



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DE RESPUESTA INMUNE
PROTECTIVA DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS
DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE
DE *Mtb* H37R_v EN UN MODELO MURINO
PARA EL DISEÑO DE UNA VACUNA CONTRA
TUBERCULOSIS**

Sara Lorena Espejo Villalobos

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Nacional de Colombia

Bogotá D.C, Colombia

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DE RESPUESTA INMUNE PROTECTIVA DE
PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE
SUPERFICIE DE *Mtb* H37Rv EN UN MODELO MURINO
PARA EL DISEÑO DE UNA VACUNA CONTRA
TUBERCULOSIS**

Sara Lorena Espejo Villalobos

Tesis presentada como requisito para optar al título de:

Magíster en Bioquímica

Directora: Marisol Ocampo Cifuentes, PhD
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC

Codirector: Carlos Arturo Guerrero Fonseca, PhD
Universidad Nacional de Colombia

Grupo de investigación:
Grupo funcional de tuberculosis – Fundación Instituto de Inmunología de Colombia

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá D.C, Colombia
2018

Dedicatoria

A mi dulce padre, creador Y Dios de mi vida, a mis padres Martha Gladys Villalobos y Nelson Javier Espejo y a mi Hermano Camilo Andrés Espejo, el motor y la fuerza de mi vida.

Agradecimientos

A Dios por encaminarme, guiarme y acompañarme en el cumplimiento de cada uno de mis sueños que están orientados hacia el cumplimiento de mi propósito y por fortalecerme para cumplir a cabalidad y con excelencia esta etapa de mi vida.

A mis padres Nelson Espejo y Gladys Villalobos quienes con desbordado amor han hecho de mis sueños sus sueños. Gracias padres por su apoyo incondicional porque jamás dejan menguar mi fe, de ustedes emanan los más sinceros actos de amor. A mi hermano Camilo Andrés porque me alienta para luchar por todo cuanto me he propuesto. A mi hermana Jennifer Lambraño por su incondicionalidad.

A mi directora de tesis y Maestra, la Dra. Marisol Ocampo quien me guio para que este trabajo fuera impecable y excelente; sus enseñanzas no solo quedaron enmarcadas en el contexto académico y profesional, sino que trascendieron en mi vida, pues me enseñó a ser una mujer fuerte y excelente.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia por permitirme ser parte de sus espacios de formación e investigación científica. A Mary Carabalí, Christian Sánchez y Alejandra Mantilla del grupo funcional de tuberculosis por su ayuda en la realización de esta investigación y especialmente a Carolina Rodríguez por su ayuda y valiosas enseñanzas.

A la universidad nacional de Colombia A la Universidad Nacional de Colombia por contribuir en esta etapa de mi formación.

RESUMEN

La tuberculosis sigue siendo una enfermedad de alto impacto en salud pública, se considera que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo transmitido por vía aérea al inhalar aerosoles de individuos con la enfermedad activa. A pesar de los grandes esfuerzos por desarrollar mejores métodos de prevención, diagnóstico, profilaxis y tratamiento de la tuberculosis, hasta ahora no se cuenta con una solución eficiente frente a esta enfermedad. Además, actualmente la única medida preventiva contra la tuberculosis es la vacuna obtenida de *Mycobacterium bovis* BCG de eficacia variable que no confiere protección en adultos contra tuberculosis pulmonar.

Es así como en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, se ha propuesto una novedosa metodología en el diseño de vacunas sintéticas contra diferentes organismos patógenos, dentro de los cuales se encuentra *Mycobacterium tuberculosis*. Esta propuesta se basa en la identificación de secuencias peptídicas derivadas de proteínas de superficie de *Mycobacterium tuberculosis* que puedan estar involucradas en interacciones hospedero-patógeno importantes para la infección de células blanco. Se ha determinado que estas secuencias no son inmunogénicas, es decir, que no son reconocidas por el sistema inmune del hospedero humano. Por esta razón, dichos péptidos deben ser modificados en su secuencia para producir cambios estructurales que permitan una mejor presentación a moléculas del sistema inmune y la posterior generación de una respuesta eficiente contra el patógeno.

Hasta ahora, esta aproximación ha sido aplicada al estudio de diversas proteínas de superficie de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv encontrando un pool de péptidos derivados de éstas que pueden ser considerados como posibles candidatos en el diseño de una vacuna sintética contra tuberculosis. En este trabajo se realizaron ensayos *in vitro* que permitieron evaluar la

actividad protectora de los péptidos, empleando la metodología de cocultivo que mostró que los esplenocitos obtenidos a partir de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos 40400 y 40448 son capaces de controlar el crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en macrófagos murinos infectados.

Se determinó la producción de citoquinas relacionadas con la diferenciación de linfocitos T que indica la activación de la respuesta inmune celular y el control de la infección *in vitro*; además, la presencia de anticuerpos en los sueros de los ratones inmunizados con los péptidos, que indica la activación de una respuesta inmune humoral

Palabras clave: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, péptidos sintéticos, cocultivo, antigenicidad, vacunas, respuesta inmune.

SUMMARY

Tuberculosis continues being a disease having a high impact on public health; it is considered that a third of the world's population is infected by *Mycobacterium tuberculosis*, a bacillus which is transmitted by air when inhaling aerosol droplets from individuals having active disease. Despite great efforts having been made at developing better tuberculosis prevention, diagnosis, prophylaxis and treatment methods, no efficient solution to this disease has yet been found. The only currently available preventative measure against tuberculosis is the vaccine obtained from *Mycobacterium bovis* BCG; it has variable efficacy which does not confer protection against pulmonary tuberculosis on adults.

The Fundación Instituto de Immunología de Colombia (FIDIC) has thus proposed a novel methodology for designing synthetic vaccines against different pathogenic organisms, including *Mycobacterium tuberculosis*. This proposal is based on identifying peptide sequences derived from *Mycobacterium tuberculosis* surface proteins which might be involved in the host-pathogen interactions which are needed for target cell infection. It has been determined that these sequences are not immunogenic (i.e. they are not recognised by a human host's immune system). Such peptides' sequences must thus be modified to produce structural changes enabling better molecule presentation to the immune system, subsequently inducing an efficient response against the pathogen.

This approach has so far been applied to studying several *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv surface proteins; a pool of peptides derived from them has been found, representing candidates when designing a synthetic anti-tuberculosis vaccine. *In vitro* tests were carried out in this work which enabled such peptides' protection-inducing activity to be evaluated; this involved using co-culture methodology which showed that splenocytes obtained from

mice immunised with some of the synthetic peptides were able to control *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv intracellular growth in infected murine macrophages.

It was determined that the production of cytokines related to T-lymphocyte differentiation indicated the activation of the cellular immune response and control of the infection *in vitro*. The presence of antibodies in the sera of mice immunised with these peptides indicated the activation of a humoral immune response.

KEYWORDS: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, synthetic peptides, coculture, antigenicity, vaccines, immune response.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	17
2.	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	19
3.	HIPÓTESIS	21
4.	OBJETIVOS	22
4.1	Objetivo General.....	22
4.2	Objetivos Específicos.....	22
5.	ESTADO DEL ARTE	23
5. 1	Epidemiología de la tuberculosis.....	23
5.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
5.3	Proteínas de superficie de <i>Mtb</i> H37Rv	26
5.4	Respuesta inmune a la infección por <i>Mtb</i>	29
5.4.1	Respuesta inmune celular frente a la infección por un patógeno intracelular	29
5.4.2	Respuesta inmune innata contra <i>Mtb</i>	32
5.4.3	Respuesta inmune ante la infección por <i>Mtb</i>	33
5.5	Estado actual de las vacunas contra <i>Mtb</i>	39
6.	METODOLOGÍA	41
6.1	Esquema de inoculación.....	42
6.2	Componente bioinformático - Evaluación de la unión de péptidos sintéticos al MHC II a través del uso de herramientas bioinformáticas	43
6.3	Síntesis de péptidos	44
6.4	Inoculación de ratones BALB/c con los péptidos sintetizados	45
6.5	Obtención de macrófagos derivados de médula ósea y de esplenocitos	46
6.6	Condiciones de seguridad para el cultivo y mantenimiento de <i>Mtb</i>	47
6.7	Cultivo y cosecha de la micobacteria	47
6.8	Recuento de micobacterias.....	48
6.9	Tinción de Ziehl Neelsen	48
6.10	Tinción de Gram.....	49
6.11	Infección de macrófagos	50
6.12	Co – cultivo de esplenocitos de ratones inmunizados con macrófagos infectados con <i>Mtb</i>	51

6.13	Conteo de micobacteria.....	51
6.14	Evaluación de citoquinas en el sobrenadante de cocultivo	52
6.15	Determinación de anticuerpos por ensayo de ELISA.	52
7.	RESULTADOS.....	54
7.1	Evaluación <i>in silico</i> de la unión de péptidos sintéticos al MHC II.	54
7.2	Obtención de macrófagos derivados de medula ósea y esplenocitos	59
7.3	Tinción de Ziehl Neelsen y Tinción de Gram	60
7.4	Co – cultivo de esplenocitos de ratones inmunizados con macrófagos infectados con <i>Mtb</i> y conteo de UFC	61
7.5	Evaluación de citoquinas en el sobrenadante de cocultivo	67
7.6	Evaluación de IgG por ensayo de ELISA en sueros de ratones inmunizados.	72
8.	DISCUSION DE RESULTADOS	76
9.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
9.1	CONCLUSIONES.....	85
9.2	RECOMENDACIONES	86
10.	CONSIDERACIONES ÉTICAS	87
11.	REFERENCIAS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la envoltura micobacteriana.

Figura 2. Representación esquemática de la señalización y regulación transcripcional de la polarización de Linfocitos Th17.

Figura 3. Factores de transcripción que influyen en la diferenciación de linfocitos Th.

Figura 4. Esquema de transmisión y patología de la tuberculosis.

Figura 5. Barreras innatas que responden a *Mtb* en las vías aéreas respiratorias.

Figura 6. Planteamiento metodológico

Figura 7. Esquema de inoculación, sangrias y eutanasia

Figura 8. Cambio morfológico de los monocitos derivados de medula ósea de los ratones BALB/c

Figura 9. Tinción de Ziehl Neelsen de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Control de infección de en macrófagos derivados de medula ósea de ratones BALB/c con *Mtb* H37Rv.

Gráfica 2. Crecimiento de *Mtb* H37Rv en macrófagos en el día 3 de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400, 40408,40412,40422 y 40448..

Gráfica 3. Crecimiento de *Mtb* H37Rv en macrófagos en el día 6 de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400, 40408,40412,40422 y 40448

Gráfica 4. Crecimiento de *Mtb* H37Rv en macrófagos en el día 10 de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400, 40408,40412,40422 y 40448.

Gráfica 5. Determinación de TNF α en sobrenadante de cocultivo.

Gráfica 6. Determinación de IFN γ en sobrenadante de cocultivo.

Gráfica 7. Determinación de IL12 en sobrenadante de cocultivo.

Gráfica 8. Determinación de IL4 en sobrenadante de cocultivo.

Gráfica 9. Determinación de IL5 en sobrenadante de cocultivo.

Gráfica 10. Determinación de la concentración de anticuerpos IgG en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido 40400

Gráfica 11. Determinación de la concentración de anticuerpos IgG en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido 40408

Gráfica 12. Determinación de la concentración de anticuerpos IgG en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido 40412

Gráfica 13. Determinación de la concentración de anticuerpos IgG en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido 40422

Gráfica 14. Determinación de la concentración de anticuerpos IgG en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido 40448

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas de superficie de *Mtb* H37Rv

Tabla 2. Análisis de secuencias de péptidos originales de proteínas de superficie de *Mtb* H37Rv, por el software NetMHC II 3.1

Tabla 3. Análisis de secuencias de péptidos modificados de proteínas de superficie de *Mtb* H37Rv, por el software NetMHC II 3.1

Tabla 4. Organización de ratones para inoculación.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
AECs	Células epiteliales de vías aéreas (del inglés: Airway Epithelial Cells)
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> <i>Bacillus Calmette - Guérin</i>
CDs	Células dendríticas
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
HABPs	péptidos de alta actividad de unión (del inglés: High activity binding peptides)
HBHA	Hemaglutinina de unión a heparina (del inglés: Heparin-binding haemagglutinin)
IFN γ	Interferón Gamma
IL	Interleuquina
LAM	Lipoarabinomanano
MDR-TB	Tuberculosis multidrogorresistente.
MDR/RR-TB	Multidrug-resistant TB or rifampicin-resistant
MFI	Índice medio de fluorescencia (del inglés: Mean fluorescence intensity)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés: Major Histocompatibility Complex)
MOI	multiplicidad de infección (del inglés multiplicity of infection)
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MΦ	Macrófagos
OMS	Organización mundial de la salud

PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés: Pathogen-Associated Molecular Patterns)
TB	Tuberculosis
TCR	Receptores de células T (del inglés: T cell receptor)
TLRs	Receptor tipo Toll (del inglés: Toll-like receptors)
TH	Linfocito T Helper
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés: Tumor necrosis factor alpha)
UFC	Unidades formadoras de colonia

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa producida por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* principalmente por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, que con característica ácido- alcohol resistente, es transmitido por vía aérea al inhalar aerosoles contaminados con el bacilo tuberculoso.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) un tercio de la población mundial ha sido infectada con *Mtb* pero solo del 5 al 10% padecen la enfermedad y el 90% restante mantienen el bacilo en un estado de latencia, dando lugar a la enfermedad asintomática, la cual puede ser reactivada años después de la infección primaria por causa de la inmunosupresión del hospedero por enfermedades como la desnutrición, diabetes o el SIDA. La TB es la principal causa de muerte en el mundo por una enfermedad infecciosa y uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial el cual va en aumento por la aparición de cepas multiresistentes a fármacos (1).

Para el año 2016, el número de casos nuevos de TB aumentó en todo el mundo, encontrando la mayor parte de éstos en Bangladesh, en la República Popular Democrática de Corea, Kenia y Filipinas, aunque han sido muchos los esfuerzos por erradicar dicha enfermedad, la TB sigue estando posicionada en el nivel de epidemia mundial (1).

Actualmente la única medida preventiva con licencia contra la TB es la vacuna obtenida de *Mycobacterium bovis* BCG, que ha sido empleada durante décadas presentando alta eficiencia en la protección contra la TB diseminada y meningitis asociada a TB infantil, sin embargo, la protección contra la enfermedad pulmonar en adultos no es significativa, debido

a que individuos que han sido vacunados y posteriormente infectados con la micobacteria son susceptibles a presentar la enfermedad, una vez disminuye o se suprime la respuesta inmune generada previamente por el antígeno de la vacuna BCG (2, 3). Por tanto, el desarrollo de nuevas estrategias de inmunización y de vacunas que induzcan la respuesta inmune frente a antígenos de *Mtb* para el control de dicha patología han cautivado el interés de la comunidad científica a nivel mundial; pero la dificultad para el diseño de dichas vacunas ha sido la deficiente comprensión de los mecanismos de protección inmune contra *Mtb* por cuanto no son claras las múltiples interacciones con el sistema inmunológico *in vivo*, entendiéndose que solamente la respuesta inmune mediada por células o una sola actividad inmune específica no es suficiente para prevenir, controlar o tratar la infección por *Mtb* (4).

Teniendo en cuenta lo anterior y continuando con la aproximación de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia en la búsqueda de antígenos para el diseño de una vacuna sintética contra TB, este trabajo planteó la evaluación *in vitro* del efecto protector de péptidos sintéticos derivados de proteínas de superficie de *Mtb*, empleando un modelo murino.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Según la OMS para el año 2016 el número de nuevos casos de TB multidrogoresistente ha aumentado en todo el mundo, además, se reportan 10.4 millones de casos nuevos de TB encontrando el mayor número de casos en Bangladesh, en la República Popular Democrática de Corea, Kenia y Filipinas. Han sido muchos los esfuerzos por erradicar dicha enfermedad, aún así, la TB se ha categorizado como la novena causa de muerte a nivel mundial y la primera causa de muerte por un agente infeccioso por encima de las ocasionadas por el VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) y sigue estando posicionada en el nivel de epidemia mundial (1). Por otra parte, la única vacuna con licencia contra tuberculosis actualmente es la vacuna BCG derivada de *Mycobacterium bovis* -Bacillus Calmette-Guérin, siendo la única permitida contra TB; solo es protectora contra TB miliar y meníngea en niños, pues en adultos es variable y no depende de un único factor. Existen múltiples variables que interfieren en la respuesta protectora como: el tiempo, la vía de administración de la vacuna, la exposición a micobacterias ambientales y el ambiente entre otros (5-9).

Por esta razón la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, basada en los resultados obtenidos en el diseño de una vacuna sintética contra la malaria, ha propuesto el diseño de una vacuna fundamentada en el uso de péptidos multiepítotope contra tuberculosis. Es así como se han caracterizado y sintetizado diversos pools de péptidos derivados de proteínas de superficie de *Mtb* teniendo como base la búsqueda de antígenos funcionalmente importantes en la interacción hospedero-patógeno (10).

Con el fin de dar continuidad a los procesos de investigación en cuanto al desarrollo de vacunas contra TB y teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se plantea en el presente proyecto la síntesis y posterior evaluación *in vitro* del efecto protector de péptidos sintéticos en un modelo murino.

Por tanto, la pregunta de investigación es ¿los péptidos sintéticos, candidatos a vacuna generan una respuesta inmune protectora frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en un modelo murino *in vitro*?

3. HIPÓTESIS

El desarrollo de un modelo *in vitro* permitirá evaluar la actividad inmune protectora de candidatos vacunales (péptidos sintéticos derivados de las proteínas de superficie de *Mtb* H37Rv Rv0180c, Rv0227c, Rv0679c, Rv1268c, Rv1411c, Rv1490, Rv1911c, Rv1980c, Rv2004c, Rv2270, Rv2301c, Rv2560, Rv2707, Rv3166c, Rv3494c y Rv3629) contra tuberculosis, mediante la evaluación del control de crecimiento y proliferación intracelular de *Mtb* en macrófagos y la secreción de citoquinas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la respuesta inmune protectora de péptidos sintéticos derivados de proteínas de superficie de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv como posibles candidatos a vacuna en un modelo murino frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

4.2 Objetivos Específicos

- Identificar las secuencias de epítopes T de las proteínas de superficie de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Rv0180c, Rv0227c, Rv0679c, Rv1268c, Rv1411c, Rv1490, Rv1911c, Rv1980c, Rv2004c, Rv2270, Rv2301c, Rv2560, Rv2707, Rv3166c, Rv3494c y Rv3629 consideradas como posibles candidatos en la interacción hospedero-micobacteria.
- Determinar la respuesta inmune generada por péptidos sintéticos derivados de las proteínas de superficie de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en un ensayo *in vitro*.
- Evaluar la capacidad protectora de péptidos sintéticos en el modelo murino *in vitro*.

5. ESTADO DEL ARTE

5. 1 Epidemiología de la tuberculosis

Las Naciones Unidas, en el marco de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, estipulan que para el año 2030 se debe dar fin a la epidemia mundial de tuberculosis, la cual presentó el mayor pico en el año 2007; a esta propuesta se suma la OMS.

Consecuentemente la OMS en el informe anual entregado en el 2017, refiere que dicha situación epidemiológica de TB tiene una incidencia mayor en la población mundial de lo que ya se había calculado; para el año 2016 se estimaron 10.4 millones de nuevos casos de TB en todo el mundo, equivalente a 140 pacientes por cada 100.000 habitantes, donde la mayor incidencia se presenta en Bangladesh, la República Popular Democrática de Corea, Kenia, Filipinas India, Indonesia, China, y Pakistán (1).

Se calculó, para el año 2016, que el 10% de las personas infectadas desarrollaron la enfermedad, sin embargo, el número de muertes a causa de esta enfermedad, en el mismo año fue de 1,3 millones de personas VIH negativas, mas 374.000 muertes por co-infección tuberculosis – VIH, por tanto, en el periodo comprendido entre el año 2000 y 2016 se calcularon 44 millones de muertes de pacientes con tuberculosis VIH negativos y

adicionalmente 9 millones de muertes de pacientes con tuberculosis y VIH; presentando una disminución de la tasa de mortalidad anual del 3% entre los años 2000 y 2016; aún así la TB sigue estando posicionada entre una de las principales 10 causas de muerte en todo el mundo y como la principal causa de muerte por un agente infeccioso (1).

Por otra parte, en el año 2016, se presentaron 490.000 nuevos casos de TB multidrogorresistentes (MDR-TB) y 110.000 (RR-TB). En el mismo año, del total de las personas diagnosticadas con TB el 10% fueron VIH positivo (1).

En contraste, el continente europeo ha presentado el mayor y más rápido porcentaje de disminución de la enfermedad, superando el 4% anual estimado por las Naciones Unidas en conjunto con la OMS y en los países como Etiopia, Rusia, Tanzania, Vietnam y Zimbaue de la región del pacifico occidental, superan aún más ese porcentaje, alcanzando un rango entre el 4.6 y el 6% en la disminución de la incidencia de la TB (1).

5.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Bacteria perteneciente al complejo *Mtb* conformado por: *M tuberculosis* (*Mtb*), el agente etiológico de TB en humanos; *M. africanum* y *M. canetii* que están asociados a TB en algunos humanos del occidente africano; por otra parte *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. orygis* y *M. mungi* causan TB en mamíferos y *M. microti* en campañoles, sin embargo, la especie con un rol predominante en la patología en humanos es *M. tuberculosis* (11).

Mtb es un microorganismo acido- alcohol resistente el cual no forma esporas y carece de flagelo, es un bacilo irregular delgado con un tamaño aproximado de 1,5 a 4 µm de largo y 0,3 a 0,5 µm de ancho dependiente de la fase de crecimiento. Por otra parte, en bacterias del género *Mycobacterium*, los nutrientes son absorbidos por difusión pasiva pasando por barreras permeables y posteriormente son trasladados a través de la membrana citoplasmática

por transporte activo; por tanto en un medio con altas concentraciones de nutrientes se aumentará la velocidad de difusión y la micobacteria alcanzará la tasa de crecimiento en un menor tiempo (12, 13).

