasma y núcleo multilobulado que lucen sin ninguna alteración, mientras que, tras la infección se observa que se induce muerte necrótica después de la incubación en condiciones normales de infección con *Mtb* H37Rv. También se presentan PMNs en apoptosis obtenidos después de infectarlos con *Mtb* preincubada con Acs que reconocen péptidos como el 40404; en donde se aprecia la pérdida del núcleo la multilobulado característico de los neutrófilos, la disminución del tamaño celular y la formación de cuerpos apoptóticos. También, se evidenció lo que parece ser NETosis en tratamientos con algunos Acs que reconocen péptidos entre los que se encuentran el 37780, observándose en las células prolongaciones, que según se ha reportado corresponden a cromatina descondensada que produce estructuras en forma de red compuestas de ADN, histonas y proteínas granulares (206). La NETosis se ha documentado en las infecciones con *Mtb* en donde se ha descrito su función en la inmunomodulación de las NETs (del inglés, *Neutrophil Extracellular Traps*), al mediar inmunidad protectora mediante la activación de macrófagos; además las NETs y las proteínas que se derivan de éstas, influyen en la regulación inmunitaria y en prevenir la autoinmunidad (206).

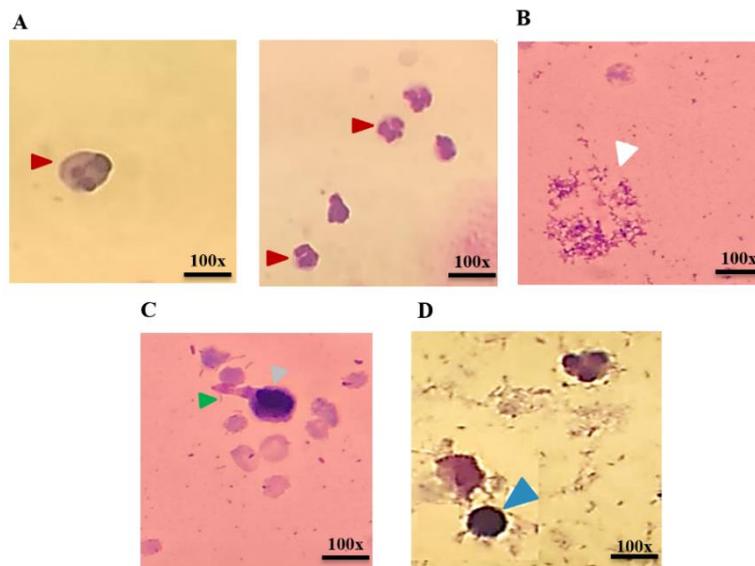


Figura 28. PMNs post infección de *Mtb* pretratada con los Acs que reconocen péptidos nativos y modificados. **A** Neutrófilo en condiciones normales a las 0 horas de incubación, con citoplasma rosado y núcleo multilobulado. **B** Morfología necrótica en células después de 24 horas de incubación en condiciones normales de infección con *Mtb* H37Rv; se observa la liberación de los componentes intracelulares al exterior. **C** Neutrófilos apoptóticos obtenidos después de 24 horas de incubación con *Mtb* H37Rv pretratada con anticuerpos que reconocen péptidos. **D** NETosis en células tratadas con los Acs que reconocen los péptidos evaluados. Las flechas rojas indican a los neutrófilos viables, mientras que las flechas blancas muestran neutrófilos en necrosis, en gris cuerpos apoptóticos característicos de la apoptosis y en verde a *Mtb*-GFP.

Tabla 9. Resultados de necrosis y apoptosis en neutrófilos humanos. Para cada donante se consigna el porcentaje correspondiente a la muerte necrótica y apoptótica obtenido en el control de infección y los porcentajes relacionados con cada anticuerpo utilizado. En azul se presentan los resultados en los que hubo una disminución del porcentaje de necrosis frente al control y en rosado en los que se generó un aumento en el porcentaje de apoptosis en comparación al control de infección. Los resultados de la prueba *t*-student, están representados por los asteriscos en cada resultado $p \leq 0,05$, $** \leq 0,01$ y $*** \leq 0,001$.

PROTEÍNA	AC	DONANTE															
		3		4		5		6		9		11		13		16	
		NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP
		Ctrl (28,1)	Ctrl (3,9)	Ctrl (10,5)	Ctrl (1,5)	Ctrl (8,5)	Ctrl (23,7)	Ctrl (11,7)	Ctrl (7,6)	Ctrl (18,3)	Ctrl (3,8)	Ctrl (2,5)	Ctrl (1,32)	Ctrl (8,7)	Ctrl (6,4)	Ctrl (13,7)	Ctrl (2,3)
Rv0227c	16951	17,5**	9,9**	1,1***	2,9***	4,3**	11,6	10,3***	24,6***	47,3	17,8***	2,8	10,6***	31,4	0,94	3,4***	7,5***
	40396	30,1	19,5***	1,8***	1,31	5,1**	14,5	17,1	16,4***	13,2***	5,0*	1,3***	9,7**	6,7*	0,3	6,4***	13,2***
Rv1268c	37964	3,4***	11,9**	29,5	13,3**	3,8*	20,2	18,0	13,7	1,9***	31,7***	2,8	13,4***	6,9*	1,3	3,6**	3,7**
	37096	12,2*	7,8*	1,5**	2,1**	3,7***	49,5**	8,7*	6,2	2,9**	7,5*	5,7	10,4***	14,3	2,8	24,5	3,3
Rv1411c	40400	10,7**	8,3**	3,6**	4,0**	3,2**	57,8***	8,7*	19,6***	5**	46,5***	1,7*	28,6***	3,0**	3,1	3,9***	6,5***
	11024	37,8	15,8***	1,2***	5,0**	3,1**	28,4*	13,1	27,0*	21,5	15,9***	4,0	29,0**	18,9	0,3	4,7***	7,3***
Rv2560	40404	15,3***	17,1***	2,2***	2,5**	4,2*	14,4	17,7	14,3	14,4***	21,2***	36,1	32,4***	34,6	1,3	1,7***	10,0***
	16295	36,7	6,0*	1,9***	13,8**	6,8*	18,5	18,8	24,5**	5,7**	4,3	27,4	16,2***	21,5	1,2	2,4***	17,3***
Rv3166c	40408	40,5	19,3***	2,3**	1,9**	5,2**	19,0	7,4**	22,0**	4,7**	17,2**	10,1	30,4***	16,6	1,7	4,0**	3,9**
	16298	25,2*	11,3***	13,3	3,5***	2,3**	15,2	4,9**	18,9	4,8**	10,3**	9,6	20,3***	9,4	1,1	2,8***	2,08
Rv0180c	40410	45,6	6,8*	16,3	2,3**	2,7**	10,8	6,9*	14,6**	1,7***	2,8*	1,7**	16,2***	16,2	0,9	1,3***	8,0***
	16300	14,8**	47,7***	0,3***	2,0*	3,3***	23,7	13,3	18,1**	8,6**	13***	2,3**	16,0***	7,9	2,5	5,4***	6,3***
Rv2270	40412	5**	11,9**	1,6***	5,0***	4,9***	28,3**	7,7*	9,68**	16,3	10,4***	1,2**	8,2*	1,5**	0,6	0,6***	2,7*
	31024	14,1***	6,2*	0,8***	2,3*	10,5	39,6**	15,6	21,2**	12,2**	2,03*	1,6*	12,5***	4,9**	2,1	1,9***	2,1
Rv1911c	40416	15,9***	4,7*	1,7***	4,0***	2,9*	33,4**	7,6***	30,8**	22,55	50,4***	2,4	0,9	8,7	1,5	21,2	5,1**
	31025	12,5***	3,4	1,2***	2,6*	1,2***	22,3	6,3***	25,1*	9,5***	20,2***	2,1*	7,1*	7,1*	3,2	1,3***	4,2**
Rv2004c	40418	21,1***	1,8	0,5***	1,9*	6**	38,8***	5,***	12,1**	10,6**	17,0***	2,8	14,3**	36,7	2,2	3,8***	9,5***
	31039	42,5	2,3	2,4***	5,2***	3,0***	15,6	16,3	11,8**	9,0***	32,5***	2,0	9,5***	20,3	2,3	4,2***	6,6***
Rv3494c	40422	29,7	18,8***	1,3***	3,9**	8,74	15,5	23,4	16,4**	7,9**	3,6	3,3	7,4**	4,6*	0,9	3,4***	9,7***
	40428	10,5*	8,8*	22,6	5,7***	6,1*	31,0**	6,8**	14,4**	10,8***	9,0**	1,6*	17,4***	4,3**	0,5	1,6***	7,3***
Rv0679c	40430	43,6	19,1***	21,0	8,0**	16,5	22,8	11,3	13,95	3,2***	48,4***	3,2	13,4***	3,3**	0,7	1,3***	5,5*
	37780	57,5	5,0	3,1***	11,8***	13,0	20,8	2,9**	18,3*	3,9***	16,2***	0,8*	17,7***	26,9	1,1	1,3***	2,1
Rv1911c	40432	41,0	2,5	0,8***	2,3**	6,3**	21,8	16,3	12,0**	13,6**	9,5	32,6**	2,4**	0,9	6,4***	11,4***	6,6***
	37765	48,6	2,5	1,3***	2,3***	7,7*	15,5	7,4***	42,5**	2,4***	15,5**	1,1**	8,0***	7,2*	1,9	9,3***	2,3
Rv1911c	40436	21,2***	4,6	0,5***	1,0	14,3	13,7	28,5	6,78	9,4**	0,25**	2,2	18,4***	22,3	0,7	4,7***	5,7**
	37767	22,8***	8,2**	0,7***	1,8*	4,9**	31,0*	15,5	20,1*	6,6***	7,5*	0,8***	6,0*	15,0	2,3	64,1	23,1***
Rv2004c	9111	25,3***	6,3*	0,4***	1,1	5,0***	25,8*	7,5**	20,4*	14,1***	17,5**	1,2*	6,7***	10,4	6,2	1,3***	26,4***
	40440	33,4	2,3	0,5***	0,5	7,7**	32,2***	9,6**	7,53	14,1***	4,3	1,8	20,7**	9,0	2,5	13,7	5,4**
Rv3494c	38373	24,6***	3,2	16,1	2,5	8,8	29,6**	8,3**	18,3**	17,3***	50,7***	1,1***	30,2***	2,8**	4,8	4,5**	4,8*
	40448	29,35	4,7	0,3***	1,3	23,5	19,3	14,9	18,4***	24,8	34,2***	3,4	24,4***	15,8	1,7	1,3***	10,5*
Rv0679c	30987	23,2***	40,0**	22,2	6,8**	7,1*	10,3	7,3*	4,39	6,0***	32,5**	0,9***	2,2*	4,1**	1,3	8,3**	6,78***
	40450	19,6***	17,5***	2,9***	0,8	4,7*	41,1***	8,4**	23,0***	27,3	17,1*	2,6	1,1	11,9	3,7	5,0***	8,0***