Las micobacterias son metabólicamente flexibles, siendo *Mtb* una bacteria prototrófica es capaz de adaptarse a condiciones cambiantes extremas como la privación de nutrientes, diversas concentraciones de oxígeno hasta condiciones de hipoxia y entornos intrafagosómicos, lo que le confiere gran éxito a su proceso de infección y patogenicidad.

Mtb es una micobacteria de crecimiento lento con un tiempo de replicación de 12 a 24 horas en condiciones adecuadas. En el cultivo *in vitro* se emplea glicerol como fuente de carbono, iones de amonio y asparagina como fuente de nitrógeno y micronutrientes, otro componente clave para el desarrollo del bacilo es la albúmina, habitualmente incorporada en los medios de cultivo con el agregado de ovoalbúmina o seroalbúmina bovina (14).

La pared celular de la micobacteria es una barrera cuya permeabilidad resulta de gran eficacia para la protección de la misma, proporcionándole a la micobacteria las características de virulencia, patogenicidad y resistencia a muchos fármacos (13).

Mediante técnicas de biología estructural, como la tomografía crioelectrónica, que hace parte de la microscopía electrónica de transmisión, que preserva la organización de la pared celular evitando la deshidratación de la muestra, se ha demostrado que las micobacterias poseen una membrana externa, funcionalmente similar a la observada en las bacterias Gram negativas, que consiste en una bicapa lipídica asimétrica compuesta de ácidos grasos largos organizados espacialmente en varias capas delgadas (ácidos micólicos) y componentes cerosos en la capa externa. La membrana externa e interna (Figura 1) forman un espacio periplásmico, con la presencia de una capa delgada de peptidoglicano en el lado más interno unido covalentemente a arabinogalactano y lipoarabinomanano que a su vez están unidos a ácidos micólicos (11).

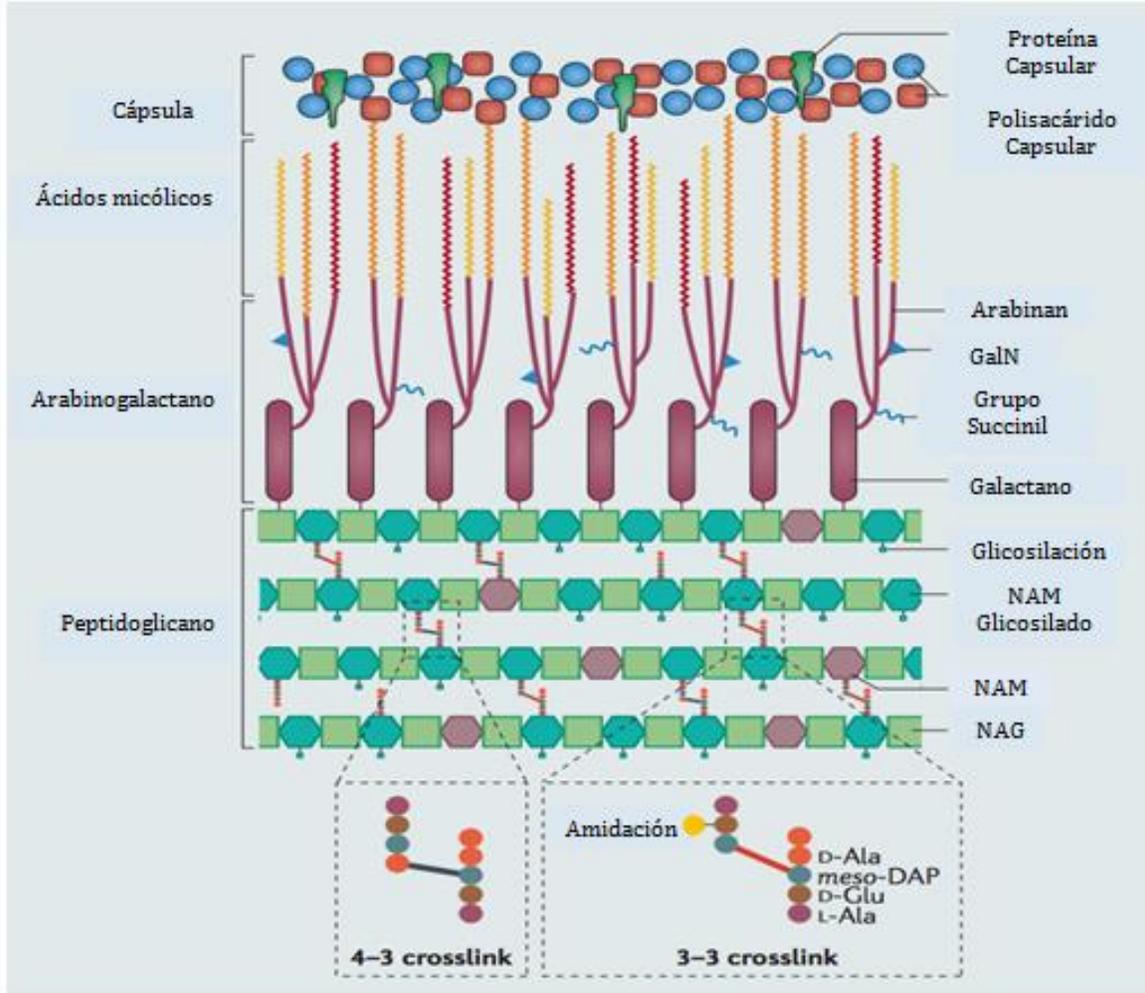


Figura 1. Esquema general de la envoltura micobacteriana. Adaptado de Kieser and Rubin (15).

5.3 Proteínas de superficie de *Mtb* H37Rv

El estudio del genoma de *Mtb* H37Rv ha permitido caracterizar proteínas de superficie de *Mtb*, funcionalmente importantes en la interacción hospedero – patógeno (16-29). Algunas de estas proteínas son:

Tabla 1. Proteínas de superficie de *Mtb* H37Rv

Proteína	Descripción
Rv0180c	Ubicada en la membrana celular de <i>Mtb</i> (16), se ha descrito como una proteína transmembranal de función desconocida que comparte una alta similitud con proteínas conservadas y proteínas transmembranales de diferentes especies de micobacterias (30).
Rv0227c	Está localizada en la superficie de <i>Mtb</i> (17), el gen que codifica a esta proteína es conservado entre diferentes especies micobacterianas, compartiendo un alto grado de identidad entre estas (31). Se ha demostrado que péptidos sintéticos de la proteína Rv0227c son capaces de inhibir la entrada de <i>Mtb</i> a células blanco de infección, presentando una alta capacidad de unión específica (y denominados HABPs, High Activity Binding Peptides) a las líneas celulares epiteliales alveolares A549 y macrófagos derivados de monocitos U937 (17).
Rv0679c	Se ha predicho como una lipoproteína de la membrana externa y se ha encontrado en la superficie celular de <i>Mtb</i> , con un peso molecular de 16,6 kDa; péptidos de esta proteína inhiben la entrada de bacilos vivos en líneas celulares epiteliales y macrófagos <i>in vitro</i> , sugiriendo un papel importante de esta proteína en el proceso de entrada de la micobacteria a la célula hospedera (18, 32).
Rv1268c	Es una proteína de superficie de la membrana externa de <i>Mtb</i> , tiene un tamaño de 232 aa, con un peso molecular de 23,97 kDa; de esta proteína, se han determinado HABPs implicados en la unión e invasión de células epiteliales y de tipo macrófago (19).
Rv1411c	LprG es una lipoproteína de la pared celular de <i>Mtb</i> , con un peso molecular de 24 kDa. Se ha mostrado que la exposición prolongada de macrófagos humanos a esta proteína inhibe el procesamiento del antígeno en el MHC-II (26). Por otro lado, se ha descrito que esta proteína sirve como vehículo de glicolípidos, permitiendo el tráfico de éstos, los cuales, desempeñan un papel importante en la fisiología de la bacteria y las interacciones hospedero-patógeno (31).

Rv1490	Está localizada en la superficie micobacteriana, el tamaño de esta proteína es de 435 aminoácidos, con un peso molecular de 48,15 kD; se ha descrito la participación de esta proteína en la entrada de la célula hospedera, lo que podría contribuir a la patogenicidad del bacilo (20).
Rv1911c	Es una lipoproteína de la región más externa de superficie de la <i>Mtb</i> , de esta proteína no se tiene información respecto a su función, solo se infiere que respecto a su localización puede estar implicada en la interacción con células blanco de infección (28).
Rv1980c	Tiene un peso molecular de 24 kDa, está localizada en la superficie de <i>Mtb</i> (21) y se encuentra entre las principales proteínas secretadas, siendo importante para la activación del sistema inmune (29).
Rv2004c	Tiene un tamaño de 54 kDa y se encuentra localizada en la superficie micobacteriana. Mediante el uso de péptidos sintéticos, se demostró el papel crucial de esta proteína en la interacción de la célula hospedera con la micobacteria (22).
Rv2560c	Es una proteína transmembranal rica en prolina y glicina, con una masa molecular de 33,1 kDa, implicada en la invasión micobacteriana a las células hospederas (24).
Rv3166c	Es una proteína transmembranal compuesta por 319 aminoácidos con un peso molecular de 33,4 kDa, se describe como una proteína hipotéticamente conservada. Se ha reportado el alto porcentaje de identidad de Rv3166c con otras proteínas de especies patógenas diferentes a <i>Mtb</i> , lo que sugiere su posible participación en la virulencia e infección (33).
Rv3494c	También conocida como Mce4F es una proteína que pertenece la familia de MCE (mammalian cell entry), se ha identificado en el genoma de este microorganismo como una proteína de la membrana externa que es secretada al exterior de la micobacteria y que cumple funciones importantes dentro de la patogénesis, se ha sugerido que esta proteína juega un papel importante en la entrada y supervivencia del patógeno dentro de una célula huésped (23).

5.4 Respuesta inmune a la infección por *Mtb*

5.4.1 Respuesta inmune celular frente a la infección por un patógeno intracelular

El sistema inmune de los mamíferos es de gran complejidad, las diversas células del sistema inmunitario están en la capacidad de detectar cambios en el ambiente extracelular a través de los receptores de la envoltura celular; algunos de estos receptores transmembranales se componen de varios complejos proteicos que son estimulados y activados por las proteinquinasas, proteínas con actividad enzimática que catalizan el proceso reversible de la fosforilación de proteínas en el cual se permite la fijación covalente de un grupo fosfato a una proteína. Este proceso ocurre cuando un ligando; en este caso un antígeno se une a la parte extracelular del receptor activando a dichas enzimas que transmitirán la señal al fosforilar la proteína y activar otras moléculas emisoras de señales dentro de la célula.

Otra clase de receptores importantes, cuya función incide en la actividad de linfocitos maduros, son aquellos que carecen de auto- actividad intrínseca; sin embargo, las colas citoplasmáticas se asocian de forma no covalente con tirosinas citoplasmáticas que activan el receptor y generan la señal intracelular. Aun así la función de las proteinquinasas no está limitada a la activación de los receptores sino que a menudo contribuyen con la activación de diferentes etapas en la complejidad de la maquinaria celular, empero su actividad primordial como se mencionó anteriormente es el proceso de fosforilación y desfosforilación debido a que estos procesos contribuyen a la regulación de la actividad de muchos factores de transcripción, de enzimas y otras proteínas (34).

Células del sistema inmunitario tales como los linfocitos T vírgenes que se localizan inicialmente en los órganos linfáticos secundarios tales como el timo y los ganglios linfáticos, son capaces de detectar variaciones en su ambiente extracelular. Estos linfocitos T entran en contacto con el antígeno al ser presentado a través del complejo mayor de

histocompatibilidad (MHC) de la clase I para activación de células T CD8 o clase II para células T CD4, por células dendríticas o macrófagos que previamente han fagocitado y procesado al antígeno.

Los linfocitos T y B experimentan complicados procesos de diferenciación siendo sensibles al ambiente extracelular, por ejemplo los linfocitos T CD4⁺ al percibir un estímulo de un antígeno y/o diversos patrones de citoquinas y quimoquinas sufren un proceso de diferenciación del linaje hacia Th1, Th2 o Th17 (35, 36).

Las células T son inducidas a diferenciación tras la activación de los receptores de células T (TCR) (36). Estos TCR son moléculas de reconocimiento de antígenos presentes en la superficie de células T, más específicamente proteínas de unión a membrana cuya función es emitir señales intracelulares para la activación de la maquinaria celular, los cuales a diferencia de los receptores de los linfocitos B no se unen de forma directa a un antígeno, sino que reconocen péptidos antigénicos que forman un complejo con glicoproteínas polimórficas codificadas en la agrupación de genes conocidas como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de la célula que le esté presentando dicho antígeno (34).

Entonces los linfocitos T son susceptibles al ambiente extracelular mediante la interacción con otras células, con los antígenos presentados, las quimoquinas y citoquinas presentes en este microambiente. Cuando se activa un linfocito T virgen en presencia de un perfil de citoquinas como IL-6, IL-21, IL-12, IL-23 e interferón gama (IFN γ) se inicia la ruta de señalización de STAT 3. Una vez es fosforilado STAT 3 (PSTAT3) se une a las regiones promotoras activando la transcripción de los genes que codifican los reguladores maestros de los factores transcripcionales de la polarización Th17. A su vez PSTAT3 induce la expresión de HIF1 α que inhibe FoxP3 mientras que IL-1 activa p38, una cinasa (MAPK) asociada a un mitógeno (promueve la proliferación celular) que activa la vía Akt/ mTOR promoviendo la diferenciación Th17, dicha regulación se inhibe en presencia de la IL-23 que activa a STAT 4 pero este mismo perfil promueve la polarización hacia el perfil Th2 que junto con la IL-4 activan a STAT 6 y GATA3 para el mismo fin (Figura 2).

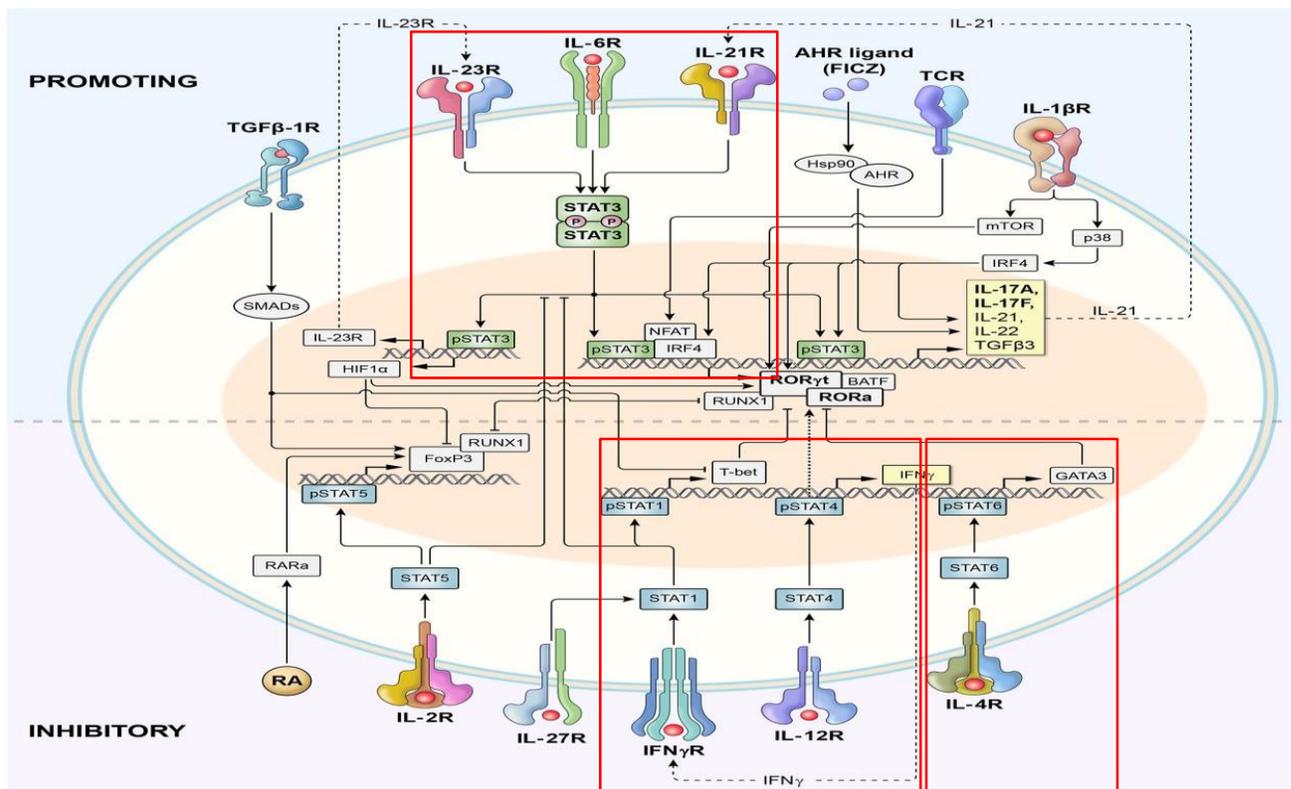


Figura 2. Representación esquemática de la señalización y regulación transcripcional de la polarización de Linfocitos Th17. Receptor del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ-1); hidrocarburo de arilo (AHC); 6-Formylindolo(3,2-b) carbazole (FICZ); Receptor de células T (TCR); Interluquina (IL); Factor de hipoxia inducible (HIF); Receptor de interferón gamma (IFNγR) ácido retinoico (RA). Tomado de Muranski and Restifo (36)

Por otra parte IL-12 e IFNγ estimulan a STAT4 el cual se fosforila y se transloca al núcleo de la célula activando el factor transcripcional maestro T-bet en la polarización del linaje Th1 (Figura 2, 3) (37, 38).

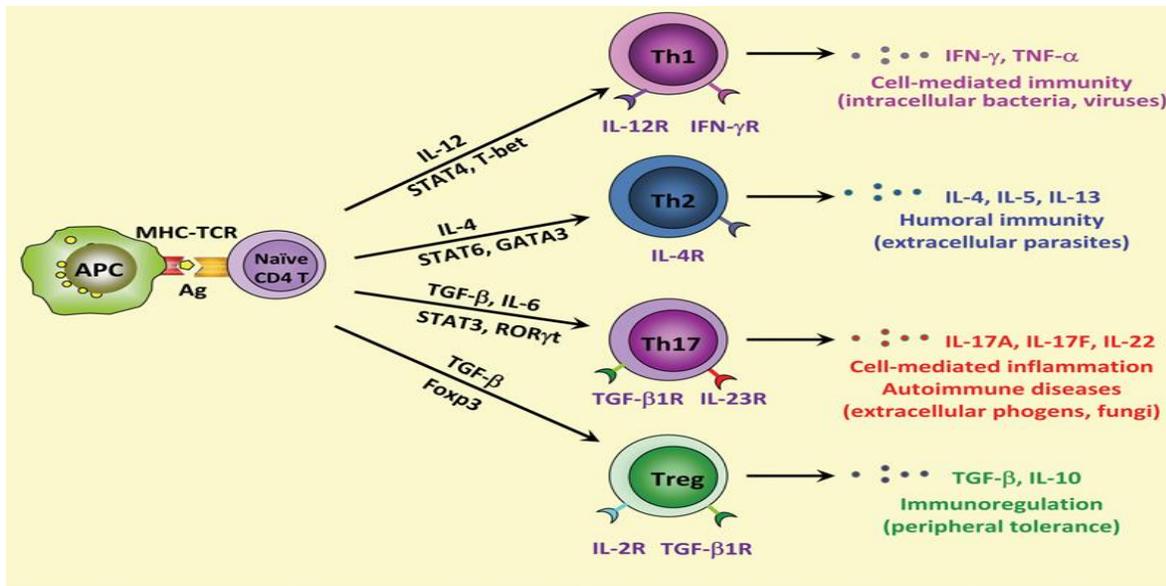


Figura 3. Factores de transcripción que influyen en la diferenciación TH. Tomado de Leung S. *et al.* Células presentadoras de antígeno (APC); Antígeno (Ag); Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); Receptor de células T (TCR); Interleuquina (IL); Receptor del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β -1); receptor huérfano gamma (ROR γ) Linfocitos T helper (Th); Linfocitos T reguladores (Treg); Interferón gamma (IFN γ); factor de necrosis tumoral alfa (TNF α); (37)

5.4.2 Respuesta inmune innata contra *Mtb*.

- Proceso de infección tuberculosa.

La transmisión de TB entre individuos ocurre a través de aerosoles de bacilos infecciosos; en algunos casos, la infección se convierte directamente en TB activa; junto con la reactivación y la reinfección dando lugar a la notificación de aproximadamente 10.4 millones de nuevos casos de TB anualmente. Tras la inhalación de las microgotas de saliva, el patógeno alcanza las vías respiratorias y es fagocitado por los macrófagos alveolares (Figura 4). La célula hospedera infectada induce una respuesta proinflamatoria localizada que atrae a las células mononucleares y los linfocitos T para formar un granuloma, la reacción tisular característica de la TB. Los individuos sanos pueden controlar el patógeno en esta etapa, pero permanecen latentemente infectados y por lo tanto en riesgo de reactivación durante toda la vida. La maduración del granuloma (sólido, necrótico, caseoso) ocurre a diferentes velocidades y

suele culminar en la coexistencia de todas las formas de lesión durante la TB activa. Como se observa en la figura 4, el granuloma caseoso pierde solidez debido a la desintegración de su centro en una acumulación sin estructura de residuos de células hospedadoras, en el caso de *Mtb* crece a un alto número, se libera en las vías respiratorias y se expulsa como aerosol contagioso (39).

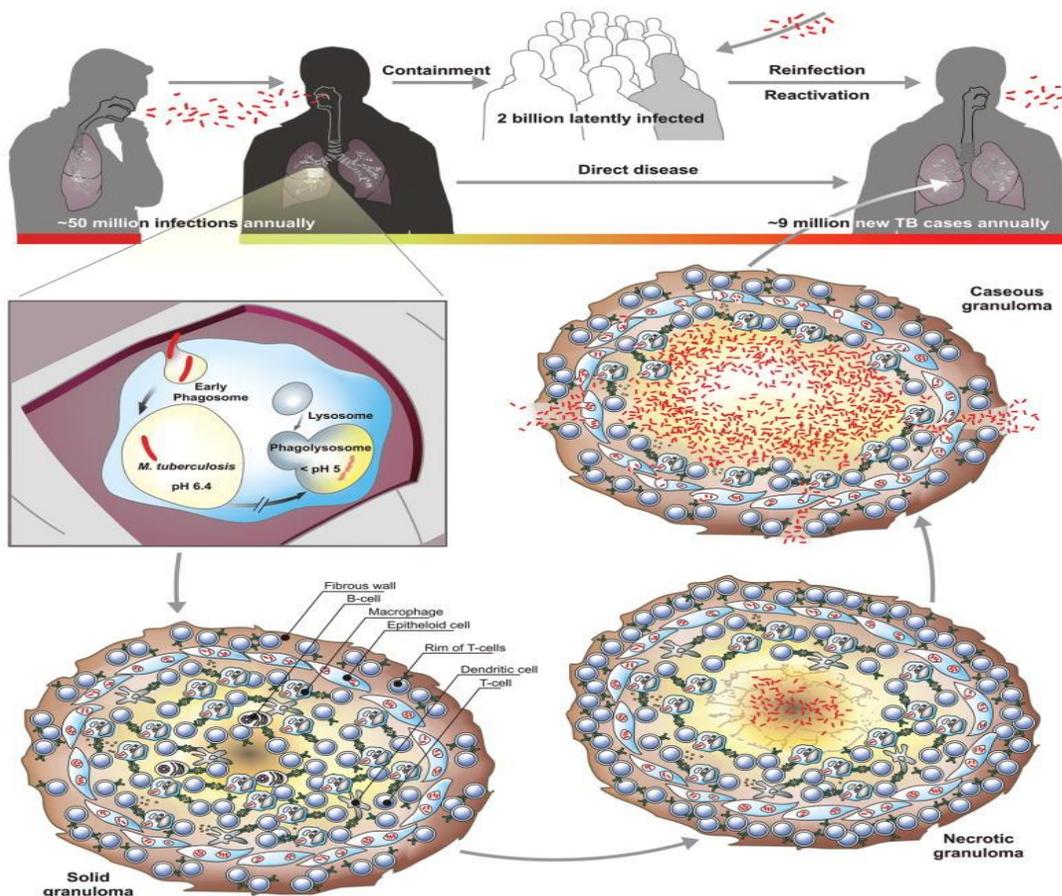


Figura 4. Esquema de Transmisión y patología de la tuberculosis. Adaptado de Gengenbacher and Kaufmann. (39)

5.4.3 Respuesta inmune ante la infección por *Mtb*

La respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa están implicadas en todo proceso infeccioso, incluyendo el generado por *Mtb*. Por un lado, la respuesta inmune innata proporciona la primera línea de defensa contra patógenos microbianos y no es específica de

un patógeno particular a diferencia de la respuesta inmune adaptativa, la cual, es estimulada por la exposición a los organismos infecciosos; su magnitud y capacidad de respuesta crece con las exposiciones sucesivas al mismo antígeno. Por otro lado, la inmunidad innata, depende de un grupo de proteínas y células fagocíticas que reconocen las características conservadas de los patógenos y se activan rápidamente para ayudar a destruir a los agentes invasores (40).

En la respuesta inmune innata frente a una infección por *Mtb* se encuentra en primer lugar la mucosa respiratoria, la cual proporciona la primera barrera de defensa contra *Mtb*; esta es activada una vez los aerosoles de bacilos infecciosos inhalados pasan a través de éstas hasta llegar a los alveolos en el pulmón (Fig. 5A); allí las células epiteliales (Airway Epithelial Cells - AECs) forman una barrera que previene la invasión por *Mtb* (41). Por otro lado, las AECs reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales desencadenan una cascada de señalización intracelular en el macrófago alveolar (MA) incluyendo la fagocitosis, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$). Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), permiten al macrófago identificar la micobacteria, detectar componentes bioquímicos de la pared de la *Mtb* tales como lipoarabinomananosilado (ManLam), dimicolato de trehalosa y dipéptido N-glicolimuramilo (41, 42).

En segundo lugar, están los alveolos pulmonares (Figuras 5B y 5C), estos, están recubiertos por células epiteliales tipo I, las cuales participan en la formación de las paredes del alveolo e implicadas en el intercambio gaseoso. Otras de las células que recubren los alveolos son las células de tipo II, algunas células inmunitarias como los macrófagos alveolares (MAs) y neutrófilos (42).

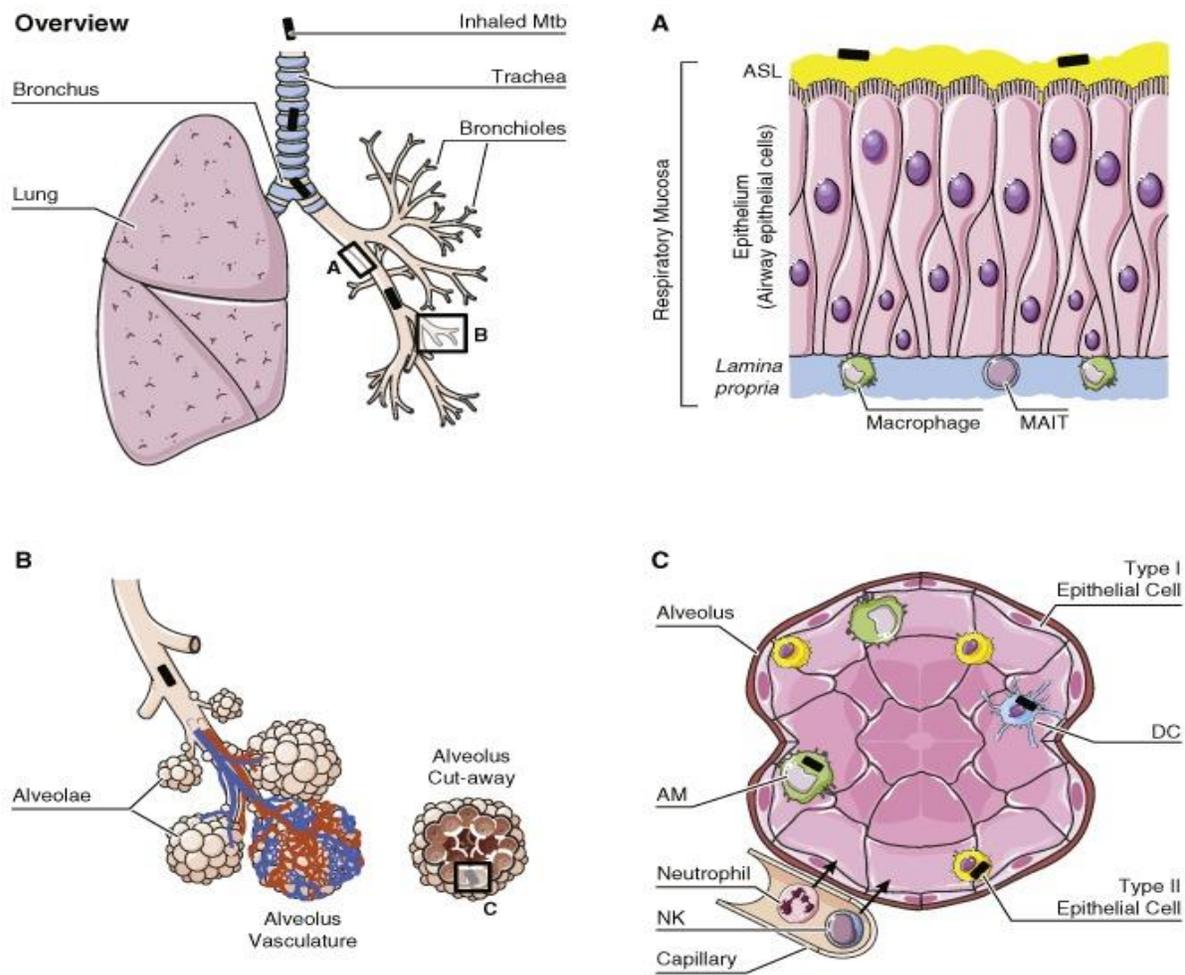


Figura 5. Barreras innatas que responden a *Mtb* en las vías aéreas respiratorias. Tomado de Lerner, *et al.* (42)

En tercer lugar, están las células dendríticas (CDs), caracterizadas por el reconocimiento inicial de *Mtb*, tienen una amplia gama de receptores que detectan los PAMPs respectivamente de *Mtb* y son considerados como fagocitos altamente eficientes (43). Una vez las CDs reconocen a *Mtb*, maduran en los alvéolos y presentan antígenos a las células T a través del CMH de clase I y clase II (42).

En cuarto lugar, se encuentran los neutrófilos, éstos actúan como fagocitos no específicos de primera línea y se caracterizan por la secreción de proteínas y péptidos anti-bacterianos, principalmente la catelicidina y el péptido LL-37 (41).

Por último, se ubican las células NK, las cuales son atraídas a los sitios de infección, donde reconocen y destruyen las células hospederas infectadas. Durante este proceso secretan $IFN\gamma$, que activa a los macrófagos y los induce a segregar las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18, que posteriormente activan las células T $CD8^+$ (41, 42).

5.4.3.1 Respuesta inmune celular frente a la infección por *Mtb*

Inicialmente se atribuyó a las células T $CD4^+$ un papel fundamental en la respuesta inmune adaptativa celular en TB pero se ha encontrado que otras células T de diferente linaje como $CD8^+$ y Th17 hacen parte importante de esta respuesta (44, 45). La presentación de antígenos se da generalmente en los ganglios linfáticos pulmonares de drenaje, empieza por la presentación de péptidos microbianos por macrófagos y CDs a linfocitos T $CD4^+$; restringidos por moléculas MHC II. Paralelamente otros antígenos micobacterianos como los lípidos de pared se presentan en contexto CD-1 (46). La activación de estos linfocitos T se da a través de sus receptores TLRs, NOD y lectinas tipo C por el reconocimiento de múltiples antígenos micobacterianos dentro de los cuales los más estudiados son ESAT-6 y CFP10 estimulando la secreción de citoquinas pro-inflamatorias prevalentemente como IL-1- β , IL-6, IL-12p40 e IL-21 y $TNF\alpha$ (41, 47) El linaje de los linfocitos T $CD4^+$ es orientado por la IL-12 hacia un perfil Th1 que junto con la subunidad p40 orienta además la diferenciación hacia el linaje Th17 los cuales secretaran IL-17, IL-21 e IL-22 que están relacionadas con actividades antimicrobianas (36, 37).

Las células T que fueron activadas y diferenciadas presentan expansión clonal y migrarán por influencia de diversas citoquinas desde los ganglios linfáticos hasta la zona de infección

pulmonar en donde secretan IFN- γ estimulando la acción de la óxido nítrico sintetasa inducible que producirá óxido nítrico (NO) tóxico (41).

Por otra parte, los linfocitos T DC8+ inducen una respuesta citotóxica hacia las células que fagocitaron las bacterias, por un reconocimiento a los antígenos micobacterianos tanto péptidos como lípidos de pared que fueron presentados en contexto MHC y CD1 respectivamente.

A partir de la manipulación genética del sistema inmune de ratones se ha confirmado el perfil de respuesta tipo 1 frente a la infección por *Mtb*; en el cual, se han detectado *in vitro* altas concentraciones de las citoquinas INF γ , IL 12 e IL 2 característicos del perfil Th1.

Al hacer la delección de los genes del MHC II o del gen β del TCR se obtiene una deficiencia de las células T CD4+ ocasionando mayor susceptibilidad en los ratones a *Mtb* e inclusive a *M. bovis* BCG, por otra parte cuando se hace la delección para el gen del IFN- γ la susceptibilidad aumenta considerablemente respecto a la previa delección del MHC II o del gen β del TCR (47).

El perfil de respuesta predominante frente a una infección por *Mtb* es Th1 según lo anteriormente descrito, sin embargo el perfil Th2 se ha encontrado en pacientes con TB MDR y en niños con TB activa presentando un perfil mayor de IL 4 (47, 48).

5.4.3.2 Respuesta inmune humoral frente a la infección por *Mtb*

Como se ha descrito, la respuesta inmune prevalente a la infección por *Mtb* es mediada predominantemente por la respuesta inmune celular específica Th1. Sin embargo,

recientemente se ha estudiado el papel de la respuesta inmune humoral y se ha encontrado una importante acción moduladora de células B en cuanto a la presentación del antígeno, producción y estimulación de la producción de citoquinas e importantes tasas de variabilidad y concentración de anticuerpos (49).

Por otra parte, se ha descrito que anticuerpos monoclonales contra varios antígenos de superficie micobacterianos, incluyendo LAM (lipoarabinomano) y HBHA (hemaglutinina de unión a heparina), pueden mediar la protección en modelos de ratón frente a la infección con *Mtb*. Recientemente se ha caracterizado molecular y funcionalmente la respuesta de linfocitos B frente a la infección por *Mtb* mediante la generación de anticuerpos monoclonales recombinantes obtenidos de células B aisladas de pacientes con TB activa y de individuos expuestos a *Mtb*. Se encontró que los pacientes con TB activa poseen títulos altos de anticuerpos de los tipos IgA e IgG, los cuales se van incrementando significativamente en el tiempo, además que por acción del tratamiento con antibióticos disminuye la frecuencia de plasmablastos (linfocitos B intermedios en la diferenciación del linaje a células plasmáticas o células de memoria que son capaces de producir anticuerpos y memoria), lo que indica que las hipermutaciones somáticas de los anticuerpos producidos por los linfocitos B son generadas para lograr mayor afinidad del anticuerpos por el antígeno.

Además, los individuos expuestos a *Mtb* presentan una respuesta inmune en la cual los plasmablastos producen anticuerpos específicos contra los antígenos de membrana de *Mtb* como LAM y HBHA lo que demuestra una generación de memoria frente a los antígenos de *Mtb*. Por último, se encontró que los anticuerpos IgA de plasmablastos reactivos a *Mtb* lograron disminuir la infección en un rango del 50 al 75%, por el contrario ninguno de los anticuerpos IgG de plasmablastos logró disminuir la infección, aumentando la carga microbiana sin influir en la replicación natural de *Mtb* en células A549 (49).

5.5 Estado actual de las vacunas contra *Mtb*

Según el informe mundial sobre la tuberculosis 2017, uno de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para 2030, adoptados en el 2015 por las Naciones Unidas, es el de poner fin a la epidemia mundial de tuberculosis (TB). La estrategia Fin a la Tuberculosis presentada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y aprobada en el año 2014 por Asamblea Mundial de la Salud, espera una reducción del 90% de las muertes por TB y una reducción del 80% en su tasa de incidencia para el año 2030, en comparación con 2015 (1).

La creciente incidencia mundial de la tuberculosis, incluida la coinfección con el VIH y la aparición de cepas resistentes a medicamentos, exige nuevos esfuerzos para desarrollar una vacuna segura y eficaz. Por otro lado, los estudios de medicina experimental en modelos animales para tuberculosis, brindan la posibilidad de reducir tiempo y costo en el desarrollo de nuevas vacunas, con mayores posibilidades de éxito en etapas avanzadas (50).

Hasta hoy, la única vacuna existente contra TB es *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), la cual genera una protectividad contra la TB meníngea y miliar en niños induciendo una respuesta inmune celular CD4 y CD8; pero no proporciona ninguna protectividad contra TB en adultos (51) por lo cual se hace necesario el desarrollo de una vacuna contra TB .

Una vacuna eficaz contra la TB puede requerir dos niveles de avances: prevenir nuevas infecciones y reactivar la latencia a corto plazo, y eliminar la infección por *Mtb* por completo a largo plazo (52). Actualmente, el primer grupo de vacunas candidatas en ensayos clínicos, son constructos de BCG recombinante (rBCG), la mejora de la vacuna depende del fortalecimiento de la inmunogenicidad y la persistencia de una cepa recombinante genéticamente modificada de BCG. Por lo tanto, rBCG genéticamente manipulada podría ser más eficiente en comparación con la BCG parental debido a la introducción de algunos fragmentos de ADN (o genes) perdidos durante la atenuación *in vitro* (51); dentro de este grupo esta la VPM 1002 (BCG Δ ureC::hly) que se encuentra en fase clínica Iib (53). El segundo grupo de candidatos comprende vectores virales que expresan uno o más antígenos inmunodominantes de *Mtb*, dentro de este grupo se encuentran los siguientes candidatos (53):

Ad5 Ag85A con vector viral Ad (adenovirus humano 5) que expresa el antígeno de *Mtb* Ag85A y que se encuentra en fase clínica II; ChAdOx1-85A/MVA85A que emplea el vector viral ChAd (adenovirus del chimpancé / virus de la vacuna modificada de Ankara), heterólogo de primera estimulación que expresa el antígeno de *Mtb* Ag85A y se encuentra en fase clínica I; MVA85A con vector viral Virus de la Vaccinia Ankara modificado, intradérmico seguido de aerosol empleado como vacuna de refuerzo que se encuentra en fase clínica I; y TB/FLU-04L que emplea como vector viral el virus de la influenza A y que se encuentra en fase clínica I. El tercer grupo, proteínas recombinantes en formulación de adyuvante, son todas las proteínas de fusión de dos o más antígenos inmunodominantes; dentro de este grupo se encuentran los siguientes candidatos: ID93+GLA-SE (Proteína recombinante de los antígenos de *Mtb* Rv3619, Rv3620, Rv1813 y Rv2608) se encuentra en fase clínica Iib; H1 o H56:IC31 (Proteína recombinante de los antígenos de *Mtb* Ag85B, ESAT-6 [H1]; o Ag85B, ESAT-6, Rv2660c [H56]) que se encuentra en fase clínica II; M72/ASO1E (Proteína recombinante de los antígenos de *Mtb* 32A y 39A), se encuentra en fase clínica Iib y H4:IC31 (Proteína recombinante de los antígenos de *Mtb* Ag85B y TB10.4) que se encuentra en fase clínica II(54).

6. METODOLOGÍA

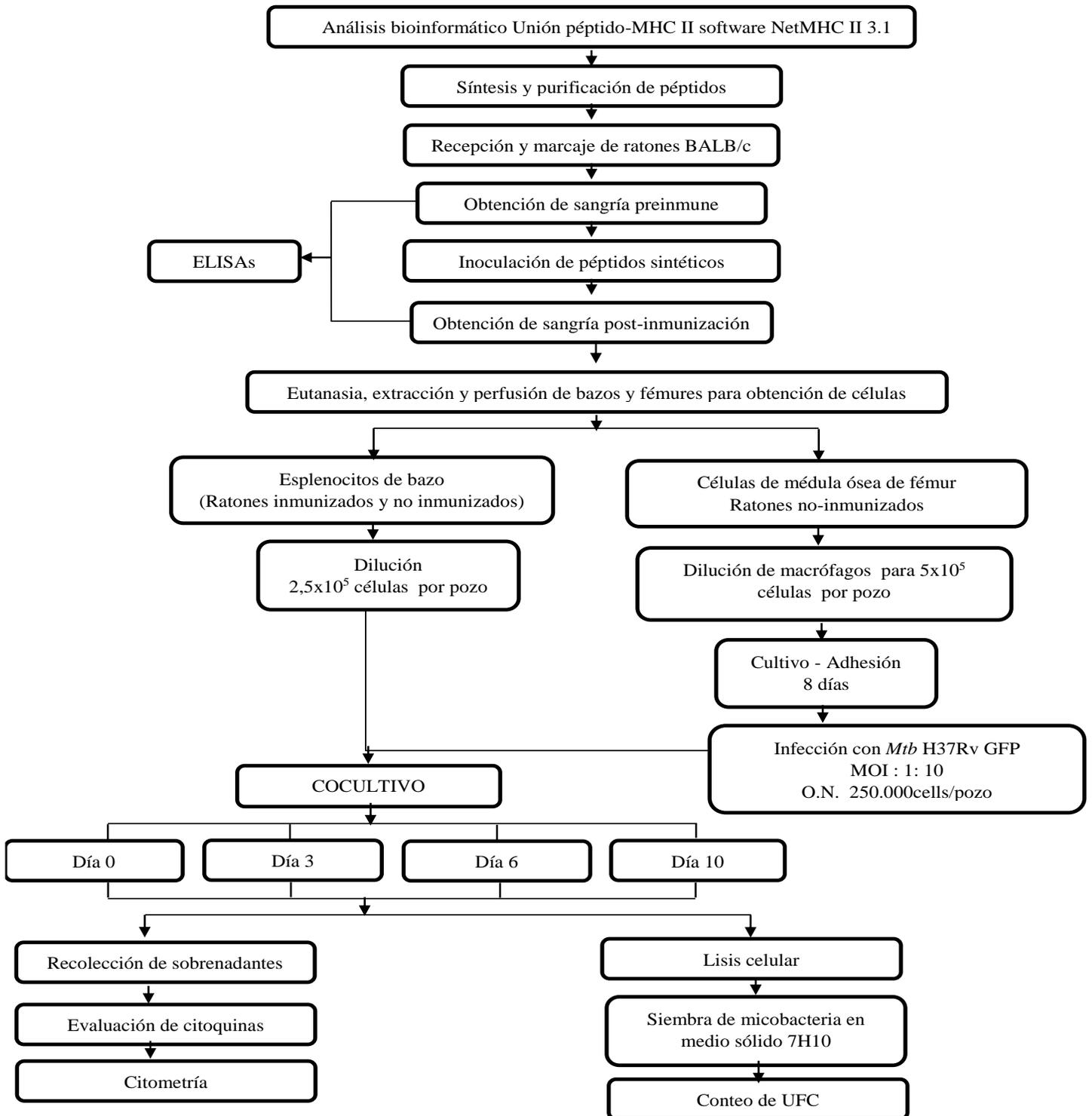


Figura 6. Planteamiento metodológico

El planteamiento general de la metodología que se muestra en la Figura 6, incluyó una primera parte de análisis *in silico* de secuencias peptídicas para la evaluación de su unión a moléculas del MHC II de ratón BALB/c que corresponde al alelo H-2 I-Ad, mediante el software NetMHC IIpan 3.1. Una vez identificados los péptidos que presentan unión al MHC II de ratón se realizó la respectiva síntesis y purificación de los mismos, simultáneamente se llevó a cabo la recepción, el marcaje y las sangrías preinmunes a los ratones a los cuales posteriormente, se les inocularon los péptidos sintéticos.