El resumen de los resultados obtenidos por citometría para la muerte apoptótica y necrótica de los neutrófilos se consignó en la tabla 9, a partir de los cuales se evidencia la función efectora que presentan los anticuerpos estudiados, al unirse a las micobacterias e interactuar con neutrófilos humanos, promoviendo la muerte celular apoptótica y así mismo, reduciendo la muerte por necrosis que se genera en las condiciones normales de infección. Se evidencia la capacidad que presentan los anticuerpos IgG que reconocen péptidos nativos y modificados, para regular los fenómenos de apoptosis y necrosis (tabla 10). Los datos muestran que el 52,9% de los anticuerpos péptido-específicos incluidos en este estudio, incrementan el porcentaje de apoptosis en un 75% de la población; adicionalmente, se vio que el 35,28% de los anticuerpos disminuyen el porcentaje de necrosis en el 75% de los donantes. Los anticuerpos específicos de los péptidos 40400 y 40412 disminuyen significativamente el porcentaje de necrosis en el 100% de los donantes y simultáneamente, aumentan el porcentaje de apoptosis en el 87,5% de la población, sin presentarse predominio alguno entre los resultados relacionados con las secuencias peptídicas nativas o modificadas (tabla 10).

Tabla 10. Correlación resultados de los Acs que reconocen péptidos nativos, modificados y su efecto en la muerte celular de neutrófilos humanos. Los datos en la tabla hacen referencia al porcentaje de anticuerpos

contra cada péptido, que reducen la necrosis y que aumentan la apoptosis en los neutrófilos provenientes de los donantes evaluados en el estudio. Se muestra la reducción de la necrosis (azul) y el aumento de apoptosis (rosado).

AC	Porcentaje	
	Reducción de necrosis	Aumento de Apoptosis
16951	63	75
40396	75	63
37964	63	75
37096	63	75
40400	100	88
11024	38	88
40404	50	75
16295	50	75
40408	63	75
16298	63	63
40410	63	63
16300	88	75
40412	100	88
31024	75	75
40416	63	75
31025	100	63
40418	75	75
31039	63	63
40422	50	63
40428	88	88
40430	50	75
37780	75	63
40432	63	63
37765	88	50
40436	63	38
37767	63	88
9111	88	75
40440	63	50
38373	75	88
40448	25	63
30987	88	63
40450	63	38
Promedio	68	70

En la infección por *Mtb* los neutrófilos juegan un papel fundamental ya que están entre los primeros en responder al patógeno; la micobacteria es capaz de inducir necrosis en los neutrófilos como mecanismo de evasión de la respuesta inmune. Se ha reportado que esta capacidad es a expensas de la producción de ROS extracelular; además de la liberación de los componentes

internos de los neutrófilos al exterior, los cuales funcionan como alarmas atrayendo y activando a más células de la inmunidad. La acumulación de la población necrótica resultante en el tejido, desencadena una serie de reacciones desfavorables que conducen a una inflamación crónica en la zona afectada siendo en la mayoría de los casos la fuente de los síntomas y la gravedad de la infección (67,207). Así, la interacción directa entre *Mtb* y los neutrófilos sin mediadores es, por tanto, poco beneficiosa durante el transcurso de la infección, en la tabla 9 se evidencia este fenómeno donde los controles de neutrófilos infectados con la micobacteria sin ningún tipo de tratamiento presentaron un mayor porcentaje de necrosis que apoptosis, para la mayoría de los donantes tal como ha sido descrito anteriormente (67,207). De manera que, contar con Acs que reconozcan a los péptidos evaluados y que tengan la capacidad de reducir la muerte necrótica en los neutrófilos infectados podría contribuir a un mejor control en la infección por este patógeno. Además, reducir el porcentaje de necrosis que se obtiene en un proceso de infección normal, es un nuevo acercamiento a la descripción de la función efectora de los anticuerpos en poblaciones celulares que hacen parte de la respuesta inmune contra *Mtb*.

La apoptosis de neutrófilos establece un mejor panorama durante el control y la resolución de la patología, ya que minimiza la afectación de los tejidos al liberarse controladamente los componentes celulares al exterior como no sucede en la necrosis. Al tiempo que, puede llegar a propiciar la esferocitosis, a través de la cual los macrófagos son capaces de fagocitar cuerpos apoptóticos de neutrófilos infectados, contribuyendo a la presentación antigénica para inducir respuestas inmunes específicas más eficientes, relacionadas, por ejemplo, con la activación de linfocitos que induzcan el control de la micobacteria intracelular en macrófagos infectados y así, se apoye al control de la enfermedad (208–210). De ahí que, el aumento observado en la muerte apoptótica a razón de los Acs evaluados, es muy interesante pues se visualiza un panorama en donde se puede favorecer la resolución de la infección sin las consecuencias fisiológicas lesivas que se han reportado por la muerte necrótica.

Considerando que, el reconocimiento de la fracción Fc de anticuerpos IgG que están presentes en inmunocomplejos insolubles puede desencadenar en neutrófilos un proceso apoptótico, sería importante identificar ACs específicos contra *Mtb* que durante la infección generen inmunocomplejos insolubles, dado que, se reporta que promueven la apoptosis de neutrófilos a través de la vía de señalización intracelular PI3K β / δ -Cdc42-Pak-Mek- Erk (211–214). En el presente trabajo no se planteó estudiar esta vía, sin embargo, considerando los resultados obtenidos, dicha reacción puede estar induciendo en los neutrófilos de los donantes estudiados como se muestra en la tabla 9, en donde se evidenciaron Acs con capacidad de inducir la apoptosis en esta población celular.

La variabilidad de los resultados obtenidos en los neutrófilos de cada donante pudo ser debida a que se ha visto que la Fc de anticuerpos IgG presenta diferentes características estructurales, como las glicosilaciones de las cuales se han descrito una amplia diversidad, resultante en que los Acs presenten diferentes funciones efectoras (215,216). Existen 4 subclases de IgG que en el presente trabajo no se evaluaron y se sabe que éstas pueden tener disímiles funciones, por lo cual, para futuros proyectos sería importante evaluarlas, con el fin de conocer más acerca de la respuesta inmune humoral *in vitro* que puedan inducir los péptidos estudiados.

Finalmente, de acuerdo con los resultados observados, se destacan los péptidos 16298, 16300, 40410, 40400, 40416, 37780, 9111 y 30987 y los Acs específicos dirigidos contra

dichas secuencias, por su capacidad de inhibir la entrada de la micobacteria a macrófagos y además reducir el porcentaje de necrosis en neutrófilos que se genera en condiciones normales de infección y aumentar el porcentaje de apoptosis en la mayoría de la población estudiada. Resultados que aportan información acerca de la importancia que podrían tener los péptidos mencionados para formar parte de una vacuna contra la TB, con posibilidad de conferir al hospedero una respuesta protectora a través de la inmunidad humoral frente a *Mtb*, que genere un mejor panorama contra el desarrollo de la infección.

8. RESUMEN GRÁFICO

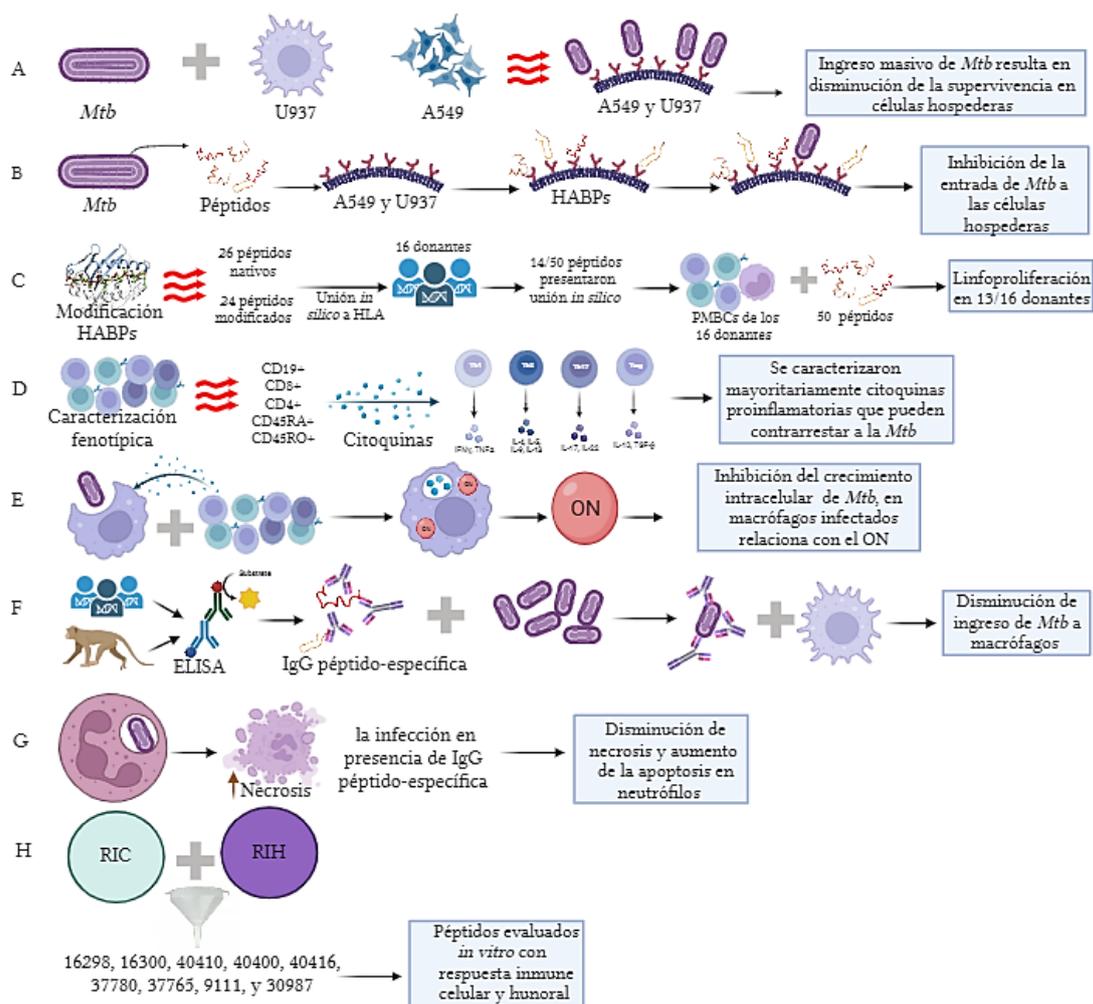


Figura 29. Metodología *in vitro* para la evaluación de antígenos peptídicos candidatos a vacuna contra tuberculosis. A En un escenario de infección natural, gracias a los múltiples receptores presentes en las células hospederas y a los ligandos en la micobacteria, esta puede ingresar a las células para usarlas como reservorio disminuyendo su supervivencia. B La metodología empleada buscó identificar proteínas en la superficie de la envoltura del patógeno usadas como ligando por la micobacteria, a partir de las cuales se derivaron péptidos sintéticos con alta capacidad de unión específica a los receptores presentes en células hospederas A549 y U937 y que además tenían la capacidad de inhibir la entrada de la micobacteria a dichas células, para este proyecto se encontraron 2 nuevos candidatos: los péptidos 39265 y 39266 de la proteína Rv3587c, que se sumaron a las proteínas anteriormente descritas tales como Rv0180c, Rv0227c, Rv0354c, Rv0679c, Rv1268c, Rv1411c, Rv1490, Rv1510c, Rv1911c, Rv1980c, Rv2004c, Rv2270, Rv2301, Rv2536, Rv2560, Rv2707, Rv2969c, Rv3166c, Rv3481c, Rv3494c, Rv3623, Rv3629c, Rv3630, Rv3705c, Rv3763, Rv3804c y Rv3910. C Posteriormente, a los péptidos nativos de las proteínas resultantes se les realizaron modificaciones estructurales con el propósito de volverlos más antígenicos, buscando que encajaran mejor en los bolsillos del HLA, así para el estudio se contó con 26 secuencias nativas y 24 modificadas, a las cuales se les evaluó la unión *in silico* con los alelos del HLA mas frecuentes de la población mundial, en donde se evidenció que aunque hubo predicción para ~ 50% de los péptidos, se cubrían a varios de los alelos, siendo dominantes los péptidos modificados, en este sentido también se evaluó la unión con los alelos de los 16 individuos reclutados para el estudio, en donde los resultados de unión se dieron para ~ 40% de las secuencias y considerando los márgenes de unión que no son predichos

in silico, se procedió a utilizar todos los péptidos tanto nativos como modificados como estímulos antigénicos para la linfoproliferaciones, observándose que en 3 de las muestras provenientes de los 16 donantes no hubo respuesta a los estímulos y que en general en los donantes repondedores tanto los péptidos nativos como los modificados indujeron expansión clonal, predominando los primeros con un 48% vs 39% de los modificados. D La estimulación antigénica por parte de los péptidos nativos y modificados llevó a la proliferación de linfocitos con poblaciones mayoritariamente de los perfiles Th1 y Th17, productores de citoquinas proinflamatorias, conocidas por su contribución para controlar el desarrollo de la enfermedad producida por *Mtb*. Se describieron citoquinas tales como IFN- γ una de las principales coordinadoras de la respuesta inmune proinflamatoria para contrarrestar al patógeno, además de encontrarse niveles significativos de TNF- γ , fundamental para la defensa del hospedero en infecciones micobacterianas, así como IL-6, que también puede contribuir en la respuesta inmune frente a *Mtb*. La IL-10 fue inducida por los péptidos en menor proporción, lo cual es beneficioso en las etapas iniciales de la infección en donde primero debe controlarse la micobacteria y posteriormente producirse la homeostasis con el fin de no afectar el tejido. En el caso de *Mtb*, que tiende a inducir una respuesta inmunosupresora para auto favorecerse lo que le facilita infectar más células hospederas y con esto el desarrollo de la enfermedad, por tanto, contar con péptidos que induzcan el control de citoquinas inmunosupresoras puede contribuir en la respuesta inmune frente a la enfermedad. E a continuación, para evaluar la función efectora de los linfocitos estimulados por los péptidos, se realizaron co-cultivos entre estas células y macrófagos infectados, para lo cual se usaron muestras de 10 donantes, dado que en 3 no se evidenció proliferación y los otros 3 no pudieron continuar el estudio. Se registraron mayores porcentajes de inhibición inducida por linfocitos estimulados con péptidos nativos vs modificados, resultados que están en consonancia con lo evidenciado en las linfoproliferaciones, en donde las secuencias nativas son en principio aquellas que estarían presentes en la superficie del patógeno, propiciándose la oportunidad de ser reconocidas por el sistema inmune de los donantes por el contacto previo con micobacterias y así producir linfocitos reactivos; en consecuencia, se subraya que los péptidos modificados indujeran inhibición, ya que estos no han sido expuestos naturalmente a los donantes, así que los presentes resultados de inhibición podrían indicar que en un escenario de vacunación, estas secuencias también activen linfocitos con capacidad efectora de dirigir la muerte intracelular de *Mtb* en macrófagos infectados. Únicamente los péptidos de la proteína Rv0227 no indujeron inhibición, lo cual se relacionó con sus bajos IPs, al tiempo que, entre las proteínas donde se observaron los péptidos que indujeron inhibición en más donantes se encuentran, mencionadas en orden ascendente por su efecto inhibitorio, Rv1911c, Rv3494c, Rv1411c, Rv2207, Rv3166c, Rv0180, Rv2270, Rv2004c, Rv0587c, Rv2301, Rv1980c y Rv0679c. En los sobrenadantes de los co-cultivos en donde hubo inhibición intracelular de la micobacteria, se evidenció la presencia de ON en mayor proporción con respecto a los co-cultivos en los que no se observó tal fenómeno de inhibición, lo que planteó una relación positiva entre la producción de la molécula y el efecto observado sobre el patógeno. En este sentido, la molécula podría ser uno de los mecanismos microbicidas usados por los macrófagos para eliminar el patógeno intracelular una vez son activados por los linfocitos estimulados con los péptidos. F En la evaluación de la respuesta inmune humoral se observó primero el reconocimiento antigénico hacia las secuencias por parte de los donantes. Todos reconocieron péptidos derivados de las proteínas presentes en la envoltura del patógeno lo cual implica previo contacto con micobacterias y no se presentaron diferencias en el reconocimiento entre donantes PPD/QTF positivos o negativos. Después se determinó si los anticuerpos que reconocieron mediante ELISA a los péptidos derivados de la micobacteria tenían la capacidad de inhibir la entrada del patógeno a células hospederas lo cual ratificó el papel de las secuencias peptídicas en la interacción entre el patógeno y las células diana. Más adelante se obtuvieron inmunoglobulinas de tipo G dirigidas contra secuencias peptídicas y se observó que presentan función efectora neutralizante frente a *Mtb* en macrófagos U937. Los péptidos modificados tuvieron la capacidad de conferir protección en un modelo animal de primate no humano, en el cual se observó que, tras la inoculación con secuencias modificadas, los sueros de los animales reconocieron a las secuencias nativas y que estos mismos sueros inhibieron la entrada de la micobacteria a las células hospederas *in vitro*. G Las IgGs péptido-específicas que se pusieron en contacto con la micobacteria previa infección, son capaces de promover la apoptosis y disminuir la necrosis en los

neutrófilos, siendo esta última el curso predominante de la infección natural, lo cual conlleva a promover una patología más lesiva en el hospedero. H De todos los péptidos evaluados por la metodología propuesta se destacan los péptidos 16298, 16300, 40410 (Rv3166c); 40400 (Rv1411c); 40416 (Rv0180c); 37780 (Rv2270); 37765 (Rv1911c); 9111 (Rv2004c) y 30987 (Rv3494c) porque, inhiben la entrada de la micobacteria a células blanco de infección, estimulan proliferación celular de linfocitos que activan macrófagos bactericidas que eliminan *Mtb* intracelular, los Acs que los reconocen neutralizan al patógeno extracelularmente, así mismo tienen la capacidad de disminuir la necrosis y aumentar la apoptosis en neutrófilos infectados, características evaluadas en el presente estudio, que podrían conferir protección frente a *Mtb*. RIC-respuesta inmune celular, RIH-respuesta inmune humoral. Diagrama recreado con Biorender.com

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El desarrollo de este trabajo permitió evidenciar que los péptidos evaluados tienen la capacidad de inducir respuesta inmune *in vitro*, considerando los resultados de la metodología empleada.