6.1 Esquema de inoculación

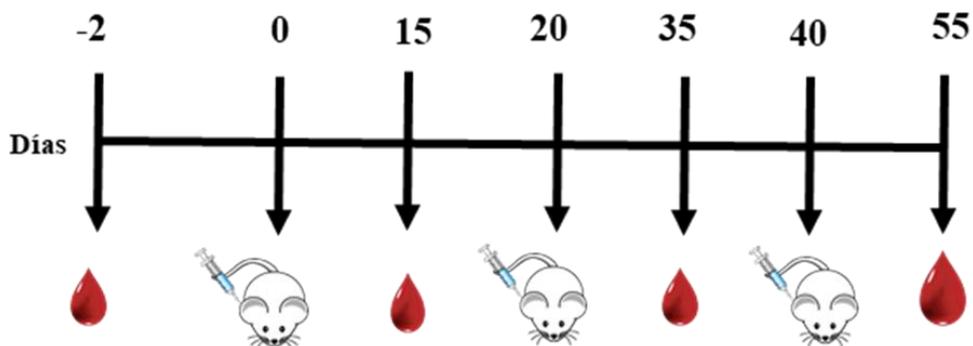


Figura 7. Esquema de inoculación, sangrías y eutanasia

se realizó la sangría preinmune 2 días antes de la primera inmunización, posteriormente 3 inoculaciones cada 20 días y las sangrías 15 días después de las respectivas inoculaciones, finalmente la sangría final y eutanasia se realizó el día 55 (esquema de inoculación). Los sueros obtenidos fueron utilizados para evaluar la producción de anticuerpos por la técnica ELISA. De los ratones inoculados y no inoculados se obtuvieron de los bazo y fémures para la obtención de esplenocitos y macrófagos respectivamente.

Finalmente, se realizó el cocultivo de macrófagos infectados con *Mtb* H37Rv en un MOI 1:10 y los esplenocitos de ratones inmunizados, los sobrenadantes fueron recolectados para la evaluación de citoquinas y las células se lisaron con agua y el lisado fue sembrado en medio sólido 7H10 para evidenciar del crecimiento micobacteriano. Tanto la evaluación de citoquinas como el control de crecimiento de *Mtb* en los macrófagos en cocultivo con los esplenocitos de ratones inmunizados fue realizada a los días 3, 6 y 10 de cocultivo.

A continuación, se hace la descripción detallada de la metodología llevada a cabo:

6.2 Componente bioinformático - Evaluación de la unión de péptidos sintéticos al MHC II a través del uso de herramientas bioinformáticas

Se hizo la evaluación de la presentación y afinidad de unión de los péptidos sintéticos al complejo mayor de histocompatibilidad II usando el software NetMHC IIpan 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>), el cual permite predecir el número de uniones de dichos péptidos al alelo específico de la cepa de ratón BALB/c H-2-IAd del MHC II (55).

Fueron empleadas las secuencias en formato FASTA de los péptidos derivados de las proteínas de superficie de *Mtb* H37Rv Rv0180c, Rv0227c, Rv0679c, Rv1268c, Rv1411c, Rv1490, Rv1911c, Rv1980c, Rv2004c, Rv2270, Rv2301c, Rv2560, Rv2707, Rv3166c, Rv3494c y Rv3629 obtenidas de la base de datos TubercuList (<http://tuberculist.epfl.ch/index.html>). Se analizaron las secuencias completas de las proteínas mencionadas anteriormente y las secuencias de péptidos de alta capacidad de unión específica (HABPs) a células blanco de infección que además son capaces de inhibir la entrada de la micobacteria en ensayos *in vitro*, resultados reportados en estudios previos por la FIDIC (16-25). Se seleccionaron secuencias de 20 aminoácidos con excepción del péptido 40400 que tiene 17 aminoácidos y se clasificaron como de unión fuerte (Rango < 0.5% - 2%) y de unión débil (Rango 2.1% - 10%) estos parámetros pueden ser modificables según

los requerimientos del investigador, pero en esta investigación se siguieron los parámetros establecidos por el software. El análisis comprendió además las secuencias que han sido modificadas de acuerdo con los criterios previamente establecidos en el diseño de la vacuna sintética contra malaria (56), en el cual se basa la aproximación aplicada a tuberculosis.

6.3 Síntesis de péptidos

En el Grupo Funcional de Síntesis de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, se llevó a cabo la síntesis de péptidos derivados de cada una de las proteínas seleccionadas que presentaron unión a moléculas H-2-IAd para el modelo murino BALB/c como consecuencia del resultado del componente bioinformático realizado previamente. Se empleó la técnica de síntesis múltiple de péptidos en fase sólida (57), para lo cual se utilizó, la resina 4-metilbencilhidrilamina, MBH (sustitución 0,7meq/mg) y aminoácidos protegidos con el grupo t-Boc, para la unión del aminoácido a la resina el grupo carboxilo fue convertido a un ester activo mediante tratamiento con activadores como diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) ó por combinación de éstos; en presencia de solventes como diclorometano (DCM), N,N'-dimetilformamida (DMF), Dimetilacetal (DMA) y 1-metil-2-pirrolidona (NMP).

El control de la reacción de acople entre el amino ácido y la resina se realizó por medio de la prueba de Ninhidrina (58). Una vez acoplado el aminoácido se retiró el grupo protector del α -amino mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) al 40 %, para permitir el acople con el siguiente aminoácido. Una vez acoplado el último aminoácido se procede a acetilar este aminoácido mediante tratamiento con anhídrido acético. Finalizado el proceso de síntesis química se procedió a la remoción de los grupos protectores de las cadenas laterales usando ácido fluorhídrico (HF) al 25% en dimetilsulfóxido (DMS) y del péptido de la resina con HF 100% (59). Los péptidos sintetizados se purificaron por HPLC semipreparativa en fase reversa, en un equipo LaChrom Merck Hitachi y en columna C18, usando como fase móvil acetonitrilo y agua. La desalinización de los péptidos se hizo en una

columna de Superdex-Peptide (Amersham- Pharmacia) (60). Para la caracterización de los péptidos por espectrometría de masas se utilizó un espectrómetro de masas Bruker Protein MALDI-TOF, usando como matrices ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CCA).

Para la obtención de los péptidos en forma polimérica se adicionan los aminoácidos Gly-Cys en los extremos N y C de cada secuencia, luego se sometieron a un proceso de oxidación y diálisis para obtener el respectivo polímero de la siguiente manera:

Se disuelve el péptido monomérico a una concentración de 6 mg/mL en agua destilada y desionizada, se ajusta la solución del péptido a un pH alrededor de 7,4. Posteriormente, la solución se mantiene en agitación constante en una atmosfera de oxígeno (99,0% de pureza), el seguimiento de la reacción de polimerización se realiza con la prueba de Ellman para determinar grupos tiol libres. Finalizada la reacción de oxidación, cada uno de los péptidos poliméricos se somete a un proceso de diálisis y posteriormente el péptido polimérico es liofilizado y caracterizado por espectrometría de masas MALDI-TOF.

6.4 Inoculación de ratones BALB/c con los péptidos sintetizados

La cepa de ratones a emplear en este estudio fueron los ratones BALB/c los cuales han demostrado ser una cepa susceptible al contagio de *Mtb* y desarrollo de tuberculosis, presentando un aumento de la carga bacteriana y la difusión en un periodo corto posterior a la infección (61). Se trabajó con ratones hembra de la cepa BALB/ c de aproximadamente 4 semanas de edad, se hizo la respectiva recepción y marcación. Como se observa en la figura 7, se hizo la sangría inicial (suero pre inmune) 2 días antes de la primera inoculación y cada 20 días se realizaron las inoculaciones, 15 días después de éstas se realizaron las respectivas sagrías y la sangría final 15 días después de la tercera inoculación (62). Los ratones fueron mantenidos en las instalaciones de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia las cuales están adecuadas para los procedimientos aquí mencionados y su cuidado.

La alimentación, inoculación, extracción de sangre y sacrificio fue realizado bajo la dirección y acompañamiento del investigador capacitado en dichas áreas. Para las inoculaciones de los péptidos sintetizados se empleó adyuvante incompleto de Freund y cada péptido se inoculó, por vía intraperitoneal, a 3 ratones. La concentración de cada uno de los péptidos fue de 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con un volumen de inóculo de 0.3 mL. Se realizaron 3 inoculaciones y tanto los péptidos como el control de adyuvante se inocularon cada 20 días. Se mantuvieron 3 animales sin inoculación para la obtención de esplenocitos (1 ratón) y macrófagos (2 ratones).

Cabe aclarar que los ratones no fueron retados con la micobacteria, a partir de estos animales obtuvieron los esplenocitos y macrófagos para los respectivos ensayos.

Se siguieron los lineamientos establecidos para el mantenimiento y protocolos de experimentación con los ratones los cuales están regulados bajo los estatutos del título V de la Resolución 008430 de 1993 del MSPS correspondiente a la Investigación Biomédica con Animales en conjunto con la Ley 84 de 1989, en Colombia.

6.5 Obtención de macrófagos derivados de médula ósea y de esplenocitos

Los ratones se colocaron en cámara de éter para anestésarlos y hacer la sangría final, a continuación, se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se extrajeron los bazos para la obtención de esplenocitos tanto de los ratones inmunizados como de los controles respectivos (ratón inoculado con el adyuvante y ratón sin inocular), perfundiendo los bazos con medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina, estreptomina como antibiótico antimicótico, respectivamente.

Además, se extrajeron los fémur de dos ratones no inmunizados para la obtención de macrófagos derivados de médula ósea, posteriormente se perfundieron los huesos con medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico antimicótico. Los macrófagos obtenidos (500.000 células por pozo), se incubaron durante ocho días a 37°C,

5% de CO₂, después de este tiempo se realizaron lavados con medio RPMI para eliminar las células no adheridas. (63, 64)

6.6 Condiciones de seguridad para el cultivo y mantenimiento de *Mtb*

Teniendo en cuenta las características patogénicas de *Mtb* H37Rv se observaron las normas de bioseguridad que incluyen el uso adecuado de los elementos de protección personal que consta de tapabocas N95, traje desechable completo, bata, guantes para cuarto exterior y guantes exclusivos para el trabajo con la micobacteria en la cabina clase II. El almacenamiento de material biológico se limitó a áreas designadas para el trabajo microbiológico y de infección de *Mtb*, la manipulación de micobacterias está restringido a la cabina clase II, que debe estar cubierta con papel absorbente impregnado en fenol al 5% para controlar posibles derrames y así evitar la contaminación de quien esté realizando dicha manipulación. Todos los desechos deben descartarse en los contenedores dispuestos para este fin, en contacto directo con fenol al 5% durante 2 minutos. Durante el procedimiento debe evitarse el contacto directo con fenol debido a que este puede traspasar los guantes e irritar la piel o generar lesiones mayores.

6.7 Cultivo y cosecha de la micobacteria

Para el cultivo de *Mtb* H37Rv, se tomaron 5×10^6 bacterias crioconservadas en glicerol o en PBS 1X, se descongeló y diluyó en 100 μ L de medio Middlebrook 7H9 suplementado con glicerol, Tween 20, y OADC (ácido oléico, albumina, dextrosa y catalasa), el volumen de medio que se empleó ocupó un porcentaje máximo del 30% del envase. Posteriormente se incubó a una temperatura de 37°C en agitación constante. Se realizaron los controles de tinción de Gram y Ziehl Neelsen a los ocho días posteriores al inicio del cultivo y dos días

antes de la fecha programada de cosecha, ésta se llevó a cabo 4 semanas después del inicio del cultivo en la fase logarítmica teniendo en cuenta las curvas de crecimiento de la micobacteria (28).

Para la cosecha de *Mtb*, se transfirieron 35 mL de medio de cultivo a tubos de centrifuga de 50 mL, los cuales se cerraron y se sumergieron en fenol al 5% por 2 minutos, las tapas de cada tubo fueron selladas con Parafilm, se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante en fenol al 5% manteniendo el pellet en el tubo y se repitió el proceso de centrifugación haciendo lavados con PBS acumulando la mayor cantidad de biomasa.

Finalmente, el pellet se resuspendió en 5 mL de buffer PBS y se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL los cuales se envolvieron en servilletas impregnadas de fenol, se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm y se crioconservaron a -80 °C según los procedimientos internos de la FIDIC.

6.8 Recuento de micobacterias

El recuento de bacterias se realizó a partir de la transmitancia obtenida de una alícuota de 5 mL de muestra de la bacteria previamente cosechada y criopreservada, leída por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. Posteriormente se aplicó la ecuación de la recta resultante de la curva realizada para la cepa H37Rv de *Mtb* para el cálculo del número de micobacterias.

6.9 Tinción de Ziehl Neelsen

Para la tinción de Ziehl Neelsen, que permite la identificación de bacterias ácido alcohol resistentes, se colocó una gota de suspensión bacteriana sobre una lámina porta objetos y se expandió, se dejó secar y se fijó flameando la lámina con un mechero durante un minuto.

Las láminas se dejaron toda la noche en exposición a radiación UV, luego se impregnaron con fenol para su tinción. Posteriormente la lámina se ubicó en la caja metálica que sirve como colector de desechos de colorantes, dentro de la cabina de extracción para evitar exposición a vapores de fenol. Se agregó, sobre toda la superficie de la lámina, la fucsina fenicada de Ziehl Nielsen, se flameó durante 5 minutos, después de evidenciar desprendimiento de vapores, se lavó con abundante agua para eliminar la totalidad de la solución del colorante. Posteriormente se cubrió la lámina con la mezcla ácido-alcohol por 3 minutos y se realizó nuevamente el lavado de la misma, luego se cubrió la lámina con azul de metileno por 1 minuto y se realizó otro lavado de la lámina. Finalmente, se dejó secar a temperatura ambiente y se observó al microscopio empleando el objetivo de 100 X y aceite de inmersión. El género *Mtb* se observa en la lámina como bacilos largos de color rosado-fucsia (14).

6.10 Tinción de Gram

Para la tinción de Gram, que permite realizar controles microbiológicos de los cultivos, se hizo la misma preparación de la muestra de la bacteria sobre la lámina porta objetos; una vez la lámina ha salido de la zona restringida para manejo de micobacteria como se describió anteriormente, se añadió cristal violeta por 1 minuto, se lavó con agua hasta eliminar la totalidad del colorante, posteriormente se vertió sobre la lámina solución de Lugol por 1 minuto y se lavó con la mínima cantidad de agua asegurándose de retirar la totalidad de la solución de Lugol. Luego se cubrió la lámina con acetona – alcohol por 15 segundos y se lavó con agua hasta que el efluente fuera incoloro, se cubrió la lámina con Fushina de Gram y se dejó actuar por 30 segundos, se lavó con agua y se dejó secar.

Posteriormente se observó al microscopio empleando un objetivo de 100 X y aceite de inmersión.

6.11 Infección de macrófagos

Las células obtenidas a partir de los lavados de los fémur de los ratones, fueron recolectadas en un tubo Falcon en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado.

Se tomó una alícuota para realizar el conteo celular, para lo cual se colocó una dilución 1: 10 en azul de tripán (1 μ L de células/ 9 μ L de azul de tripán) y se colocó 1 μ L de la mezcla en la cámara de Neubauer.

El número real de células viables se calculó de la siguiente manera

$$\text{Número de células} = X * FD * FC * VM$$

Siendo, X = número de células contadas en 4 cuadrículas de la cámara / 4

FD = factor de dilución utilizado

FC = factor de dilución de la cámara de Neubauer

VM = volumen de la muestra

Se colocaron 5×10^5 macrófagos por pozo en placas de 96 pozos. Después de 8 días de cultivo a 37°C y 5% de CO₂ se realizaron 3 lavados por pozo con RPMI para eliminar las células no adheridas, posteriormente se infectaron con 5×10^6 micobacterias (MOI 1:10). Al día siguiente se retiró el medio y se lavaron 3 veces con PBS 1X cada uno de los pozos que contenían los macrófagos infectados.

6.12 Co – cultivo de esplenocitos de ratones inmunizados con macrófagos infectados con *Mtb*.

En cada uno de los pozos donde se tenían los macrófagos infectados, se colocaron $2,5 \times 10^5$ esplenocitos tanto de los ratones inmunizados con los péptidos como de los ratones no inmunizados (controles). respectivamente y se sembró el control de infección del día 0, se realizaron controles de infección para los días 3, 6 y 10 después de iniciar el cocultivo, los cuales se mantuvieron hasta el día 10.

El cocultivo se realizó con la finalidad de medir en un ensayo *in vitro*, la actividad protectora de los péptidos candidatos a vacuna, a través de la evaluación de la capacidad de los esplenocitos inmunes para controlar el crecimiento micobacteriano (62).

6.13 Conteo de micobacteria

Para el conteo de UFC se lisaron las células con 100 μ L de agua destilada estéril y se sembró la mitad del contenido total del pozo en cajas de medio sólido Middlebrook 7H10 suplementado con asparagina, glicerol y OADC, además, como control de contaminación se sembraron alícuotas de agua, PBS y medio utilizado y los controles ambientales de la cabina (62).

El conteo para determinar el crecimiento de la micobacteria se realizó 24 días después de sembrar los lisados de los cocultivos evaluados a los días 3, 6 y 10. para la bacteria crecida en el medio líquido se llevó a cabo lectura por citometría de flujo (BD FACS Canto II) mientras que para la bacteria de cultivo en medio sólido Middlebrook 7H10 se hizo el conteo directo de UFC observables.

Los ensayos se hicieron por triplicado y se tuvieron en cuenta las desviaciones estándar entre las réplicas.

6.14 Evaluación de citoquinas en el sobrenadante de cocultivo

El sobrenadante del cocultivo para los días 3, 6 y 10 se recolectó y se filtró por membranas de 0.2 μm para ser utilizado en el análisis de citoquinas por citometría de flujo, empleando el BD™ CBA Mouse Th1/Th2 Cyokine Kit; el cual permite determinar citoquinas como la IL2 como señal de supervivencia de los linfocitos T y de perfiles Th1 como $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ y del perfil Th2 como la IL-4 que serían generadas por la inmunización con los péptidos y posterior respuesta inmune adaptativa frente a la infección por *Mtb*.

El kit contiene reactivos estándar de anticuerpos para el reconocimiento de las citoquinas de ratón, conjugados con ficoeritrina (PE) que generaran una señal fluorescente proporcional a la cantidad de citoquinas presentes (pg/mL) (65)

6.15 Determinación de anticuerpos por ensayo de ELISA.

Se llevó a cabo la determinación de anticuerpos que reconocen los péptidos originales, modificados y lisado de micobacteria en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con los péptidos sintéticos (por triplicado). El suero pre inmune se empleó como control negativo y el suero de un ratón inoculado con lisado de *Mtb*, fue el control positivo.

Los tiempos, diluciones y concentraciones se basaron en protocolos establecidos por la FIDIC.

Para la inmovilización del antígeno (péptido original, modificado y lisado de micobacteria) se colocaron 100 μL de antígeno a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en cada pozo (por triplicado), utilizando una caja para ELISA de 96 pozos y se incubó por 1 hora a 37°C, se descartó el contenido de los pozos y se lavó 3 veces con solución de lavado (PBS – Tween

20 al 0,5%) y un enjuague final con agua destilada. Posteriormente se secaron los pozos golpeándolos suavemente contra una toalla absorbente.

Para el bloqueo de sitios libres, se adicionaron 200 μL de solución de bloqueo (leche descremada 5%, Tween 20 al 0,5% en PBS1x) en cada pozo, se incubó por 1 hora a 37 °C, pasado este tiempo se descartó el contenido del pozo y se hicieron 3 lavados con solución de lavado y un enjuague final con agua destilada. Posteriormente se secaron los pozos golpeándolos suavemente contra una toalla absorbente.

Luego se adicionaron 100 μL del anticuerpo primario (sueros de los ratones inmunizados) en una dilución 1: 100 y se incubó a 37°C durante 2 horas, se descartó el contenido de cada pozo y se hicieron los lavados como se mencionó anteriormente, después se adicionaron 100 μL de una dilución de 1:5000 del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano, se incubó por 1 hora a 37°C se descartó el contenido de los pozos y se hicieron los respectivos lavados como se indicó anteriormente.

Para el revelado se adicionaron 100 μL de solución de revelado del kit TMB (que emplea 3,3',5,5'-tetrametilbencidina como sustrato de la enzima), se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, para detener la reacción se adicionaron 50 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N. La lectura se realizó a una longitud de onda de 450 nm (66, 67).

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación *in silico* de la unión de péptidos sintéticos al MHC II.

Se analizaron con el software NetMHC IIpan 3.1 las 19 secuencias de péptidos derivados de las proteínas de superficie de *Mtb* Rv0180c, Rv0227c, Rv0679c, Rv1411c, Rv1490, Rv2270, Rv2301c, Rv2560, Rv2707, Rv3166c, Rv3494c y Rv3629 seleccionados con base en resultados de estudios previos realizados en FIDIC. Los péptidos se han reportado como de alta capacidad de unión específica a células blanco de infección (HABPs) que logran disminuir significativamente la entrada de *Mtb* H37Rv a la célula hospedera, indicando que pueden ser funcionalmente importantes en la interacción hospedero- patógeno (16-18, 20, 23-27, 30).

Inicialmente se analizaron en el software las secuencias peptídicas correspondientes a 18 péptidos no modificados (tabla 2), que dieron lugar a 19 secuencias modificadas, teniendo en cuenta que del péptido original 16951 de la proteína Rv0227c se obtuvieron 2 secuencias modificadas correspondientes a los péptidos 40394 y 40396 (tabla 3). Los péptidos fueron modificados para generar un mejor acoplamiento a los bolsillos de unión 1, 4, 6 y 9 del MHC II y así induciendo unión para que se genere la respuesta inmune de acuerdo con las reglas establecidas y ampliamente divulgadas en el desarrollo de la vacuna sintética contra malaria (56).

Cuando se analizaron en el software NetMHC IIpan 3.1 las secuencias de los péptidos originales (sin modificaciones), se encontró que con el alelo H-2-IAd específico de los ratones BALB/c, 2 péptidos (16084 y 31039) presentaron unión débil al MHC II (tabla 2), éstos péptidos presentan un valor de Rango de 7.50 y 10.00 respectivamente y son clasificados como de unión débil (WB).

Tabla 2. Análisis de secuencias de péptidos originales de proteínas de superficie de *Mtb* H37Rv, por el software NetMHC II 3.1

PROTEINA	PEPTIDO ORIGINAL	SECUENCIA	H-2-IA _d					
			1- log50k	Afinidad (nM)	Secuencia de unión	N° uniones	Nivel de unión	% Rango
Rv0180c	31024	AALYLGILNPMTNLRHFPI	0.275	2541.44	LNPMTNLRH	0		19.00
	31025	ALVNEDAGPAGQQIVDGLVSY	0.166	8265.48	LVNEDAGPA	0		70.00
	31028	RDFGASAVTPTRTDRPAITI	0.211	5115.88	FGASAVTPT	0		44.00
	31039	LGLPSAGATVPLEAVPAFFRY	0.312	1706.48	TVPLEAVPA	1	WB	10.00
Rv0227c	16951	AQPPPPDAGHPDPGPPERRY	0.026	37872.91	GHPDPGPPE	0		95.00
Rv0679c	30987	YKNGDPTIDNLGAGNRINKE	0.116	14239.66	IDNLGAGNR	0		95.00
Rv1411c	37096	APPFNATQPVPATVWIQETGY	0.240	3723.85	fNATQPVPA	0		31.00
Rv1490	11073	FGRVESHADYHDWVCEHVTP	0.093	18290.84	FGRVESHAD	0		95.00
Rv2270	37775	TSSNGARGGIASTNMNPTNPY	0.137	11315.28	IASTNMNPT	0		85.00
	37777	ETWINLQVGDTLADLPPADLY	0.206	5388.95	NLQVGDTLA	0		47.00
Rv2301c	30960	CPNTRLVPGGYSLGAAVTDV	0.172	7756.01	YSLGAAVTD	0		65.00
Rv2560	11024	VVALSDRATTAYTNTSGVSS	0.252	3280.59	DRATTAYTN	0		26.00
Rv2707	16084	RIGVGTTTYSSSTAQHSAAVY	0.331	1396.51	YSSTAQHSA	1	WB	7.50
Rv3166c	16295	LITSRRQRKSAPARISGDRIY	0.222	4531.24	RKSAPARIS	0		39.00
	16298	MERELSHVPGVAPQDFDTPY	0.143	10630.58	LSHVPGVAP	0		80.00
	16300	VSLFAEARFSPHMNEEHREY	0.224	4438.46	FAEARFSPH	0		38.00
Rv3494c	38373	HMLNSGTAIPSNVTATVRSY	0.299	1978.23	LNSGTAIPS	0		13.00
Rv3629	16645	VFPLAIWTTAGLDPVRAME	0.264	2862.72	TAGLDPVRA	0		22.00

A continuación, fueron analizados con el mismo software las 19 secuencias peptídicas modificadas encontrando que 5 péptidos presentan unión al MHC II I- Ad, alelo específico de ratón de la cepa BALB/c. 4 de estos péptidos de las proteínas Rv1411c (40400), Rv3166c (40412), Rv0180c (40422) y Rv3494c (40448) tienen unión débil; presentando un porcentaje

de rango superior al 2% y solo el péptido modificado 40408 de la proteína Rv3166c presenta unión fuerte con un porcentaje de rango de 1.30%. (tabla 3)

Una vez realizado el análisis bioinformático se seleccionaron los péptidos 40400 (derivado de 37096), 40408 (derivado de 16295), 40412 (derivado de 16300), 40422 (derivado de 31039) y 40448 (derivado de 38373) para ser sintetizados en forma polimérica obteniéndolos con una pureza mayor al 70%.

Sólo para el péptido original 31039 (Rv0180c) y su modificado 40422 (Rv0180c) se encontró predicción de unión a la molécula I-Ad aunque con un epitope (secuencia de unión) diferente para cada uno TVPLEAVPA y FAGATPPLE respectivamente, presentando los dos unión débil (WB) y con valor de rango de 10%.

El péptido nativo 31039 ($^{341}\text{LGLPSAGATVPLEAVPAFFRY}^{360}$) y el correspondiente péptido modificado 40422 (LGLPFAGATPPLEALPSFFRY) para el cual las modificaciones realizadas se hicieron puntualmente en los aminoácidos $\text{S}^{345} \rightarrow \text{F}$; $\text{V}^{350} \rightarrow \text{P}$; $\text{V}^{355} \rightarrow \text{L}$; $\text{A}^{357} \rightarrow \text{S}$ son los únicos péptidos evaluados que tuvieron unión al MHC II alelo específico I-Ad, tanto en su secuencia original como en la secuencia modificada, sin embargo, el epitope T varía entre ellos y solo se conserva como epitope la secuencia de aminoácidos $^{351}\text{PLE}^{353}$. La modificación de los péptidos se hace con la sustitución de aminoácidos de igual volumen y diferente polaridad con el fin de romper el silencio inmunológico e inducir una respuesta inmune protectora (10), en la tabla 4 se resaltan las modificaciones puntuales realizadas a los 5 péptidos seleccionados.

Tabla 3. Análisis de secuencias de péptidos modificados de proteínas de superficie de *Mtb* H37Rv, por el software NetMHC IIpan 3.1

PROTEINA	PEPTIDO ORIGINAL-PEPTIDO MODIFICADO	SECUENCIA	H-2-IAd					
			1-log50k	Afinidad (nM)	Secuencia de unión	Nº uniones	Nivel de unión	% Rango
Rv0180c	31024-40416	AALYLDPKLNPKTNLRHFPI	0.132	2046.81	LNPKTNLRH	0		85.00
	31025-40418	GPAGQQIVDGLQSLGPMNLF	0.260	2997.72	LQSLGPMNL	0		23.00
	31039-40422	LGLPFAGATPPLEALPSFFRY	0.312	1703.60	FAGATPPLE	1	WB	10.00
	31028-40424	SSQLRPFQSAQRPTRTDRP	0.206	5368.46	LRPFGSAQR	0		47.00
Rv0227c	16951-40394	PLFSGSQPPPSQDAGHPDPG	0.122	13392.05	FSGSQPPPS	0		90.00
	16951-40396	PLFSGSQPPDSQDAGHPDPG	0.102	16558.36	FSGSQPPDS	0		95.00
Rv0679c	30987-40450	LGAGPYKPLDNLKSNLGAGN	0.225	4395.36	LDNLKSNL	0		37.00
Rv1411c	37096-40400	PDFNALQVPVSTQWIQE	0.338	1292.70	FNALQVPS	1	WB	4.50
Rv1490	11073-40402	FGRVESHADFHPFQSQHRSP	0.138	11201.50	FHPFQSQHR	0		85.00
Rv2270	37775-40428	ARGGLSADPKPNRGPPATAE	0.072	22909.69	LSADPKPNR	0		95.00
	37777-40430	WIPQLQGDTRAPPPADLSR	0.109	15326.50	LQGDTRAPR	0		95.00
Rv2301c	30960-40442	SMANSTPNTRLQPFQSSLSA	0.252	3266.96	LQPFQSSLS	0		26.00
Rv2560	11024-40404	ALSDRATPAFTPTSGVSSK	0.182	6962.96	DRATPAFTP	0		60.00
Rv2707	16084-40406	RIGVGTPDFSASDLSVAAA	0.259	3040.65	FSASDLSV	0		24.00
Rv3166c	16295-40408	SELTALRRLKSPASLRSGDR	0.415	558.30	LRRLKSPAS	1	SB	1.30
	16298-40410	MERELSLVPGAQPQDFDPTY	0.192	6265.50	LSLVPGAQP	0		55.00
	16300-40412	LQSLRAMKRLPSHQMNNEHR	0.391	725.90	LRAMKRLPS	1	WB	2.50
Rv3494c	38373-40448	AHMRLRSGPSLQADQKGTRQ	0.344	1215.07	LRSGPSLQA	1	WB	6.00
Rv3629	16645/6-40414	WTTAGLDDPVVRAMALRPPAHG	0.299	1961.86	VRAMALRPP	0		13.00

Los animales de estudio se dividieron en 2 grupos experimentales, como se muestra en la tabla 4. Esta división se hizo para controlar el tamaño de la muestra y el trabajo de los tratamientos respectivos. Los péptidos inoculados corresponden a las formas poliméricas de las secuencias modificadas a partir de los péptidos nativos. (tabla 2 y 3)

Tabla 4. Organización grupal de ratones para inoculación.

	Número de ratón	Proteína	Péptido nativo	Secuencia del péptido nativo	Péptido inoculado	Secuencia del péptido modificado, inoculado
CONTROLES	1, 18	AIF	-	-	-	-
	3, 4	-	-	-	-	-
GRUPO 1	8 – 10	Rv3166c	16295	<u>L</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>Y</u>	40408	CG <u>S</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>C</u>
	11 – 13	Rv3166c	16300	<u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>Y</u>	40412	CG <u>L</u> <u>O</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>C</u>
	14 – 16	Rv0180c	31039	<u>L</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>Y</u>	40422	C <u>G</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>C</u>
GRUPO 2	5 – 7	Rv1411c	37096	<u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u>	40400	CG <u>P</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>C</u>
	17, 2, 19	Rv3494c	38373	<u>H</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>Y</u>	40448	CG <u>A</u> <u>H</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>O</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>O</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>O</u> <u>G</u> <u>C</u>

AIF: Adyuvante incompleto de Freund. Los ratones 3 y 4 fueron seleccionados para la obtención monocitos derivados de médula ósea por tanto no recibieron ningún tratamiento.. Los aminoácidos subrayados corresponden a las modificaciones que se realizaron de los péptidos nativos.

7.2 Obtención de macrófagos derivados de médula ósea y esplenocitos

En promedio se obtuvieron $5,6 \times 10^6$ monocitos derivados de médula ósea de los fémures y tibias de ratones que no fueron inmunizados, con una viabilidad superior al 95%, de los cuales se sembraron 5×10^5 macrófagos ($M\Phi$) por pozo; éstas fueron presentando cambios morfológicos y de adherencia al pozo durante los 8 días de cultivo. En la imagen A de la figura 8 que corresponde al primer día de cultivo se observan células esféricas que a los días 3 y 5 ya presentan alargamiento en su estructura como se observa en las imágenes B y C. En las imágenes D y E, que son los dos últimos días de cultivo antes de la infección con *Mtb*, es evidente la formación de pseudópodos y el cambio característico de la morfología alargada y adherente de los macrófagos.

Para el caso de los esplenocitos se obtuvieron un promedio de $8,4 \times 10^6$ células por bazo de cada ratón, con un porcentaje de viabilidad del 87%, de los que se cocultivaron $2,5 \times 10^5$ células por pozo con los macrófagos infectados con *Mtb* H37Rv.

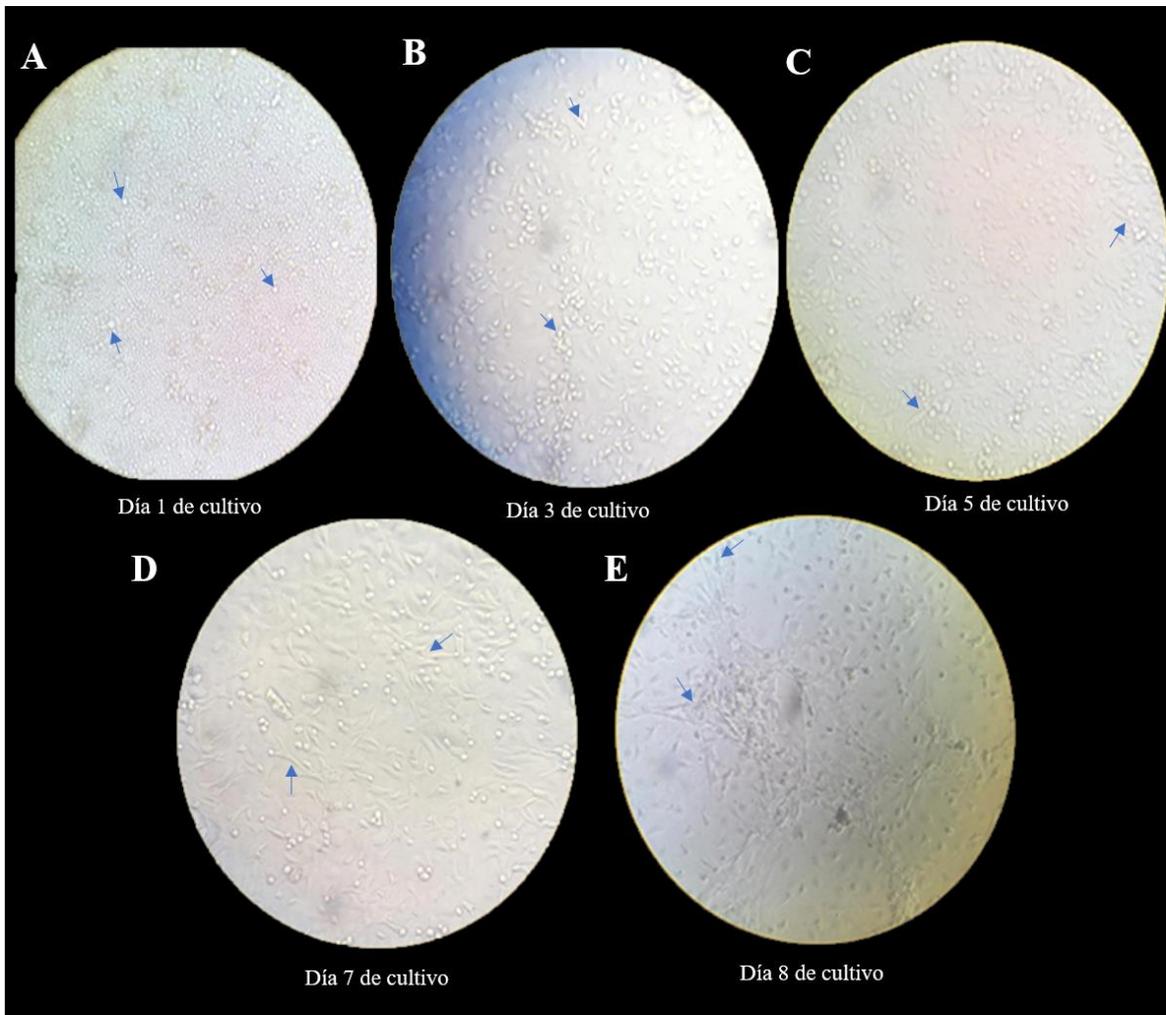


Figura 8. Cambio morfológico de monocitos derivados de medula ósea de ratones BALB/c.

La transformación gradual de la morfología celular se da en un periodo de tiempo de 8 días. En los días del 1 al 3 de cultivo (A- B) se observan células esféricas que se van agrupando en el transcurso del tiempo; a partir del día 5 (C-D) se empieza a evidenciar un alargamiento de las células. Finalmente, el día 8 de cultivo (E) las células presentan forma de pseudópodos con mayor adherencia al fondo del pozo.

7.3 Tinción de Ziehl Neelsen y Tinción de Gram

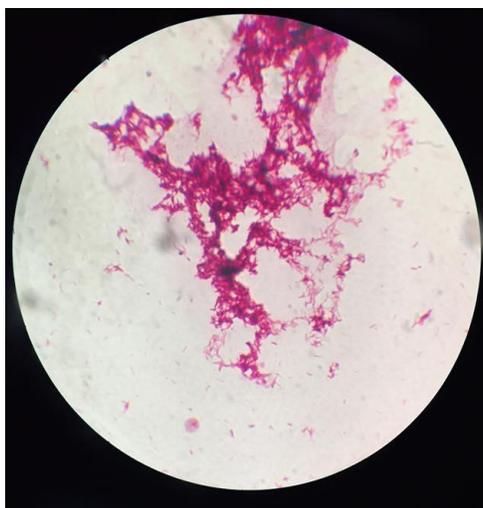


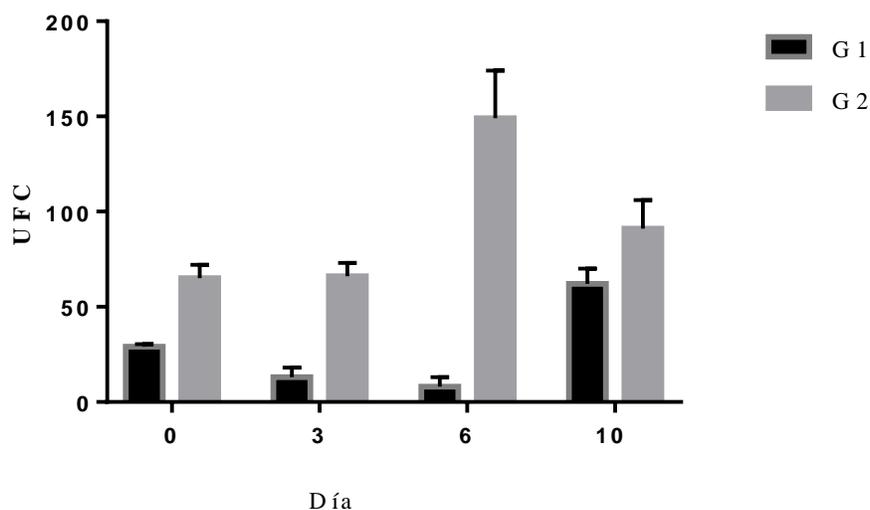
Figura 7. Tinción de Ziehl Neelsen de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Los resultados de las tinciones de Gram y de Ziehl Neelsen mostraron que el cultivo no se contaminó por otro microorganismo y como se evidencia en la figura 7 la micobacteria formó agregados en forma de letras chinas característico del crecimiento de la *Mtb*. El cultivo alcanzó la fase logarítmica de crecimiento a los 24 días de cultivo, tiempo característico para estas micobacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

7.4 Co – cultivo de esplenocitos de ratones inmunizados con macrófagos infectados con *Mtb* y conteo de UFC

El cocultivo permitió evaluar la inhibición del crecimiento intracelular de la micobacteria en los macrófagos infectados en presencia de esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 (Rv1411c), 40408 (Rv3166c), 40412 (Rv3166c), 40422 (Rv0180c) y 40448 (Rv3494c).

El conteo de UFC fue posible hasta 24 días después de haber sembrado el lisado celular de los macrófagos infectados (controles) en medio sólido Middlebrook 7H10 y luego el lisado de los cocultivos de los días 3, 6 y 10 de los macrófagos infectados con los esplenocitos de ratones inmunizados

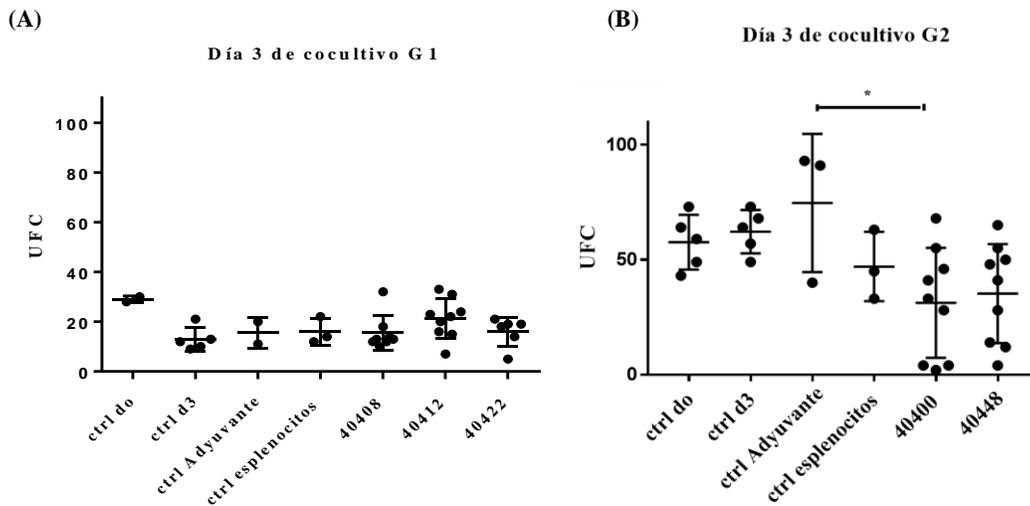


Gráfica 1. Control de infección en macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c con *Mtb* H37Rv. Para cada control se realizaron 5 réplicas.

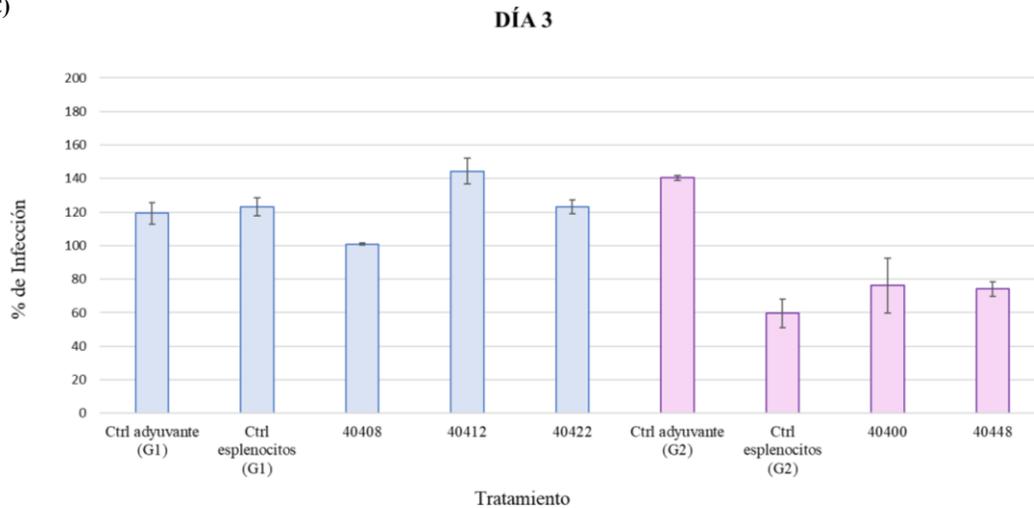
Como se observa en el conteo de UFC de los controles de infección (Gráfica 1); es decir, los macrófagos infectados con *Mtb* sin presencia de esplenocitos, hay una disminución para el G1 entre los días 0, 3 y 6 del cultivo de ~45 y ~50 UFC respectivamente, por el contrario en el día 10 hay un aumento en el número de UFC; mientras que en el G2 no hay cambio de las UFC entre los días 0 y 3 pero a partir del día 6 se presenta un incremento de la carga micobacteriana intracelular hasta el día 10 de cultivo. El grupo G2 presentó una mayor cantidad de UFCs respecto al grupo G1 en los tiempos observados.