En primer lugar, se identificaron secuencias de alta actividad de unión con capacidad de inhibir el ingreso de *Mtb* a macrófagos U937 y células epiteliales A549, que posteriormente se modificaron, paso importante en la generación de antígenos que podrían inducir una respuesta inmune frente al patógeno.

En el estudio se utilizó un solo modelo de péptido modificado por cada nativo teniendo en cuenta la gran cantidad de secuencias evaluadas, no obstante, en nuevos análisis, con un número más restringido de péptidos nativos, sería conveniente conformar un banco de varias secuencias modificadas originarias de una secuencia nativa, con el fin de establecer de forma más amplia las respuestas inmunes que se pueden mejorar con los péptidos modificados, ya que hubo casos en donde se observó este efecto positivo debido a las modificaciones realizadas.

Si bien, la unión *in silico* de los péptidos con los alelos del HLA es una herramienta útil y validada por diversos autores para muchos patógenos, de acuerdo con los resultados de la investigación, en donde se utilizaron proteínas de *Mtb*, no debe ser criterio de exclusión para los candidatos peptídicos, pues estos indujeron proliferación celular en las muestras provenientes de los donantes evaluados lo que muestra que si hubo activación por parte de las secuencias.

Respecto a la expansión clonal inducida por los péptidos, se evidenció que esta es una herramienta muy útil para la selección de candidatos, dado que las poblaciones celulares encontradas, mostraron capacidad para activar macrófagos microbicidas, que sin la intervención de los linfocitos suelen ser usados como reservorios por el patógeno lo cual contribuye al desarrollo de la enfermedad.

Los péptidos estimularon linfocitos que activan a macrófagos, para que se elimine la micobacteria intracelular a través de la producción de citoquinas como IFN- γ TNF- α entre otras, que inducen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como el ON, lo cual contribuye a la defensa del hospedero.

En la aproximación metodológica realizada para los co-cultivos, fue posible apreciar que las poblaciones descritas de linfocitos estimularon a través de citoquinas, a los macrófagos para que eliminaran la micobacteria intracelular, este estudio se podría complementar con la depleción selectiva de dichas poblaciones celulares, en donde se esperaría la abrogación o disminución del efecto evidenciado en los macrófagos.

La población reclutada permitió establecer que los péptidos estimularon la respuesta inmune, se plantea incrementar el número de individuos incluidos para fortalecer estadísticamente los resultados encontrados. No obstante, reclutar en esta investigación a individuos que, según los resultados obtenidos, parecen haber estado expuestos a antígenos micobacterianos, es una aproximación que permite vislumbrar en un posible escenario de vacunación, la respuesta de las personas, la cual parece ser favorable frente a los antígenos peptídicos, teniendo en cuenta que más adelante tendrán que hacerse ensayos *in vivo*.

Referente a la inmunidad humoral inducida por los péptidos, usar primates no humanos, permitió evidenciar que las secuencias peptídicas indujeron anticuerpos con la capacidad de neutralizar el ingreso de la micobacteria a las células hospederas, lo cual se ha reportado que beneficia al

sistema inmune para evitar el desarrollo de la infección, ya que macrófagos y otras células pueden eliminar más eficientemente los inmunocomplejos formados.

De la misma forma, en sueros humanos que reconocen a los péptidos evaluados se observó la capacidad de este para inhibir el ingreso del patógeno a líneas celulares, y tras aislar los Acs específicos se confirmó esta función efectora por parte de las inmunoglobulinas obtenidas, lo que podría indicar, que de haber un mayor estímulo de linfocitos a través de una vacunación, sería posible incrementar el efecto observado el cual está ligado con la protección frente a la micobacteria. Lo anterior se apoya también en los resultados con los primates no humanos.

Aunque los ensayos de inhibición de la entrada de *Mtb* se hicieron con macrófagos U937, debido a la disponibilidad de muestras sanguíneas, en futuros estudios se sugiere utilizar macrófagos derivados de PBMCs si es posible, con el propósito de evidenciar si el comportamiento de los anticuerpos con células de línea primaria se conserva o tendría alguna variación.

Los Acs extraídos de los sueros humanos permitieron evidenciar que a diferencia de una infección natural en donde los neutrófilos mueren por necrosis cuando fagocitan la micobacteria promoviendo la inflamación y lesión al tejido, la ayuda proporcionada por los Acs que reconocen a los péptidos evaluados, permitió disminuir significativamente las tasas de necrosis y aumentar los porcentajes de apoptosis, lo cual es mucho más conveniente para permitir un mejor curso de la infección y así contrarrestar el desarrollo de la patología.

Es muy interesante el hallazgo que indica un aumento de la apoptosis y disminución de necrosis en neutrófilos, considerando que estas células al ser una de las primeras en llegar al sitio de la infección, pueden contribuir al desarrollo o control de la enfermedad a través de su tipo de muerte. Por ello, es relevante evaluar la vía apoptótica que se desencadena en los polimorfos tras la exposición a la micobacteria pre-opsonizada relacionada con las caspasas implícitas en el proceso, así como la vía no canónica PI3K β / δ -Cdc42-Pak-Mek-Erk.

Se considera importante determinar las subclases de IgG presentes tras su aislamiento y purificación, pues se conoce que interfieren en la función efectora que puede desencadenar un anticuerpo en una población celular; además aportaría información que permita esclarecer si las subclases de IgG influyen en la variabilidad de los resultados obtenidos.

La diversidad en las glicosilaciones que puede presentarse en la Fracción Cristalizable de los anticuerpos aquí empleados debe ser estudiada, considerando que en anteriores reportes se ha logrado demostrar que el patrón de éstas, puede afectar las funciones efectoras de las inmunoglobulinas, que a su vez pudieron influir en los resultados.

De acuerdo con la metodología planteada en el presente proyecto para evaluar candidatos peptídicos que se puedan incluir en el diseño de una vacuna antibuberculosis, considerando los resultados se destacan los péptidos 16298, 16300, 40410 (Rv3166c); 40400 (Rv1411c); 40416 (Rv0180c); 37780 (Rv2270); 37765 (Rv1911c); 9111 (Rv2004c) y 30987 (Rv3494c), que además de inducir la inhibición intracelular de la *Mtb* en macrófagos o el ingreso de la misma a los fagocitos a través anticuerpos, también disminuyen la necrosis aumentando simultáneamente la apoptosis en neutrófilos, cumpliendo con las características evaluadas en el presente estudio que podrían conferir protección frente a *Mtb*.

Finalmente, este trabajo de grado es relevante porque se encontraron antígenos peptídicos que indujeron respuestas inmunes, la cual se puede seguir estudiando con otros análisis que aporten

nuevos hallazgos, pues si bien se destacaron los péptidos anteriormente mencionados, no se descarta los demás que podrían ser modificados para determinar si construyen a los elementos evaluados en el proyecto, ya que siendo la respuesta inmune tan extensa se delimitaron ciertos elementos muy destacados en la literatura que parecen proteger contra el patógeno, y que de esta forma contribuir con la selección de candidatos.

10. PUBLICACIONES

La revisión de literatura acerca de la inmunología frente a la TB, titulada “*Clinical manifestations associated to immune response in tuberculosis*” fue publicada en la revista *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, en el año 2023 con factor de Impacto de 4.12, Q2.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-023-03636-x>

Los resultados del primer objetivo correspondientes a identificar péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv involucrados en la interacción hospedero-patógeno se publicaron en el artículo titulado “*Towards designing a synthetic antituberculosis vaccine: The Rv3587c peptide inhibits mycobacterial entry to host cells*” en la revista *Bioorganic & Medicinal Chemistry* en el año 2018, con factor de impacto de 3,64, Q1.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089617324872>

Con los resultados de los objetivos dos y tres, los cuales involucraron la presentación antigénica de péptidos a linfocitos y determinar la función efectora de éstos en macrófagos infectados por la micobacteria, se sometió el artículo titulado “*Synthetic peptides derived from six Mycobacterium tuberculosis proteins as potential vaccine candidates*” a la revista *Journal of Cell Science*, con factor de Impacto de 5,235, Q1 para el 2022.

Resultados del objetivo cuarto, en donde se evalúa la función efectora de los anticuerpos que reconocen péptidos: se publicó el artículo titulado “*Antibodies targeting Mycobacterium tuberculosis peptides inhibit mycobacterial entry to infection target cells*”. En la revista *International Journal of Biological Macromolecules* (161) 712-720. 2020 con factor de impacto de 6.953.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020334504>

Y se está preparando el artículo titulado “*Antibodies directed to protein-derived peptides present in Mycobacterium tuberculosis reduce necrosis and induce apoptosis in human infected neutrophils*”:

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Global Tuberculosis Report 2022 [Internet]. [citado 30 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>
2. Moliva JI, Turner J, Torrelles JB. Prospects in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette et Guérin (BCG) Vaccine Diversity and Delivery: Why does BCG fail to protect against Tuberculosis? *Vaccine*. 22 de septiembre de 2015;33(39):5035-41.
3. Forero M, Puentes A, Cortés J, Castillo F, Vera R, Rodríguez LE, et al. Identifying putative *Mycobacterium tuberculosis* Rv2004c protein sequences that bind specifically to U937 macrophages and A549 epithelial cells. *Protein Sci Publ Protein Soc*. noviembre de 2005;14(11):2767-80.
4. Vera-Bravo R, Torres E, Valbuena JJ, Ocampo M, Rodríguez LE, Puentes A, et al. Characterising *Mycobacterium tuberculosis* Rv1510c protein and determining its sequences that specifically bind to two target cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 8 de julio de 2005;332(3):771-81.
5. Chapeton-Montes JA, Plaza DF, Curtidor H, Forero M, Vanegas M, Patarroyo ME, et al. Characterizing the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2707 protein and determining its sequences which specifically bind to two human cell lines. *Protein Sci Publ Protein Soc*. febrero de 2008;17(2):342-51.
6. Plaza DF, Curtidor H, Patarroyo MA, Chapeton-Montes JA, Reyes C, Barreto J, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* membrane protein Rv2560--biochemical and functional studies. *FEBS J*. diciembre de 2007;274(24):6352-64.
7. Cáceres SM, Ocampo M, Arévalo-Pinzón G, Jimenez RA, Patarroyo ME, Patarroyo MA. The *Mycobacterium tuberculosis* membrane protein Rv0180c: Evaluation of peptide sequences implicated in mycobacterial invasion of two human cell lines. *Peptides*. enero de 2011;32(1):1-10.
8. Cifuentes DP, Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Forero M, Patarroyo ME, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0679c protein sequences involved in host-cell infection: potential TB vaccine candidate antigen. *BMC Microbiol*. 13 de abril de 2010;10:109.
9. Ocampo M, Aristizábal-Ramírez D, Rodríguez DM, Muñoz M, Curtidor H, Vanegas M, et al. The role of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3166c protein-derived high-activity binding peptides in inhibiting invasion of human cell lines. *Protein Eng Des Sel PEDS*. mayo de 2012;25(5):235-42.
10. Ocampo M, Rodríguez DM, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Peptides derived from *Mycobacterium tuberculosis* Rv2301 protein are involved in invasion to human epithelial cells and macrophages. *Amino Acids*. junio de 2012;42(6):2067-77.
11. Rodríguez DM, Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo ME, Patarroyo MA. *Mycobacterium tuberculosis* surface protein Rv0227c contains high activity binding peptides which inhibit cell invasion. *Peptides*. diciembre de 2012;38(2):208-16.
12. Ocampo M, Rodríguez DC, Rodríguez J, Bermúdez M, Muñoz CM, Patarroyo MA, et al. Rv1268c protein peptide inhibiting *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv entry to target cells. *Bioorg Med Chem*. 1 de noviembre de 2013;21(21):6650-6.
13. Ocampo M, Patarroyo MA, Vanegas M, Alba MP, Patarroyo ME. Functional, biochemical and 3D studies of *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides for an effective anti-tuberculosis vaccine. *Crit Rev Microbiol*. mayo de 2014;40(2):117-45.
14. Rodríguez DC, Ocampo M, Varela Y, Curtidor H, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Mce4F *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides can inhibit invasion of human cell lines. *Pathog Dis*. abril de 2015;73(3):ftu020.

15. Rodríguez DC, Ocampo M, Reyes C, Arévalo-Pinzón G, Muñoz M, Patarroyo MA, et al. Cell-Peptide Specific Interaction Can Inhibit *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Infection. *J Cell Biochem.* abril de 2016;117(4):946-58.
16. Díaz DP, Ocampo M, Varela Y, Curtidor H, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Identifying and characterising PPE7 (Rv0354c) high activity binding peptides and their role in inhibiting cell invasion. *Mol Cell Biochem.* junio de 2017;430(1-2):149-60.
17. Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Specific interaction between *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein-derived peptides and target cells inhibits mycobacterial entry in vitro. *Chem Biol Drug Des.* diciembre de 2014;84(6):626-41.
18. Sánchez-Barinas CD, Ocampo M, Vanegas M, Castañeda-Ramírez JJ, Patarroyo MA, Patarroyo ME. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv LpqG Protein Peptides Can Inhibit Mycobacterial Entry through Specific Interactions. *Mol Basel Switz.* 27 de febrero de 2018;23(3):526.
19. Rodríguez D, Vizcaíno C, Ocampo M, Curtidor H, Pinto M, Elkin Patarroyo M, et al. Peptides from the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1980c protein involved in human cell infection: insights into new synthetic subunit vaccine candidates. *Biol Chem.* 2010;391(2-3):207-17.
20. García J, Puentes A, Rodríguez L, Ocampo M, Curtidor H, Vera R, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2536 protein implicated in specific binding to human cell lines. *Protein Sci Publ Protein Soc.* septiembre de 2005;14(9):2236-45.
21. Patarroyo MA, Curtidor H, Plaza DF, Ocampo M, Reyes C, Saboya O, et al. Peptides derived from the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1490 surface protein implicated in inhibition of epithelial cell entry: potential vaccine candidates? *Vaccine.* 12 de agosto de 2008;26(34):4387-95.
22. Patarroyo MA, Plaza DF, Ocampo M, Curtidor H, Forero M, Rodríguez LE, et al. Functional characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv2969c membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 8 de agosto de 2008;372(4):935-40.
23. McShane H, Williams A. A review of preclinical animal models utilised for TB vaccine evaluation in the context of recent human efficacy data. *Tuberc Edinb Scotl.* marzo de 2014;94(2):105-10.
24. Kramnik I, Beamer G. Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. *Semin Immunopathol.* marzo de 2016;38(2):221-37.
25. Tanner R, McShane H. Replacing, reducing and refining the use of animals in tuberculosis vaccine research. *ALTEX.* 2017;34(1):157-66.
26. Kato-Maeda M, Shanley CA, Ackart D, Jarlsberg LG, Shang S, Obregon-Henao A, et al. Beijing sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* differ in pathogenicity in the guinea pig. *Clin Vaccine Immunol CVI.* agosto de 2012;19(8):1227-37.
27. Padilla-Carlin DJ, McMurray DN, Hickey AJ. The guinea pig as a model of infectious diseases. *Comp Med.* agosto de 2008;58(4):324-40.
28. Clark S, Hall Y, Williams A. Animal Models of Tuberculosis: Guinea Pigs. *Cold Spring Harb Perspect Med.* mayo de 2015;5(5):a018572.
29. Billeskov R, Tan EV, Cang M, Abalos RM, Burgos J, Pedersen BV, et al. Testing the H56 Vaccine Delivered in 4 Different Adjuvants as a BCG-Booster in a Non-Human Primate Model of Tuberculosis. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161217.
30. Flynn JL, Gideon HP, Mattila JT, Lin PL. Immunology studies in non-human primate models of tuberculosis. *Immunol Rev.* marzo de 2015;264(1):60-73.

31. Marino S, Gideon HP, Gong C, Mankad S, McCrone JT, Lin PL, et al. Computational and Empirical Studies Predict *Mycobacterium tuberculosis* -Specific T Cells as a Biomarker for Infection Outcome. PLoS Comput Biol. abril de 2016;12(4):e1004804.
32. Peña JC, Ho WZ. Non-Human Primate Models of Tuberculosis. Microbiol Spectr. agosto de 2016;4(4).
33. Poyntz HC, Stylianou E, Griffiths KL, Marsay L, Checkley AM, McShane H. Non-tuberculous mycobacteria have diverse effects on BCG efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* . Tuberc Edinb Scotl. mayo de 2014;94(3):226-37.
34. Parra M, Yang AL, Lim J, Kolibab K, Derrick S, Cadieux N, et al. Development of a murine mycobacterial growth inhibition assay for evaluating vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* . Clin Vaccine Immunol CVI. julio de 2009;16(7):1025-32.
35. Zimmermann N, Thormann V, Hu B, Köhler AB, Imai-Matsushima A, Loch C, et al. Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis* . EMBO Mol Med. noviembre de 2016;8(11):1325-39.
36. Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, et al. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. Cell. 6 de octubre de 2016;167(2):433-443.e14.
37. Jacquemin C, Schmitt N, Contin-Bordes C, Liu Y, Narayanan P, Seneschal J, et al. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. Immunity. 16 de junio de 2015;42(6):1159-70.
38. Griffiths KL, Ahmed M, Das S, Gopal R, Horne W, Connell TD, et al. Targeting dendritic cells to accelerate T-cell activation overcomes a bottleneck in tuberculosis vaccine efficacy. Nat Commun. 22 de diciembre de 2016;7:13894.
39. Bañuls AL, Sanou A, Van Anh NT, Godreuil S. *Mycobacterium tuberculosis* : ecology and evolution of a human bacterium. J Med Microbiol. noviembre de 2015;64(11):1261-9.
40. Awuh JA, Flo TH. Molecular basis of mycobacterial survival in macrophages. Cell Mol Life Sci CMLS. mayo de 2017;74(9):1625-48.
41. Goldberg MF, Saini NK, Porcelli SA. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by *Mycobacterium tuberculosis* . Microbiol Spectr. octubre de 2014;2(5).
42. Boggiano C, Eichelberg K, Ramachandra L, Shea J, Ramakrishnan L, Behar S, et al. «The Impact of *Mycobacterium tuberculosis* Immune Evasion on Protective Immunity: Implications for TB Vaccine Design» - Meeting report. Vaccine. 14 de junio de 2017;35(27):3433-40.
43. Jensen C, Lindebo Holm L, Svensson E, Aagaard C, Ruhwald M. Optimisation of a murine splenocyte mycobacterial growth inhibition assay using virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Sci Rep. 6 de junio de 2017;7(1):2830.
44. Marsay L, Matsumiya M, Tanner R, Poyntz H, Griffiths KL, Stylianou E, et al. Mycobacterial growth inhibition in murine splenocytes as a surrogate for protection against *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb). Tuberc Edinb Scotl. septiembre de 2013;93(5):551-7.
45. Tanner R, O'Shea MK, Fletcher HA, McShane H. In vitro mycobacterial growth inhibition assays: A tool for the assessment of protective immunity and evaluation of tuberculosis vaccine efficacy. Vaccine. 7 de septiembre de 2016;34(39):4656-65.
46. Patarroyo ME, Bermúdez A, Patarroyo MA. Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. Chem Rev. 11 de mayo de 2011;111(5):3459-507.