Por otra parte, cuando se llevó a cabo el cocultivo de los macrófagos infectados con los esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados, se encontró que el conteo de UFC para el día 3 no presentó variaciones en presencia de los esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40408, 40412 y 40422 ni con los controles de adyuvante, respecto a los controles de infección para ese día de cocultivo (gráfica 2A). En el G2, al comparar los conteos del

control de infección, hay una disminución del ~25% cuando se lleva a cabo el cocultivo con los esplenocitos de ratones inmunizados tanto con el péptido 40400 como con los inmunizados con el péptido 40448 (gráfica 2B y 2C), también se observa que con los esplenocitos de los ratones inmunizados con el adyuvante se presenta un incremento de cerca del 40% de UFC, mientras que en presencia de los esplenocitos de ratones sin ningún tratamiento hay una disminución del 40% en las UFC; es decir, que los esplenocitos de ratones no inmunizados logran disminuir la infección; sin embargo como se describió en la figura 16, los esplenocitos de los ratones inmunizados disminuyen la infección más eficientemente que los esplenocitos de ratones no inmunizados respecto al control de infección para el día 3 de cocultivo.

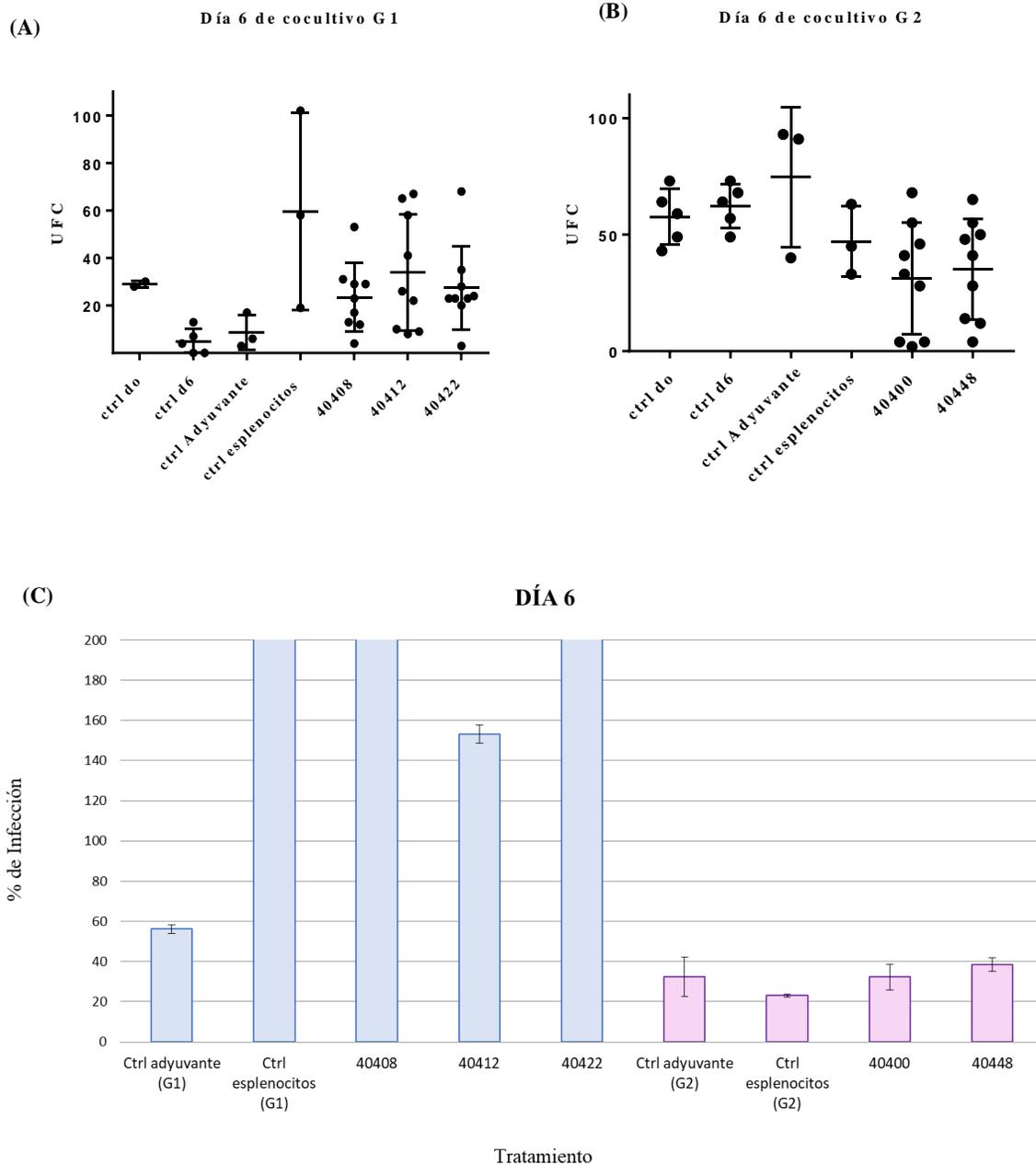


(C)



Gráfica 2. Crecimiento de *Mtb* H37Rv en macrófagos en el día 3 de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400, 40408, 40412, 40422 y 40448. (A) conteo de UFC en el grupo 1 (G1) correspondiente al cocultivo de MΦ infectados con *Mtb* H37Rv con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40408 (Rv3166), 40412 (Rv3166) y 40422 (Rv0180c). (B) conteo de UFC en el grupo 2 (G2) correspondiente al cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 (Rv1411c) y 40448 (Rv3494c). Cada grupo de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con péptidos tiene 9 réplicas y sus propios controles; por tanto, se tiene el control de infección del día 0 y del día 3 (ctrl d0 y d3) para los cuales se hicieron 5 réplicas en cada grupo experimental (G1 y G2), así como los controles de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con AIF (ctrl adyuvante) y el control de cocultivo con esplenocitos del ratón sin inoculación de ningún tipo (ctrl esplenocitos) que se trabajaron por triplicado. (C) Porcentaje de infección en el día 3 de cocultivo.

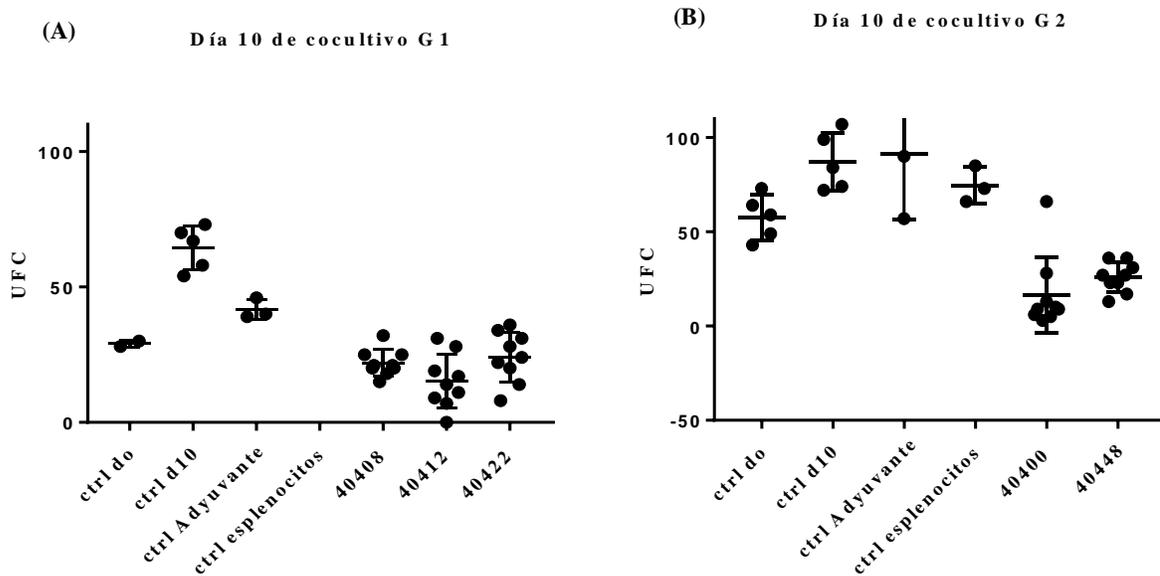
En el día 6 en el cocultivo con los esplenocitos de los ratones inmunizados con los péptidos 40408, 40412 y 40422 (gráfica 3A y 3C) se obtuvo un aumento del 166% en promedio de UFC respecto al control de infección y al control de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con adyuvante del mismo grupo. Contrariamente en el G2 (gráfica 3B y 3C) hay una disminución del 65% de UFC respecto al control de infección cuando se hace el cocultivo con esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 y 40448 (gráfica 3B y 3C). En los controles de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con adyuvante hay una disminución del 67% de UFC también respecto al control de infección para el día 6 del cocultivo.

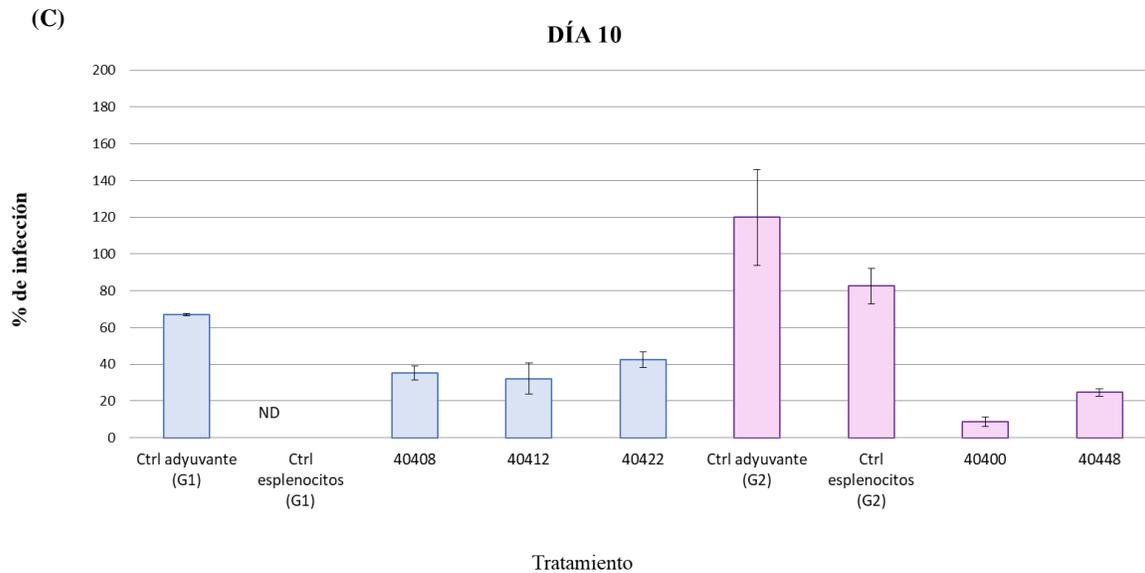


Gráfica 3. Crecimiento de *Mtb* H37Rv en macrófagos en el día 6 de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400, 40408, 40412, 40422 y 40448. (A) conteo de UFC en el grupo 1 (G1) correspondiente al cocultivo de MΦ infectados con *Mtb* H37Rv con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40408 (Rv3166), 40412 (Rv3166) y 40422 (Rv0180c). (B) conteo de UFC en el grupo 2 (G2) correspondiente al cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 (Rv1411c) y 40448 (Rv3494c). Cada grupo de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con péptidos tiene 9 réplicas y sus propios controles; por tanto, se tiene el control de infección del día 0 y del día 6 (ctrl d0 y d6) para los cuales se hicieron 5 réplicas en cada grupo experimental (G1 y G2), así como los controles de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con AIF (ctrl adyuvante) y el control de

cocultivo con esplenocitos del ratón sin inoculación de ningún tipo (ctrl esplenocitos) que se trabajaron por triplicado. (C) Porcentaje de infección en el día 6 de cocultivo.

En el día 10 se evidenció una reducción general de las UFC en los dos grupos (gráficas 4A, 4B y 4C); en el G1 se tiene una disminución del ~74%. el cocultivo con los esplenocitos de los ratones inmunizados con los péptidos 40408, 40412 y 40422 que en los días anteriores de cocultivo (días 3 y 6) no habían presentado una disminución representativa de las UFC. Por otra parte, en el G2 hubo un de incremento de 16% de micobacterias intracelulares en los controles de infección si se compara con el conteo del día 0 y con los tratamientos se obtuvo una disminución del ~91% de las UFC con los esplenocitos inmunizados con el péptido 40400 de la proteína Rv1411c y del ~75% de las UFC en el cocultivo con los esplenocitos de los ratones inmunizados con el péptido 40448 la proteína Rv3494c.





Gráfica 4. Crecimiento de *Mtb* H37Rv en macrófagos en el día 10 de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400, 40408, 40412, 40422 y 40448. (A) conteo de UFC en el grupo 1 (G1) correspondiente al cocultivo de MΦ infectados con *Mtb* H37Rv con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40408 (Rv3166), 40412 (Rv3166) y 40422 (Rv0180c). (B) conteo de UFC en el grupo2 (G2) correspondiente al cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 (Rv1411c) y 40448 (Rv3494c). Cada grupo de ratones tiene 9 réplicas y tiene sus propios controles; por tanto, se tiene el control de infección del día 0 y del día 10 (ctrl d0 y d10) para los cuales se hicieron 5 réplicas en cada grupo experimental (G1 y G2), así como los controles de cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con AIF (ctrl adyuvante) y el control de cocultivo con esplenocitos del ratón sin inoculación de ningún tipo (ctrl esplenocitos) que se trabajaron por triplicado con excepción del G1 para el cual no se pudo determinar (ND) por que se acabaron los esplenocitos. (C) Porcentaje de infección en el día 10 de cocultivo.

7.5 Evaluación de citoquinas en el sobrenadante de cocultivo

Para la cuantificación de citoquinas con el kit BD™ CBA Mouse Th1/Th2 Cyokine, se emplearon los sobrenadantes de cocultivo con los esplenocitos de los ratones inmunizados con los péptidos 40400 y 40448 (tabla 4), los cuales lograron inhibir el crecimiento de la micobacteria en los macrófagos infectados de forma constante y representativa en los días 3, 6 y 10 de cocultivo (gráficas 2, 3 y 4) alcanzando una reducción del 83% de UFC en promedio en el día 10 respecto a los controles de infección. Para este análisis no se evaluaron los sobrenadantes del ratón 7 inoculado con el péptido 40400 ni los sobrenadantes del ratón 19

inoculado con el péptido 40448 debido a que los datos de sus réplicas presentaron muy altas desviaciones.

En concordancia con los resultados obtenidos en cuanto al control de la infección de *Mtb* se seleccionaron los sobrenadantes de cocultivo con los esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 y 40448.

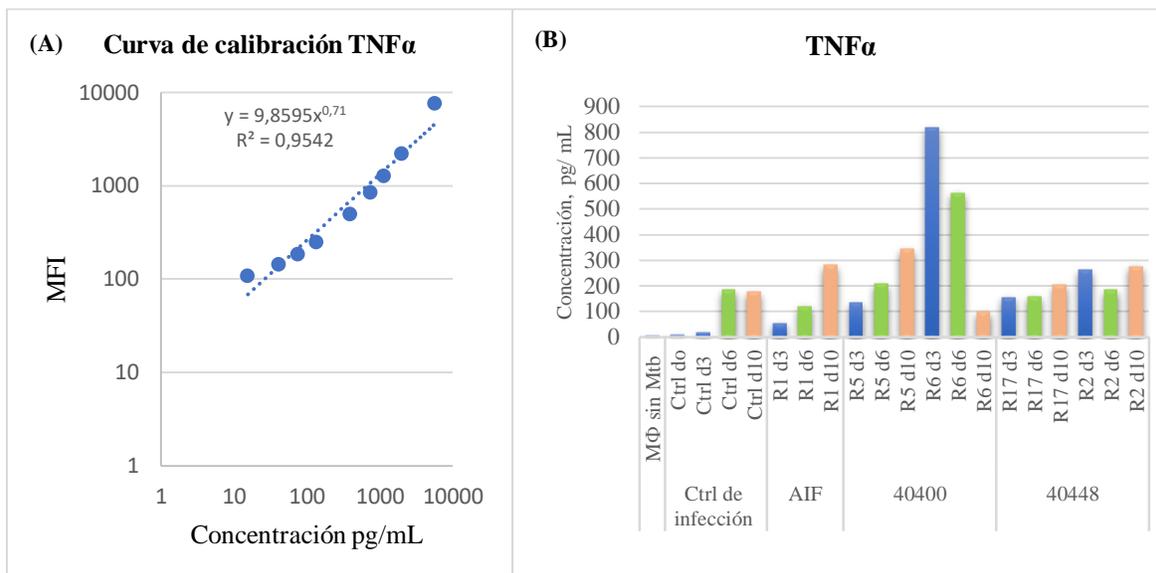
Los controles para este ensayo corresponden a la producción de citoquinas de los macrófagos sin infección (control negativo) y con infección con *Mtb* H37Rv (control positivo).

En la gráfica 5 se observa en los sobrenadantes de cocultivo con esplenocitos de los ratones inoculados con el péptido 40400 y 40448 y los macrófagos infectados con *Mtb* H37Rv, se detectó una tendencia creciente de la concentración de TNF α entre los días 3 y 10 con excepción del ratón 6 el cual presenta en el día 3 una concentración de ~816 pg/mL, la cual disminuye en el día 6 y en el día 10.

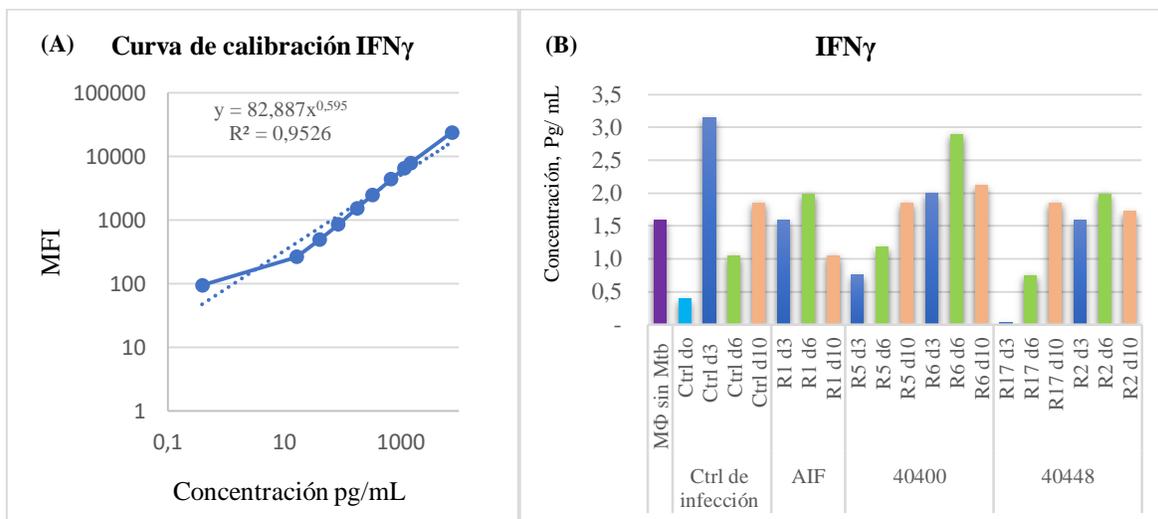
Por otra parte en la gráfica 6 se puede observar que los macrófagos infectados (controles de infección) aumentan la producción de IFN γ en el día 3 respecto a la producción de esta citoquina en los macrófagos que no fueron infectados, además, los sobrenadantes de los cocultivos de los esplenocitos de ratones inoculados tanto con los péptidos como con AIF presentan una disminución de IFN γ en el día 3 (barras azules) respecto al control de infección pero en relación al control de los macrófagos no infectados no hay variación, excepto el ratón 5 en el cual se observa una disminución drástica de la concentración respecto a este control, finalmente en el día 10 los sobrenadantes de los ratones inoculados con los péptidos no presentan cambios en la producción de IFN γ , sin embargo con AIF si hay una disminución de esta citoquina.

Respecto a la concentración de IL2 e IL4 (gráficas 7 y 8) detectadas en los sobrenadantes control se observa un incremento en el día 3 que disminuye 2,1 pg/mL y 1 pg/mL en día 6 respectivamente y luego aumento 0,66 pg/mL y 1,16 pg/mL respectivamente, tendencia que se evidenció en los sobrenadantes con los esplenocitos de los ratones inmunizados con los péptidos y con AIF a diferencia de la IL2 con el ratón 2 y en la IL4 con el ratón 6 con el cual se observa una tendencia creciente de la concentración de esta citoquina respecto al tiempo.