47. Patarroyo ME, Bermúdez A, Moreno-Vranich A. Towards the development of a fully protective *Plasmodium falciparum* antimalarial vaccine. *Expert Rev Vaccines*. septiembre de 2012;11(9):1057-70.
48. Tuberculosis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado 1 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis>
49. INS. Instituto Nacional de Salud. Boletín Informativo Semanal Semana Epi : 46. 2022.
50. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, Santangelo M de la P, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 1 de enero de 2013;4(1):3-66.
51. Rodríguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*. octubre de 2014;97 Suppl:S5-19.
52. van Soolingen D, van der Zanden AG, de Haas PE, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraine NA, et al. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol*. julio de 1998;36(7):1840-5.
53. Niemann S, Richter E, Dalügge-Tamm H, Schlesinger H, Graupner D, Königstein B, et al. Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. *Emerg Infect Dis*. 2000;6(5):539-42.
54. Xavier Emmanuel F, Seagar AL, Doig C, Rayner A, Claxton P, Laurenson I. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerg Infect Dis*. diciembre de 2007;13(12):1924-7.
55. Alva A, Aquino F, Gilman RH, Olivares C, Requena D, Gutiérrez AH, et al. Morphological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* in a MODS culture for an automatic diagnostics through pattern recognition. *PloS One*. 2013;8(12):e82809.
56. Kieser KJ, Rubin EJ. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol*. agosto de 2014;12(8):550-62.
57. Chiaradia L, Lefebvre C, Parra J, Marcoux J, Burlet-Schiltz O, Etienne G, et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci Rep*. 9 de octubre de 2017;7(1):12807.
58. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primer*. 27 de octubre de 2016;2:16076.
59. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. octubre de 2001;1(1):20-30.
60. Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:353-84.
61. Silva Miranda M, Breiman A, Allain S, Deknuydt F, Altare F. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:139127.
62. Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*. enero de 2006;24(1):105-17.
63. Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*. 9 de enero de 2009;136(1):37-49.

64. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 20 de abril de 2012;12(5):352-66.
65. Vandal OH, Nathan CF, Ehrt S. Acid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. agosto de 2009;191(15):4714-21.
66. Anand K, Tripathi A, Shukla K, Malhotra N, Jamithireddy AK, Jha RK, et al. *Mycobacterium tuberculosis* SufR responds to nitric oxide via its 4Fe-4S cluster and regulates Fe-S cluster biogenesis for persistence in mice. *Redox Biol*. octubre de 2021;46:102062.
67. Dallenga T, Schaible UE. Neutrophils in tuberculosis--first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? *Pathog Dis*. abril de 2016;74(3):ftw012.
68. Warren E, Teskey G, Venketaraman V. Effector Mechanisms of Neutrophils within the Innate Immune System in Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Clin Med*. 7 de febrero de 2017;6(2):15.
69. Gamberale R, Giordano M, Trevani AS, Andonegui G, Geffner JR. Modulation of human neutrophil apoptosis by immune complexes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de octubre de 1998;161(7):3666-74.
70. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 11 de noviembre de 2011;11(12):823-36.
71. Yao S, Huang D, Chen CY, Halliday L, Wang RC, Chen ZW. CD4+ T cells contain early extrapulmonary tuberculosis (TB) dissemination and rapid TB progression and sustain multi-effector functions of CD8+ T and CD3- lymphocytes: mechanisms of CD4+ T cell immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de marzo de 2014;192(5):2120-32.
72. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:581-620.
73. Green AM, Difazio R, Flynn JL. IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de enero de 2013;190(1):270-7.
74. Chin KL, Anis FZ, Sarmiento ME, Norazmi MN, Acosta A. Role of Interferons in the Development of Diagnostics, Vaccines, and Therapy for Tuberculosis. *J Immunol Res*. 2017;2017:5212910.
75. Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(2):103-11.
76. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol*. 1 de septiembre de 2014;35(9):436-42.
77. Slight SR, Rangel-Moreno J, Gopal R, Lin Y, Fallert Junecko BA, Mehra S, et al. CXCR5⁺ T helper cells mediate protective immunity against tuberculosis. *J Clin Invest*. febrero de 2013;123(2):712-26.
78. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 28 de mayo de 2010;32(5):593-604.
79. Harris J, De Haro SA, Master SS, Keane J, Roberts EA, Delgado M, et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*. septiembre de 2007;27(3):505-17.
80. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 2 de octubre de 1998;282(5386):121-5.

81. Lyadova IV, Panteleev AV. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:854507.
82. Woodworth JS, Wu Y, Behar SM. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells require perforin to kill target cells and provide protection in vivo. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de diciembre de 2008;181(12):8595-603.
83. Turner J, D'Souza CD, Pearl JE, Marietta P, Noel M, Frank AA, et al. CD8- and CD95/95L-dependent mechanisms of resistance in mice with chronic pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* febrero de 2001;24(2):203-9.
84. Paulsen M, Janssen O. Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells. *Cell Commun Signal CCS.* 8 de abril de 2011;9:7.
85. Urdahl KB, Shafiani S, Ernst JD. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunol.* mayo de 2011;4(3):288-93.
86. Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. *Clin Immunol Orlando Fla.* abril de 2007;123(1):50-9.
87. Kaufmann SHE, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. *Lancet Lond Engl.* 12 de junio de 2010;375(9731):2110-9.
88. Casadevall A. The methodology for determining the efficacy of antibody-mediated immunity. *J Immunol Methods.* agosto de 2004;291(1-2):1-10.
89. Chan J, Mehta S, Bharrhan S, Chen Y, Achkar JM, Casadevall A, et al. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Semin Immunol.* diciembre de 2014;26(6):588-600.
90. Seshadri C, Turner MT, Lewinsohn DM, Moody DB, Van Rhijn I. Lipoproteins are major targets of the polyclonal human T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 de enero de 2013;190(1):278-84.
91. James CA, Yu KKQ, Gilleron M, Prandi J, Yedulla VR, Moleda ZZ, et al. CD1b Tetramers Identify T Cells that Recognize Natural and Synthetic Diacylated Sulfoglycolipids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Chem Biol.* 19 de abril de 2018;25(4):392-402.e14.
92. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 11 de junio de 1998;393(6685):537-44.
93. WGNV. TB Vaccine Pipeline [Internet]. Working Group on New TB Vaccines. [citado 1 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://newtbvaccines.org/tb-vaccine-pipeline/>
94. Zhu B, Dockrell HM, Ottenhoff THM, Evans TG, Zhang Y. Tuberculosis vaccines: Opportunities and challenges. *Respirol Carlton Vic.* abril de 2018;23(4):359-68.
95. Restrepo-Montoya D, Vizcaíno C, Niño LF, Ocampo M, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Validating subcellular localization prediction tools with mycobacterial proteins. *BMC Bioinformatics.* 7 de mayo de 2009;10:134.
96. Vizcaíno C, Restrepo-Montoya D, Rodríguez D, Niño LF, Ocampo M, Vanegas M, et al. Computational prediction and experimental assessment of secreted/surface proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *PLoS Comput Biol.* 24 de junio de 2010;6(6):e1000824.

97. Curtidor H, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Recent advances in the development of a chemically synthesised anti-malarial vaccine. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(11):1567-81.
98. Moreno-Vranich A, Patarroyo ME. Steric-electronic effects in malarial peptides inducing sterile immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 13 de julio de 2012;423(4):857-62.
99. Patarroyo ME, Patarroyo MA, Pabón L, Curtidor H, Poloche LA. Immune protection-inducing protein structures (IMPIPS) against malaria: the weapons needed for beating Odysseus. *Vaccine.* 22 de diciembre de 2015;33(52):7525-37.
100. Rivera Z, Granados G, Pinto M, Varón D, Carvajal C, Chaves F, et al. Double dimer peptide constructs are immunogenic and protective against *Plasmodium falciparum* in the experimental Aotus monkey model. *J Pept Res Off J Am Pept Soc.* febrero de 2002;59(2):62-70.
101. Painter CA, Stern LJ. Structural Insights Into HLA-DM Mediated MHC II Peptide Exchange. *Curr Top Biochem Res.* 2011;13(2):39-55.
102. Kagnoff MF, Harwood JI, Bugawan TL, Erlich HA. Structural analysis of the HLA-DR, -DQ, and -DP alleles on the celiac disease-associated HLA-DR3 (DRw17) haplotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* agosto de 1989;86(16):6274-8.
103. Pos W, Sethi DK, Call MJ, Schulze MSED, Anders AK, Pyrdol J, et al. Crystal structure of the HLA-DM-HLA-DR1 complex defines mechanisms for rapid peptide selection. *Cell.* 21 de diciembre de 2012;151(7):1557-68.
104. Scholz EM, Marcilla M, Daura X, Arribas-Layton D, James EA, Alvarez I. Human Leukocyte Antigen (HLA)-DRB1*15:01 and HLA-DRB5*01:01 Present Complementary Peptide Repertoires. *Front Immunol.* 2017;8:984.
105. Zelmer A, Tanner R, Stylianou E, Damelang T, Morris S, Izzo A, et al. A new tool for tuberculosis vaccine screening: Ex vivo Mycobacterial Growth Inhibition Assay indicates BCG-mediated protection in a murine model of tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 12 de agosto de 2016;16:412.
106. Kolibab K, Parra M, Yang AL, Perera LP, Derrick SC, Morris SL. A practical in vitro growth inhibition assay for the evaluation of TB vaccines. *Vaccine.* 11 de diciembre de 2009;28(2):317-22.
107. Worku S, Hoft DF. In vitro measurement of protective mycobacterial immunity: antigen-specific expansion of T cells capable of inhibiting intracellular growth of bacille Calmette-Guérin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* junio de 2000;30 Suppl 3:S257-261.
108. Fletcher HA, Tanner R, Wallis RS, Meyer J, Manjaly ZR, Harris S, et al. Inhibition of mycobacterial growth in vitro following primary but not secondary vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin Vaccine Immunol CVI.* noviembre de 2013;20(11):1683-9.
109. Boratyn GM, Schäffer AA, Agarwala R, Altschul SF, Lipman DJ, Madden TL. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol Direct.* 17 de abril de 2012;7:12.
110. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 29 de septiembre de 2011;8(10):785-6.
111. Gardy JL, Laird MR, Chen F, Rey S, Walsh CJ, Ester M, et al. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinforma Oxf Engl.* 1 de marzo de 2005;21(5):617-23.
112. Rashid M, Saha S, Raghava GP. Support Vector Machine-based method for predicting subcellular localization of mycobacterial proteins using evolutionary information and motifs. *BMC Bioinformatics.* 13 de septiembre de 2007;8:337.

113. Möller S, Croning MD, Apweiler R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinforma Oxf Engl*. julio de 2001;17(7):646-53.
114. Larsen MH, Biermann K, Jacobs WR. Laboratory maintenance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Protoc Microbiol*. agosto de 2007;Chapter 10:Unit 10A.1.
115. Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. agosto de 1985;82(15):5131-5.
116. Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc*. 1 de julio de 1963;85(14):2149-54.
117. Giacò L, Amicosante M, Fraziano M, Gherardini PF, Ausiello G, Helmer-Citterich M, et al. B-Pred, a structure based B-cell epitopes prediction server. *Adv Appl Bioinforma Chem AABC*. 2012;5:11-21.
118. Provencher SW, Glöckner J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*. 6 de enero de 1981;20(1):33-7.
119. Sreerama N, Venyaminov SY, Woody RW. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci Publ Protein Soc*. febrero de 1999;8(2):370-80.
120. Sreerama N, Woody RW. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem*. 15 de febrero de 1993;209(1):32-44.
121. Johnson WC. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins*. 15 de mayo de 1999;35(3):307-12.
122. Néron S, Roy A, Dumont N. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human switched-memory B lymphocytes. *PloS One*. 2012;7(12):e51946.
123. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. *Acc Chem Res*. marzo de 2008;41(3):377-86.
124. Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. julio de 2018;154(3):394-406.
125. Quah BJC, Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *J Vis Exp JoVE*. 12 de octubre de 2010;(44):2259.
126. Hajam IA, Dar PA, Appavoo E, Kishore S, Bhanuprakash V, Ganesh K. Bacterial Ghosts of *Escherichia coli* Drive Efficient Maturation of Bovine Monocyte-Derived Dendritic Cells. *PloS One*. 2015;10(12):e0144397.
127. Persson A, Blomgran-Julinder R, Eklund D, Lundström C, Stendahl O. Induction of apoptosis in human neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on mature bacterial lipoproteins. *Microb Pathog*. septiembre de 2009;47(3):143-50.
128. González-Galarza FF, Takeshita LYC, Santos EJM, Kempson F, Maia MHT, da Silva ALS, et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res*. enero de 2015;43(Database issue):D784-788.
129. Yepes-Pérez Y, López C, Suárez CF, Patarroyo MA. Plasmodium vivax Pv12 B-cell epitopes and HLA-DRβ1*-dependent T-cell epitopes in vitro antigenicity. *PloS One*. 2018;13(9):e0203715.

- 130.Salam N, Rane S, Das R, Faulkner M, Gund R, Kandpal U, et al. T cell ageing: effects of age on development, survival & function. *Indian J Med Res.* noviembre de 2013;138(5):595-608.
- 131.Farheen S, Agrawal S, Zubair S, Agrawal A, Jamal F, Altaf I, et al. Patho-Physiology of Aging and Immune-Senescence: Possible Correlates With Comorbidity and Mortality in Middle-Aged and Old COVID-19 Patients. *Front Aging.* 2021;2:748591.
- 132.Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* abril de 2013;25(2):214-21.
- 133.Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:305-34.
- 134.ElTanbouly MA, Noelle RJ. Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. *Nat Rev Immunol.* abril de 2021;21(4):257-67.
- 135.Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Peters B, Sette A, Justesen S, et al. Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan. *PLoS Comput Biol.* 4 de julio de 2008;4(7):e1000107.
- 136.Petersson K, Håkansson M, Nilsson H, Forsberg G, Svensson LA, Liljas A, et al. Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence. *EMBO J.* 2 de julio de 2001;20(13):3306-12.
- 137.Van Kaer L. How Superantigens Bind MHC. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de octubre de 2018;201(7):1817-8.
- 138.Lan T, Chen L, Wei X. Inflammatory Cytokines in Cancer: Comprehensive Understanding and Clinical Progress in Gene Therapy. *Cells.* 8 de enero de 2021;10(1):100.
- 139.Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 26 de abril de 2018;36:411-33.
- 140.Prosnitz AR, Gruen JR, Bhandari V. 7 - The Genetics of Disorders Affecting the Premature Newborn. En: Pyeritz RE, Korf BR, Grody WW, editores. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition)* [Internet]. Academic Press; 2022 [citado 2 de diciembre de 2022]. p. 149-85. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128152362000060>
- 141.Fabri M, Stenger S, Shin DM, Yuk JM, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med.* 12 de octubre de 2011;3(104):104ra102.
- 142.Sakowski ET, Koster S, Portal Celhay C, Park HS, Shrestha E, Hetzenecker SE, et al. Ubiquilin 1 Promotes IFN- γ -Induced Xenophagy of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* julio de 2015;11(7):e1005076.
- 143.Sharma S, Sharma M, Roy S, Kumar P, Bose M. *Mycobacterium tuberculosis* induces high production of nitric oxide in coordination with production of tumour necrosis factor-alpha in patients with fresh active tuberculosis but not in MDR tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* agosto de 2004;82(4):377-82.
- 144.Roy S, Sharma S, Sharma M, Aggarwal R, Bose M. Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an in vitro correlate of innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology.* julio de 2004;112(3):471-80.
- 145.Sharma M, Sharma S, Roy S, Varma S, Bose M. Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-gamma in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(3):229-37.

146. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 8 de marzo de 2021;22(5):2719.
147. Yamashita M, Passegué E. TNF- α Coordinates Hematopoietic Stem Cell Survival and Myeloid Regeneration. *Cell Stem Cell.* 5 de septiembre de 2019;25(3):357-372.e7.
148. Fang J, Feng C, Chen W, Hou P, Liu Z, Zuo M, et al. Redressing the interactions between stem cells and immune system in tissue regeneration. *Biol Direct.* 20 de octubre de 2021;16(1):18.
149. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* junio de 1995;2(6):561-72.
150. Lin PL, Myers A, Smith L, Bigbee C, Bigbee M, Fuhrman C, et al. Tumor necrosis factor neutralization results in disseminated disease in acute and latent *Mycobacterium tuberculosis* infection with normal granuloma structure in a cynomolgus macaque model. *Arthritis Rheum.* febrero de 2010;62(2):340-50.
151. Galvis L, Sánchez ÁY, Jurado LF, Murcia MI. Tuberculosis associated with tumor necrosis factor- α antagonists, case description and analysis of reported cases in Colombia. *Biomédica.* 15 de marzo de 2018;38(1):7-16.
152. Gruss A, Contrera M, Piñeiro N, Perna A, Gambogi R, Alemán A, et al. Incidencia de tuberculosis en pacientes que reciben fármacos anti-TNF(. *Rev Médica Urug.* marzo de 2020;36(1):23-43.
153. Pooran A, Davids M, Nel A, Shoko A, Blackburn J, Dheda K. IL-4 subverts mycobacterial containment in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages. *Eur Respir J.* agosto de 2019;54(2):1802242.
154. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity.* 21 de mayo de 2019;50(5):1132-48.
155. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* abril de 2008;28(4):454-67.
156. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell.* 19 de marzo de 2010;140(6):845-58.
157. Wozniak TM, Saunders BM, Ryan AA, Britton WJ. *Mycobacterium bovis* BCG-specific Th17 cells confer partial protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in the absence of gamma interferon. *Infect Immun.* octubre de 2010;78(10):4187-94.
158. Linge I, Tsareva A, Kondratieva E, Dyatlov A, Hidalgo J, Zvartsev R, et al. Pleiotropic Effect of IL-6 Produced by B-Lymphocytes During Early Phases of Adaptive Immune Responses Against TB Infection. *Front Immunol.* 2022;13:750068.
159. Beamer GL, Flaherty DK, Assogba BD, Stromberg P, Gonzalez-Juarrero M, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-10 promotes *Mycobacterium tuberculosis* disease progression in CBA/J mice. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de octubre de 2008;181(8):5545-50.
160. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med.* marzo de 2008;14(3):109-19.
161. Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de noviembre de 1998;161(9):4652-60.