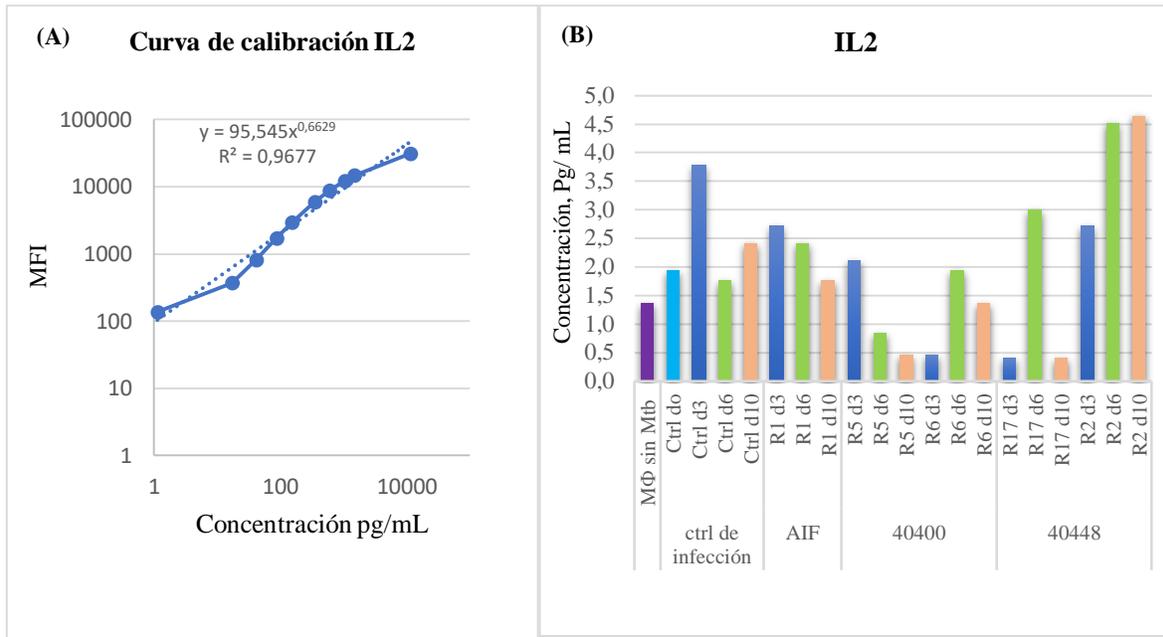
Finalmente, a nivel general se encontró en los sobrenadantes de cocultivo una concentración de ~4.5 pg/mL de IL5 para todos los días analizados (figura 9).



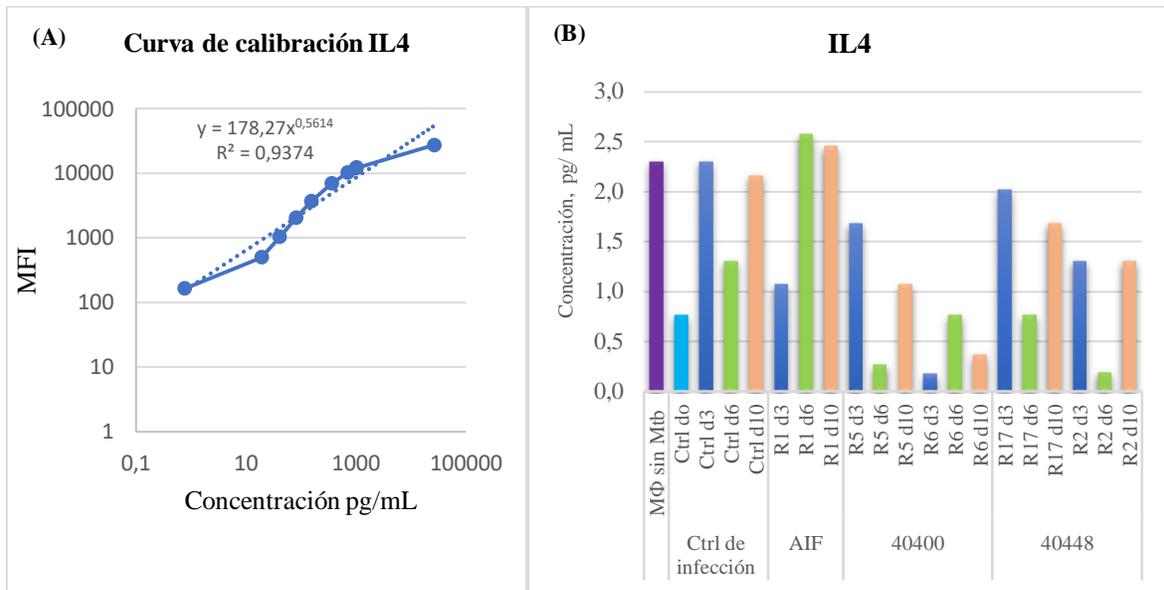
Gráfica 5. Determinación de TNF α en sobrenadante de cocultivo. (A) Curva de calibración del TNF α . Índice medio de fluorescencia (MIF) en función de la concentración de las soluciones patrón de citoquinas. (B) Concentración de TNF α en los sobrenadantes de cocultivo de macrófagos infectados con *Mtb* y esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 (R5,R6) y 40448 (R17, R2) y ratón inoculado con AIF (R1).



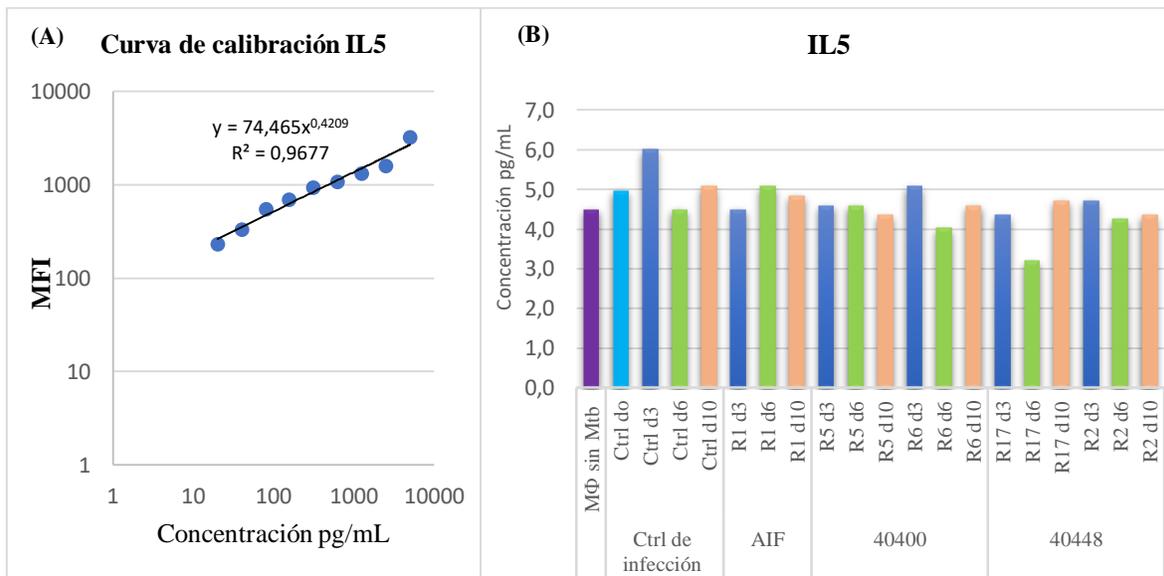
Gráfica 6. Determinación de IFN γ en sobrenadante de cocultivo. (A) Curva de calibración de IFN γ . Índice medio de fluorescencia (MFI) en función de la concentración de las soluciones patrón de citoquinas. (B) concentración de IFN γ en los sobrenadantes de cocultivo de macrófagos infectados con *Mtb* y esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 (R5,R6) y 40448 (R17, R2) y ratón inoculado con AIF (R1).



Gráfica 7. Determinación de IL12 en sobrenadante de cocultivo. (A) Curva de calibración de IL2. Índice medio de fluorescencia (MFI) en función de la concentración de las soluciones patrón de citoquinas. (B) concentración de IL2 en los sobrenadantes de cocultivo de macrófagos infectados con *Mtb* y esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 y 40448 (R5,R6) de superficie de *Mtb* (R17, R2) y ratón inoculado con AIF (R1).



Gráfica 8. Determinación de IL4 en sobrenadante de cocultivo. (A) Curva de calibración de IL4. Índice medio de fluorescencia (MFI) en función de la concentración de las soluciones patrón de citoquinas (pg/mL). (B) concentración de IL4 en los sobrenadantes de cocultivo de macrófagos infectados con *Mtb* y esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 (R5,R6) y 40448 (R17, R2) y ratón inoculado con AIF (R1).



Gráfica 9. Determinación de IL5 en sobrenadante de cocultivo. (A) Curva de calibración de IL5. Índice medio de fluorescencia (MFI) en función de la concentración de las soluciones patrón de citoquinas (pg/mL). (B) concentración de IL5 en los sobrenadantes de cocultivo de macrófagos infectados con *Mtb* y esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 (R5, R6) y 40448 (R17, R2) y ratón inoculado con AIF (R1).

7.6 Evaluación de IgG por ensayo de ELISA en sueros de ratones inmunizados.

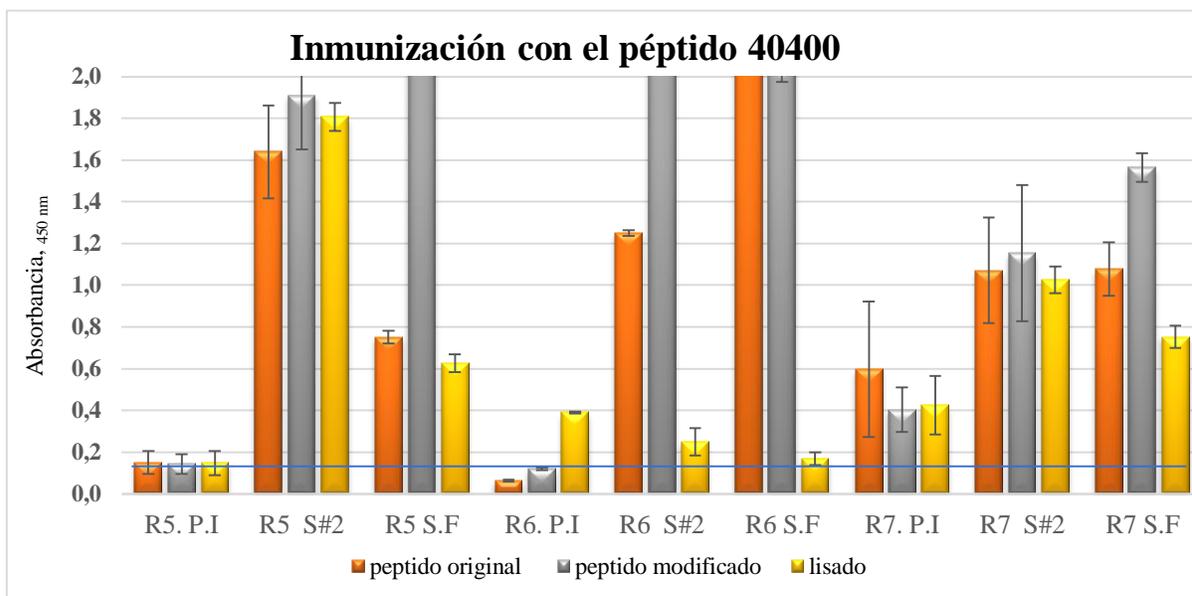
A partir de los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con los péptidos 40400, 40408, 40412, 40422 y 40448 (tabla 4) se determinó la concentración de los anticuerpos IgG que reconocían los péptidos originales, modificados y el lisado de la micobacteria.

Para el tratamiento estadístico de los datos se calculó la desviación estándar entre los triplicados y el umbral. La presencia de anticuerpos específicos, se observa representado en las gráficas con la línea azul, que fue calculada empleando la fórmula:

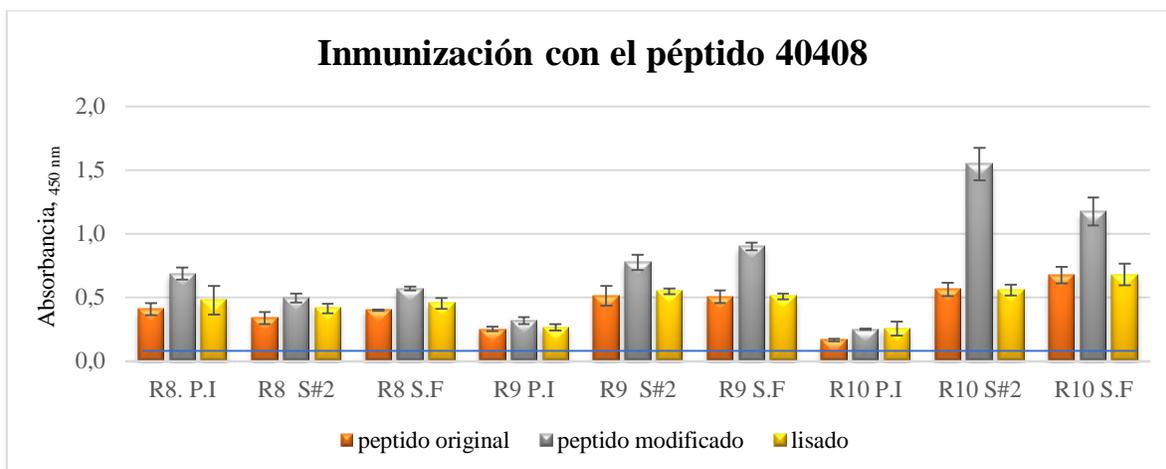
$$\text{Umbral} = \text{promedio de Abs}_{450\text{nm}} \text{ sin antígeno} + 3 \text{ desviaciones estándar}$$

Los sueros de ratones inoculados con el péptido 40400 presentaron la mayor respuesta de anticuerpos IgG tanto contra el péptido modificado como contra el péptido original (gráfica 10), seguido por los valores de los sueros de los ratones inoculados con el péptido 40412 (gráfica 12) en los cuales se observa un cambio entre la concentración de IgG en los sueros preinmunes de cada ratón comparados con la concentración después de la segunda inoculación y en los sueros de las sangrías finales, lo que muestra una producción de anticuerpos específicos, especialmente contra el péptido modificado inoculado pero no contra el péptido original.

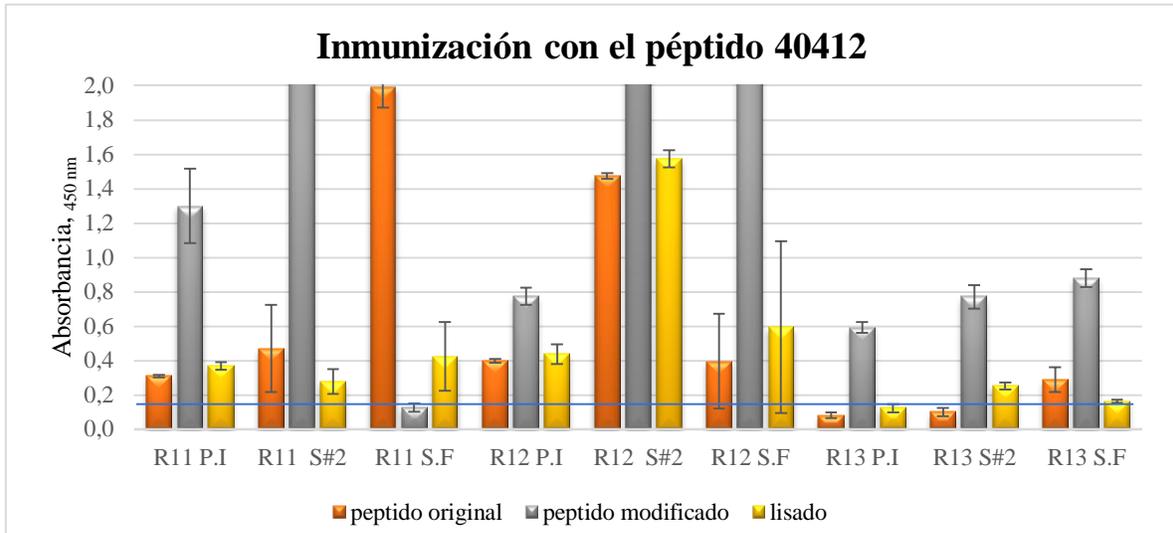
A nivel general se evidencia la producción de los anticuerpos frente al péptido modificado en los sueros post-segunda sangría y en la sangría final, sin embargo, solo se logró dicho reconocimiento con la inoculación del péptido 40422 en los sueros de la sangría final de los ratones 15 y 16.



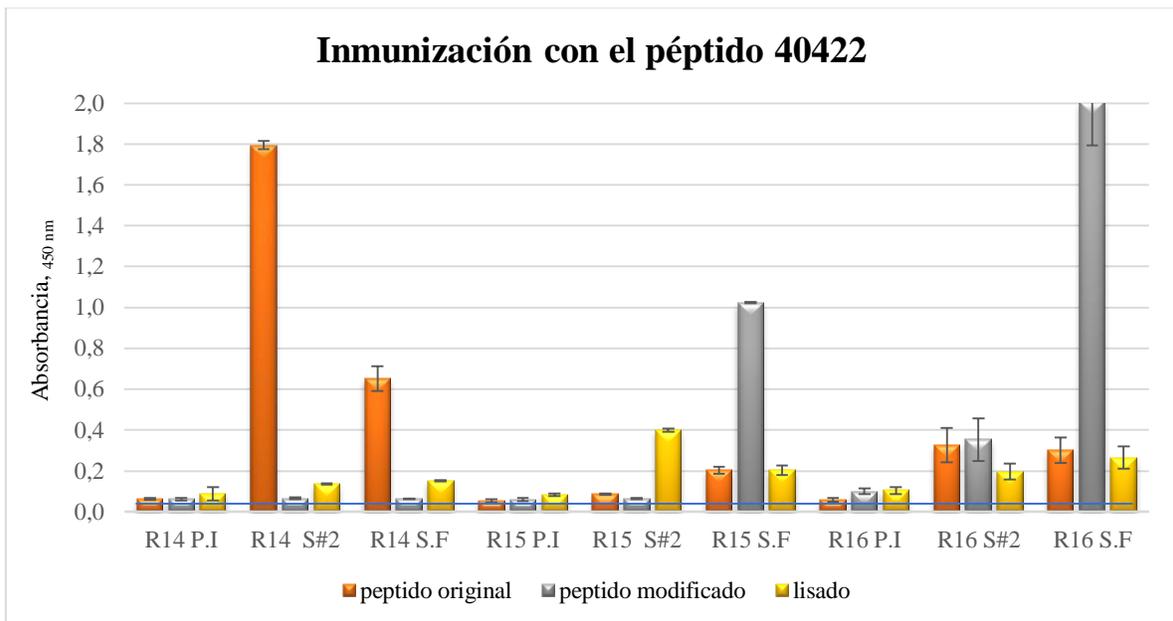
Gráfica 10. Determinación de la concentración de anticuerpos IgG en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido 40400. P.I.: sangría pre-inmune. S#2: Sangría post- segunda inoculación, S.F: sangría post-tercera inoculación.



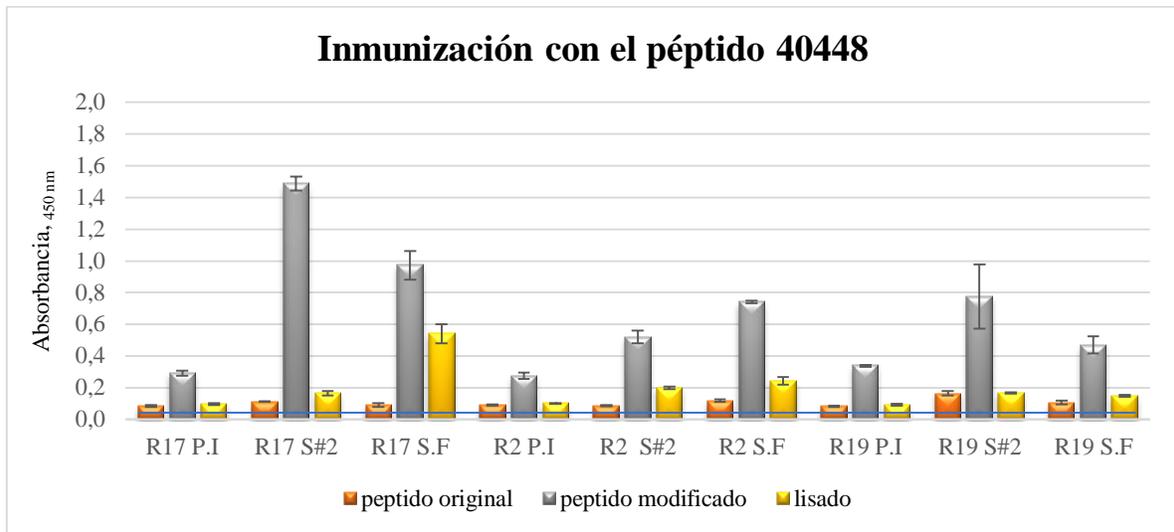
Gráfica 11. Determinación de la concentración de anticuerpos IgG en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido 40408. P.I.: sangría pre-inmune. S#2: Sangría post- segunda inoculación, S.F: sangría post-tercera inoculación.



Gráfica 12 Determinación de la concentración de anticuerpos IgG en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido 40412. P.I.: sangría pre-inmune. S#2: Sangría post- segunda inoculación, S.F: sangría post-tercera inoculación.



Gráfica 13. Determinación de la concentración de anticuerpos IgG en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido 40422. P.I.: sangría pre-inmune. S#2: Sangría post- segunda inoculación, S.F: sangría post-tercera inoculación.



Gráfica 14. Determinación de la concentración de anticuerpos IgG en los sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido 40448. P.I.: sangría pre-immune. S#2: Sangría post- segunda inoculación, S.F: sangría post-tercera inoculación.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

La TB es la primera causa de muerte a nivel mundial por un agente infeccioso como lo son las bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* encontrándose por encima del VIH – SIDA y aunque puede evitarse significativamente el número de muertes por TB con un diagnóstico temprano y el adecuado tratamiento, la TB farmacorresistente ha categorizado dicha enfermedad como de alto impacto en salud pública (1).

Con este antecedente se evidencia la necesidad de obtener una vacuna contra TB que tenga un nivel de protectividad mayor a la BCG, la única vacuna actualmente con licencia, pero la cual no presenta ningún tipo de protectividad contra tuberculosis pulmonar en adultos; su efecto protector disminuye en el tiempo por múltiples causas ambientales, epigenéticas, alimenticias, la exposición a micobacterias ambientales, entre otros (5-9). El avance en la búsqueda de una nueva vacuna ha sido limitado por la falta de comprensión de los mecanismos de la respuesta inmune orientada a contener o eliminar la micobacteria en la célula hospedera (4); por lo cual, la correlación de moléculas de la respuesta inmune adaptativa tanto humoral como celular permitirá una evaluación más rigurosa de candidatos vacunales contra tuberculosis (62).