162. Teague TK, Schaefer BC, Hildeman D, Bender J, Mitchell T, Kappler JW, et al. Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling. *J Exp Med*. 20 de marzo de 2000;191(6):915-26.
163. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 11 de mayo de 2006;441(7090):231-4.
164. Martinez AN, Mehra S, Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect Dis*. 15 de abril de 2013;207(8):1253-61.
165. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. julio de 2010;40(7):1830-5.
166. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SH. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun*. noviembre de 1997;65(11):4843-9.
167. Buha I, Škodrić-Trifunović V, Adžić-Vukičević T, Ilić A, Blanka-Protić A, Stjepanovic M, et al. Relevance of TNF- α , IL-6 and IRAK1 gene expression for assessing disease severity and therapy effects in tuberculosis patients. *J Infect Dev Ctries*. 31 de mayo de 2019;13(5):419-25.
168. Ferreira CM, Barbosa AM, Barreira-Silva P, Silvestre R, Cunha C, Carvalho A, et al. Early IL-10 promotes vasculature-associated CD4⁺ T cells unable to control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JCI Insight*. 8 de noviembre de 2021;6(21):e150060.
169. Stryhn A, Pedersen LO, Holm A, Buus S (2000) Longer peptide can be accommodated in the MHC class I binding site by a protrusion mechanism. *Eur J Immunol* 30(11):3089–3099. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200011\)30:11<3089::AID-IMMU3089>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200011)30:11<3089::AID-IMMU3089>3.0.CO;2-5)
170. Ternette N, Yang H, Partridge T, Llano A, Cedeño S, Fischer R, Charles PD, Dudek NL, Mothe B, Crespo M, Fischer WM, Korber BTM, Nielsen M, Borrow P, Purcell AW, Brander C, Dorrell L, Kessler BM, Hanke T (2016) Defining the HLA class I-associated viral antigen repertoire from HIV-1-infected human cells. *Eur J Immunol* 46(1):60–69. <https://doi.org/10.1002/eji.201545890>
171. Rucevic M, Kourjian G, Boucau J, Blatnik R, Garcia Bertran W, Berberich MJ, Walker BD, Riemer AB, Le Gall S (2016) Analysis of Major Histocompatibility Complex-Bound HIV Peptides Identified from Various Cell Types Reveals Common Nested Peptides and Novel T Cell Responses. *J Virol* 90(19):8605–8620. <https://doi.org/10.1128/JVI.00599-16>
172. Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol*. enero de 2015;97(1):31-8.
173. Diedrich CR, Gideon HP, Rutledge T, Baranowski TM, Maiello P, Myers AJ, et al. CD4CD8 Double Positive T cell responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection in cynomolgus macaques. *J Med Primatol*. abril de 2019;48(2):82-9.
174. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. abril de 2002;2(4):251-62.
175. Liu Q, Sun Z, Chen L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein Cell*. agosto de 2020;11(8):549-64.
176. Snook JP, Kim C, Williams MA. TCR signal strength controls the differentiation of CD4⁺ effector and memory T cells. *Sci Immunol*. 20 de julio de 2018;3(25):eaas9103.
177. Swain AC, Borghans JAM, de Boer RJ. Effect of cellular aging on memory T-cell homeostasis. *Front Immunol*. 8 de agosto de 2022;13:947242.

- 178.Rijnink WF, Ottenhoff THM, Joosten SA. B-Cells and Antibodies as Contributors to Effector Immune Responses in Tuberculosis. *Front Immunol.* 2021;12:640168.
- 179.Marakalala MJ, Martinez FO, Plüddemann A, Gordon S. Macrophage Heterogeneity in the Immunopathogenesis of Tuberculosis. *Front Microbiol.* 2018;9:1028.
- 180.Tanner R, Hoogkamer E, Bitencourt J, White A, Boot C, Sombroek CC, et al. The in vitro direct mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) for the early evaluation of TB vaccine candidates and assessment of protective immunity: a protocol for non-human primate cells. *F1000Research.* 2021;10:257.
- 181.Mahamed D, Boulle M, Ganga Y, Mc Arthur C, Skroch S, Oom L, et al. Intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. *eLife.* 28 de enero de 2017;6:e22028.
- 182.Radloff J, Heyckendorf J, van der Merwe L, Sanchez Carballo P, Reiling N, Richter E, et al. Mycobacterium Growth Inhibition Assay of Human Alveolar Macrophages as a Correlate of Immune Protection Following *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin Vaccination. *Front Immunol.* 2018;9:1708.
- 183.Kurtz SL, Gardina PJ, Myers TG, Rydén P, Elkins KL. Whole genome profiling refines a panel of correlates to predict vaccine efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Edinb Scotl.* enero de 2020;120:101895.
- 184.Yang CS, Yuk JM, Jo EK. The Role of Nitric Oxide in Mycobacterial Infections. *Immune Netw Off J Korean Soc Immunol Biol Response Modif.* abril de 2009;9(2):46-52.
- 185.Jamaati H, Mortaz E, Pajouhi Z, Folkerts G, Movassaghi M, Moloudizargari M, et al. Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis. *Front Microbiol.* 2017;8:2008.
- 186.Rich EA, Torres M, Sada E, Finegan CK, Hamilton BD, Toossi Z. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tuber Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* 1997;78(5-6):247-55.
- 187.Kiliç G, Saris A, Ottenhoff THM, Haks MC. Host-directed therapy to combat mycobacterial infections. *Immunol Rev.* mayo de 2021;301(1):62-83.
- 188.Bolajoko EB, Arinola OG, Odaibo GN, Maiga M. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, inducible nitric oxide synthase, and 3-nitrotyrosine in drug-resistant and drug-sensitive pulmonary tuberculosis patients, Ibadan, Nigeria. *Int J Mycobacteriology.* 2020;9(2):185-9.
- 189.Rutschmann O, Toniolo C, McKinney JD. Preexisting Heterogeneity of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression Drives Differential Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Macrophages. *mBio.* 26 de octubre de 2022;13(5):e0225122.
- 190.Zhai W, Wu F, Zhang Y, Fu Y, Liu Z. The Immune Escape Mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Mol Sci.* 15 de enero de 2019;20(2):340.
- 191.Li X, Körner H, Liu X. Susceptibility to Intracellular Infections: Contributions of TNF to Immune Defense. *Front Microbiol.* 2020;11:1643.
- 192.Achkar JM, Chan J, Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev.* marzo de 2015;264(1):167-81.
- 193.Kawahara JY, Irvine EB, Alter G. A Case for Antibodies as Mechanistic Correlates of Immunity in Tuberculosis. *Front Immunol.* 2019;10:996.

194. Achkar JM, Prados-Rosales R. Updates on antibody functions in *Mycobacterium tuberculosis* infection and their relevance for developing a vaccine against tuberculosis. *Curr Opin Immunol.* agosto de 2018;53:30-7.
195. Rowley MJ, O'Connor K, Wijeyewickrema L. Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. *Biotechnol Annu Rev.* 2004;10:151-88.
196. Yang H, Kruh-Garcia NA, Dobos KM. Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future. *FEMS Immunol Med Microbiol.* diciembre de 2012;66(3):273-80.
197. Li H, Wang XX, Wang B, Fu L, Liu G, Lu Y, et al. Latently and uninfected healthcare workers exposed to TB make protective antibodies against *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 de mayo de 2017;114(19):5023-8.
198. Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol.* enero de 2018;18(1):46-61.
199. Forthal DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr.* agosto de 2014;2(4):AID-0019-2014.
200. Chen T, Blanc C, Eder AZ, Prados-Rosales R, Souza ACO, Kim RS, et al. Association of Human Antibodies to Arabinomannan With Enhanced Mycobacterial Opsonophagocytosis and Intracellular Growth Reduction. *J Infect Dis.* 15 de julio de 2016;214(2):300-10.
201. Krachler AM, Orth K. Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence.* 15 de mayo de 2013;4(4):284-94.
202. Perskvist N, Long M, Stendahl O, Zheng L. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de junio de 2002;168(12):6358-65.
203. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 1 de julio de 2016;2016(7).
204. de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *J Immunol Res.* 2016;2016:4604713.
205. Hilda JN, Das S, Tripathy SP, Hanna LE. Role of neutrophils in tuberculosis: A bird's eye view. *Innate Immun.* mayo de 2020;26(4):240-7.
206. Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, et al. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de agosto de 2006;177(3):1864-71.
207. Andersson AM, Larsson M, Stendahl O, Blomgran R. Efferocytosis of Apoptotic Neutrophils Enhances Control of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-Coinfected Macrophages in a Myeloperoxidase-Dependent Manner. *J Innate Immun.* 2020;12(3):235-47.
208. Dallenga T, Repnik U, Corleis B, Eich J, Reimer R, Griffiths GW, et al. M. tuberculosis-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. *Cell Host Microbe.* 11 de octubre de 2017;22(4):519-530.e3.
209. Yam-Puc JC, García-Marín L, Sánchez-Torres LE. [Neutrophil extracellular traps (NET), consequence of a cellular suicide]. *Gac Med Mex.* 2012;148(1):68-75.
210. Geering B, Simon HU. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* septiembre de 2011;18(9):1457-69.

- 211.Chu JY, Dransfield I, Rossi AG, Vermeren S. Non-canonical PI3K-Cdc42-Pak-Mek-Erk Signaling Promotes Immune-Complex-Induced Apoptosis in Human Neutrophils. *Cell Rep.* 4 de octubre de 2016;17(2):374-86.
- 212.Karmakar U, Chu JY, Sundaram K, Astier AL, Garside H, Hansen CG, et al. Immune complex-induced apoptosis and concurrent immune complex clearance are anti-inflammatory neutrophil functions. *Cell Death Dis.* 19 de marzo de 2021;12(4):296.
- 213.Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
- 214.Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ, Maamary J, Wang TT, Dahan R, et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* agosto de 2014;15(8):707-16.
- 215.Lu LL, Das J, Grace PS, Fortune SM, Restrepo BI, Alter G. Antibody Fc Glycosylation Discriminates Between Latent and Active Tuberculosis. *J Infect Dis.* 13 de noviembre de 2020;222(12):2093-102.
- 216.Grace PS, Dolatshahi S, Lu LL, Cain A, Palmieri F, Petrone L, et al. Antibody Subclass and Glycosylation Shift Following Effective TB Treatment. *Front Immunol.* 2021;12:679973.