En la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia basándose en el diseño lógico y racional de una vacuna sintética, multiepítotope y multiestadío contra malaria, se ha propuesto seguir la misma metodología en el diseño de una vacuna sintética multiepítotope contra TB

(56). En este diseño se han seleccionado una serie de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (68) que podrían estar involucradas en la interacción hospedero-patógeno. Con la aplicación de ensayos del tipo receptor-ligando se identificaron péptidos con alta actividad de unión específica a células blanco de infección, que se denominaron HABPs. El alineamiento múltiple con diferentes cepas y especies de micobacterias mostraron que dichas secuencias son conservadas, con lo cual se está evitando la variabilidad genética del patógeno como sistema de evasión del sistema inmune del hospedero. Algunos de estos péptidos inhibieron la entrada de la micobacteria a las células blanco de forma dependiente de la concentración, en ensayos *in vitro* (16-18, 20, 23-27, 30). Estas características hicieron posible la selección inicial de secuencias que podrían incluirse en el diseño de la vacuna sintética, sin embargo, de acuerdo con lo encontrado previamente, se realizó la modificación de las secuencias por cambio de algunos aminoácidos para generar la inducción de una respuesta inmune que pudiera ser protectora basados en la predicción de un mejor ajuste a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (69).

En consecuencia, teniendo en cuenta que se requiere conocer la capacidad de dichas secuencias modificadas para generar una respuesta inmune, en el presente trabajo de tesis se planteó la evaluación de la inhibición del crecimiento de la micobacteria en macrófagos infectados como una medida de la capacidad protectora de los péptidos derivados de proteínas de superficie de *Mtb* en un modelo murino *in vitro*.

El ensayo de cocultivo ha demostrado ser funcional para la evaluación de la actividad antituberculosa de diversos candidatos vacunales contra tuberculosis en sistemas *in vitro* en el modelo murino de tuberculosis pulmonar (62); consecuentemente, esta técnica fue empleada durante esta investigación para evaluar en un modelo murino *in vitro*, la respuesta inmune protectora de los esplenocitos de ratones inoculados con los péptidos, que por predicción serían inductores de respuesta inmune involucrada en la inhibición del crecimiento de *Mtb* intracelular en macrófagos infectados, teniendo en cuenta que con este

modelo, la inhibición del crecimiento intracelular micobacteriano está influenciado por diversos factores que engloban tanto una respuesta inmune innata como una adaptativa.

La selección de los antígenos para el ensayo *in vitro*, parte del conocimiento de que las moléculas del MHC son proteínas cuyos dominios extracelulares están implicados en la presentación de antígenos, generalmente péptidos anclados a los bolsillos de unión, a células del sistema inmune encargadas de generar una respuesta. Se subdividen en 2 subclases: la clase I puede presentar péptidos compuestos por 3 a 8 aminoácidos y la clase II que puede presentar péptidos de 9 a 20 aminoácidos (34).

En ratones, las moléculas del MHC son codificadas por un complejo de genes en el locus H-2 en el cromosoma 17, las moléculas clase II en ratón I-A e I-E, son 2 polipéptidos diferentes que se codifican en una región separada a la del MHC (70); la contraparte en humanos comprende 3 isotipos de clase II; HLA DR, HLA DQ y HLA DP. La contraparte de HLA DR de humanos en ratón es I-E y la contraparte de HLA DQ en ratones es I-A (34, 71), la alta homología descrita entre las moléculas del sistema inmune HLA-DQ en humanos con el alelo H-2 I-Ad en ratones de la cepa BALB/c soportan el uso de este modelo animal para la evaluación de la respuesta inmune y con la posibilidad de que un diseño similar pueda ser empleado para su aplicación en humanos.

De los 18 HABPs derivados de las proteínas de superficie de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, solo se encontró la unión de 2 de ellos al MHC II, Teniendo en cuenta lo encontrado por FIDIC en el diseño de la vacuna contra *P. falciparum*, era de esperar que dichas secuencias funcionalmente importantes no fueran presentadas al sistema inmune, de aquí la necesidad de modificarlas, estas modificaciones se realizaron por aminoácidos de igual volumen y diferente polaridad con el fin de romper el silencio inmunológico e inducir una respuesta inmune protectora (10).

Por tanto, se diseñaron 19 péptidos modificados que al ser analizados *in silico*, con respecto a su capacidad de unión a MHC-II del modelo animal propuesto (H-2-IAd para ratones BALBc), permitieron la identificación de los péptidos 40400, 40408, 40412, 40422 y 40448 derivados de secuencias de las proteínas Rv1411c, Rv 3166c, Rv0180c y Rv3494c respectivamente; se propone que estos cinco péptidos que presentaron unión a H-2 I-Ad, serán presentados por el MHC II, que se encuentra principalmente en la superficie de células presentadoras de antígenos (como en células dendríticas, macrófagos y algunas células epiteliales) a las células que poseen receptores para estas moléculas como son los linfocitos T CD4+ (34).

A partir del análisis *in silico* la clasificación de unión péptido-MHC se da en función del porcentaje de rango, que es medido teniendo en cuenta la afinidad para un péptido dado en comparación con un conjunto de 200,000 péptidos naturales al azar de la misma longitud del péptido analizado, con un umbral recomendado para la determinación del tipo de unión fuerte o débil al MHC II; por otra parte, la afinidad se establece en la escala logarítmica como 1-log 50K y como el IC50 en el orden nanomolar (55).

Basados en la aplicación de la técnica de cocultivo (62), planteada para simular la actividad celular *in vivo* de células previamente estimuladas por inmunización para el control de la infección por *Mtb* de células blanco, se evidenció que el co-cultivo con los esplenocitos de los ratones inoculados con los péptidos 40400 de la proteína Rv1411c y 40448 de la proteína Rv3494c lograron inhibir el progreso de la infección de forma constante durante el periodo total del cocultivo.

Estudios previos en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), demostraron que el péptido 16295 de la proteína Rv3166c es un HABP para línea celular A549, blanco de infección de *Mtb*, pero no tiene un efecto inhibitorio de la infección por este patógeno en dicha línea celular (33), debido a que no presenta unión a la molécula de MHC II analizada, luego de hacer la modificación del péptido obteniendo el 40408, se evidenció que según el análisis *in silico* fue el único de los péptidos evaluados que presentó una unión

fuerte al MHC II H-2 I-Ad; sin embargo, con este péptido modificado no hubo una producción de anticuerpos IgG que reconocieran tanto el péptido nativo como el modificado y además, no hubo control de la infección por *Mtb*.

Dentro de los ratones del G1 también se encuentran los inmunizados con el péptido 40412 de la proteína Rv3166c derivado del péptido nativo 16300, el cual es HABP para la línea celular blanco de infección U937 (33). La inmunización de animales con el péptido original (16300) mostró en un estudio previo (33), la generación de anticuerpos que reconocían a la proteína nativa por pruebas inmunoquímicas; así mismo, en esta investigación se halló que el péptido modificado 40412 se une al MHC II, y su inoculación genera la concentración de anticuerpos IgG. Por otra parte, aunque no redujo las UFC en los primeros días de cocultivo, si lo hace en el día 10 cuando logró disminuir las UFC, lo que puede indicar que las modificaciones realizadas al péptido logran cumplir con el objetivo de reducir el silencio inmunológico para la obtención de un péptido inmunogénico.

El péptido 40422, también del G1, pese a haber presentado unión al MHCII I-Ad alelo específico, tanto en su forma nativa como modificada, no es inmunogénico teniendo en cuenta que no se generó una producción significativa de anticuerpos IgG que reconocieran el péptido nativo y modificado, y no presentó reducción de UFC.

Respecto al G2, el péptido 40400 (PDFNALQPVPSTQWIQE), es derivado del péptido nativo 37096 (APPFNATQPVPATVWIQETGY) de la proteína Rv1411c, la cual se ha descrito previamente como una lipoproteína de *Mtb* que inhibe el procesamiento del antígeno y su presentación por el MHC II en macrófagos humanos dependiente de TLR-2 (26). Es de gran importancia el reconocimiento de la secuencia del péptido original 37096, ya que este péptido es conservado entre diferentes cepas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y mostró una inhibición de la entrada de la micobacteria superior al 70% (200µM) con un comportamiento dependiente de la concentración, en ensayos *in vitro* con células epiteliales alveolares que son blanco de infección a las cuales se une con alta especificidad (31). En

concordancia, el control de la infección por *Mtb* que se presenta en el cocultivo con esplenocitos de ratones inmunizados con el péptido 40400 sugiere la participación de este péptido que al hacer la presentación correcta del antígeno por el MHC II genera la respuesta inmune que permitió controlar el crecimiento intracelular de *Mtb*.

La identificación de secuencias de epítopes T permitió comprobar que la intensidad de unión al MHC II H-2 I-Ad alelo específico de la cepa de ratones BALB/c no determina exclusivamente la inmunogenicidad de los péptidos, debido a que los esplenocitos de ratones inmunizados con el péptido 40408 que presentó una unión fuerte al MHC junto con los péptidos 40412 y 40422 no tienen un efecto en el control progresivo de la infección de macrófagos infectados *Mtb* H37Rv.

Para identificar la inmunogenicidad del péptido se evaluó la producción de anticuerpos y de citoquinas, reconociendo que los sueros obtenidos por la inoculación de este péptido reconocen la secuencia tanto del péptido modificado 40400 como del péptido original 37096, además el lisado de micobacteria. Respecto al análisis de citoquinas de los sobrenadantes de co-cultivo predominó la producción de TNF- α e IFN γ , en los ratones inmunizados con este péptido; por lo cual, el control del progreso de la infección pudo haberse dado por la diferenciación del linaje linfocítico hacia un perfil Th1. Por tanto, siendo el 40400 un péptido inmunogénico que *in vitro* logra controlar eficiente y progresivamente la infección por *Mtb* se propone como un buen candidato vacunal contra tuberculosis.

Por otra parte, en estudios previos se encontró que el péptido 38373 de la proteína Rv3494c es HABP para la línea celular de adenocarcinoma alveolar humana A549, e inhibe la invasión de forma dosis dependiente en un 65% con una concentración de 200 μ M por encima de la citocalasina como control positivo (24). Para su correspondiente péptido modificado se encuentra la reducción de la infección micobacteriana de forma constante en el cocultivo de esplenocitos de ratones inmunizados con el péptido 40448; sin embargo, a diferencia del péptido 40400, la inmunización con el péptido 40448 no genera anticuerpos que reconozcan el péptido original 38373 de la misma forma que al lisado de micobacteria.

Durante esta investigación, como se ha mencionado previamente la técnica de cocultivo permitió hacer la evaluación de la capacidad protectora de los esplenocitos de ratones inmunizados con péptidos sintéticos; pero la determinación de citoquinas en los sobrenadantes de ese cocultivo dan cuenta de los perfiles de la respuesta inmune celular. Para tuberculosis ha sido demostrado que el ambiente de citoquinas en el foco de infección de *Mtb*, determinará el desarrollo o la contención de la enfermedad en un estado de latencia (72).

En los sobrenadantes de cocultivo de los esplenocitos de ratones inoculados con los péptidos 40400 de la proteína Rv1411c y 40448 de la proteína Rv3494c los cuales lograron disminuir la carga micobacteriana intracelular significativamente y de forma constante en el periodo de cocultivo evaluado, se determinó una concentración variable de citoquinas relacionadas con el perfil Th1 que modulan la respuesta inmune adaptativa ante la infección por tuberculosis, como lo son el IFN γ , la IL2 y el TNF α (72).

El IFN γ , es la principal citoquina involucrada en la respuesta inmune protectora contra *Mtb*, producida principalmente por células natural killer, linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ (73), promoviendo la activación de M Φ en conjunto con la IL2 (74). Por otra parte, en linfocitos naive conforma un bucle de retroalimentación positiva con la IL12 en el cual activan a STAT 1 y a STAT 4, los cuales una vez fosforilados se translocan al núcleo y STAT 1 activa el factor de regulación T bet, especializado en la inducción de la diferenciación de los linfocitos T hacia el linaje Th1 y en conjunto con el TNF α , que no está asociado con mecanismos de diferenciación, sino que es liberado por los linfocitos Th1 ya diferenciados, se comprueba, que a nivel general, por la tendencia creciente de la concentración de TNF α en los días del cocultivo, hubo una diferenciación de los linfocitos T hacia Th1. Por lo cual, se sugiere que el control de la infección que se obtuvo con los esplenocitos de los ratones pudo ser debido al TNF α y en menor medida el IFN γ debido a que como se ha reportado previamente está relacionada con el control de la infección por este patógeno (36).

En cuanto a la determinación de IL4 e IL5, no hay diferencia entre los macrófagos infectados y no infectados, pero sí cuando estas células infectadas con *Mtb* se cocultivaron con los esplenocitos de los ratones inmunizados; específicamente la disminución de la IL4, la cual es coherente teniendo en cuenta el aumento de TNF α , una citoquina relacionada con un perfil opuesto de diferenciación de linfocitos T (36, 37) con lo cual se evidencia que cuando hay una infección, el organismo infectado no silencia por completo un tipo específico de respuesta inmune para activar otro, sino que se generan eventos de inmunomodulación con perfiles diferenciados, sin embargo, se observó con la detección de citoquinas de linajes opuestos tanto Th1 (IFN γ , IL2 y el TNF) y Th2 (IL4 e IL5) el predominio de una respuesta particular, que en el caso de los esplenocitos inoculados con los péptidos 40400 y 40448, dirigen la respuesta inmune para el control de la infección por *Mtb* hacia una respuesta inmune celular Th1.

Se ha establecido que la inmunidad mediada por células juega un papel crítico en la defensa contra *Mtb*; por el contrario, no es claro el papel funcional de las células B y su respectiva producción de anticuerpos que median la inmunidad humoral frente a la infección por este patógeno (75-77).

Se ha demostrado que los individuos con TB latente y TBactiva montan una respuesta humoral específica contra *Mtb* con patrones diferentes de glicosilación en los anticuerpos (73). También se ha comprobado que los anticuerpos contra la TB latente conducen a la maduración de los fagolisosomas, a la activación del inflammasomas y a la destrucción de macrófagos de *Mtb* intracelulares. Por lo cual, en este estudio, se destaca la alta concentración de anticuerpos en los sueros de los ratones inoculados con el péptido 40400, que es un péptido derivado del HABP 37096, que inhibe el crecimiento de *Mtb*, lo que respalda la idea de que los péptidos denominados originales, los cuales no son inmunogénicos, requieren modificaciones puntuales, en sitios específicos para convertirlos en péptidos inmunogénicos, capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra el patógeno (78-81).

La evaluación de la respuesta inmune protectora de los péptidos modificados permiten postular como un buen candidato vacunal contra *Mtb* al péptido 40400 procedente del péptido 37096 de la lipoproteína Rv1411c de superficie de *Mtb* que con unión al alelo H-2 I-Ad de ratones BALB/c homólogo al HLA DQ en humanos mediante su epítopo T FNALQPVPS logró inhibir el progreso de la infección de *Mtb* H37Rv intracelular, además de presentar altos títulos de IgG en los sueros de los ratones inmunizados con este péptido indicando la activación de la inmunidad humoral frente a *Mtb* y la producción de citoquinas que perfilan la respuesta inmune adaptativa celular Th1.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9.1 CONCLUSIONES

Se identificaron las secuencias de epitopes T en los péptidos modificados, además se estableció que esa unión no está necesariamente relacionada con el control de la infección.

Con la metodología de cocultivo empleada en esta investigación se logró evaluar la capacidad protectora de los péptidos propuestos, encontrando que los esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos 40400 y 40448 controlaron el crecimiento intracelular en macrófagos infectados con *Mtb* H37Rv.

La evaluación de la respuesta inmune protectora de los péptidos modificados en el modelo utilizado, permitió identificar al péptido 40400 como aquel que logra inhibir el progreso de la infección de *Mtb* H37Rv intracelular, estimula la producción de TNF α que perfila la respuesta inmune adaptativa celular Th1 y promueve la producción de anticuerpos en los sueros de los ratones.

9.2 RECOMENDACIONES

- Se propone realizar el análisis *in silico* con el alelo I- E de la misma cepa de ratones Balb/c para complementar los hallazgos encontrados con el alelo I-Ad.
- Evaluar la protectividad en el modelo murino de los péptidos sugeridos en este trabajo mediante el reto con *Mtb*.
- Realizar el ensayo con una especie que presente mayor homología con las moléculas HLA en humanos para comprobar la efectividad del planteamiento metodológico en la búsqueda de candidatos vacunales.

10. CONSIDERACIONES ÉTICAS

En esta investigación se realizó experimentación con *Mtb* H37Rv; microorganismo patógeno perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* agente causal de tuberculosis en humanos, dicha investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), las cuales cumplen a cabalidad con las exigencias del Título IV del capítulo 1 y los artículos 63 al 65 y 68 al 71 de la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Por otra parte, se garantizaron todas las condiciones para dar cumplimiento al título V correspondiente a la Investigación Biomédica con Animales de la misma resolución en conjunto con el cumplimiento con la ley 84 de 1989.

La manipulación de las células obtenidas de los ratones se realizó en un laboratorio de cultivo celular con un nivel de bioseguridad clase II, y la manipulación de las micobacterias se realizó en un laboratorio con un nivel de bioseguridad tipo III.

Los derivados biológicos fueron inactivados mediante tratamiento con fenol al 5% y esterilización por vapor a presión en el autoclave a 121 °C y 2 atmosferas de presión antes de ser desechados como residuos biológicos con el fin de atenuar el impacto ambiental, sanitario y de salud negativos a que hubiere lugar.

11. REFERENCIAS

1. WHO. Global tuberculosis report 2017.
2. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *Jama*. 1994;271(9):698-702. Epub 1994/03/02.
3. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*. 1995;346(8986):1339-45. Epub 1995/11/18.
4. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004;84(1-2):93-101. Epub 2003/12/13.
5. Clark S, Lanni F, Marinova D, Rayner E, Martin C, Williams A. Revaccination of Guinea Pigs With the Live Attenuated Mycobacterium tuberculosis Vaccine MTBVAC Improves BCG's Protection Against Tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*. 2017;216(5):525-33. Epub 2017/03/23.
6. de Klerk LM, Michel AL, Bengis RG, Kriek NP, Godfroid J. BCG vaccination failed to protect yearling African buffaloes (*Syncerus caffer*) against experimental intratonsilar challenge with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2010;137(1-2):84-92. Epub 2010/08/06.
7. Davenne T, McShane H. Why don't we have an effective tuberculosis vaccine yet? Expert review of vaccines. 2016;15(8):1009-13. Epub 2016/03/25.
8. Black GF, Weir RE, Floyd S, Bliss L, Warndorff DK, Crampin AC, et al. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet*. 2002;359(9315):1393-401. Epub 2002/04/30.
9. Moliva JI, Turner J, Torrelles JB. Prospects in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette et Guerin (BCG) vaccine diversity and delivery: why does BCG fail to protect against tuberculosis? *Vaccine*. 2015;33(39):5035-41. Epub 2015/09/01.
10. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. *Accounts of chemical research*. 2008;41(3):377-86. Epub 2008/02/13.

11. Delogu G, Sali M, Fadda G. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2013;5(1):e2013070. Epub 2013/12/24.
12. Stephan J, Bender J, Wolschendorf F, Hoffmann C, Roth E, Mailander C, et al. The growth rate of *Mycobacterium smegmatis* depends on sufficient porin-mediated influx of nutrients. *Molecular microbiology*. 2005;58(3):714-30. Epub 2005/10/22.
13. Cook GM, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, Danilchanka O, et al. Physiology of mycobacteria. *Advances in microbial physiology*. 2009;55:81-182, 318-9. Epub 2009/07/04.
14. OPS. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis: Normas y guía técnica-Parte 2 Cultivo2008. Available from: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo\[2\].pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo[2].pdf).
15. Kieser KJ, Rubin EJ. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(8):550-62.
16. Caceres SM, Ocampo M, Arevalo-Pinzon 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*. 2011;32(1):1-10.
17. Rodriguez 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*. 2012;38(2):208-16. Epub 2012/09/25.
18. 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 microbiology*. 2010;10:109.
19. Ocampo M, Rodriguez DC, Rodriguez J, Bermudez M, Munoz CM, Patarroyo MA, et al. Rv1268c protein peptide inhibiting *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv entry to target cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2013;21(21):6650-6. Epub 2013/09/03.
20. 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*. 2008;26(34):4387-95.
21. Rodriguez D, Vizcaino C, Ocampo M, Curtidor H, Pinto M, Patarroyo ME, et al. Peptides from the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1980c protein involved in human cell infection: insights into new synthetic subunit vaccine candidates. *Biological chemistry*. 2010;391(2-3):207-17.
22. Forero M, Puentes A, Cortes J, Castillo F, Vera R, Rodriguez LE, et al. Identifying putative *Mycobacterium tuberculosis* Rv2004c protein sequences that bind specifically to U937 macrophages and A549 epithelial cells. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2005;14(11):2767-80.
23. Rodriguez DC, Ocampo M, Varela Y, Curtidor H, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Mce4F *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides can inhibit invasion of human cell lines. *Pathogens and disease*. 2015;73(3). Epub 2015/03/07.

24. 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. *The FEBS journal*. 2007;274(24):6352-64.
25. Ocampo M, Aristizabal-Ramirez D, Rodriguez DM, Munoz 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 engineering, design & selection : PEDS*. 2012;25(5):235-42.
26. Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV, Boom WH. Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol*. 2004;173(4):2660-8. Epub 2004/08/06.
27. Drage MG, Tsai HC, Pecora ND, Cheng TY, Arida AR, Shukla S, et al. Mycobacterium tuberculosis lipoprotein LprG (Rv1411c) binds triacylated glycolipid agonists of Toll-like receptor 2. *Nature structural & molecular biology*. 2010;17(9):1088-95. Epub 2010/08/10.
28. 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. *Chemical biology & drug design*. 2014;84(6):626-41. Epub 2014/07/22.
29. Mustafa AS, Shaban F. Mapping of Th1-cell epitope regions of Mycobacterium tuberculosis protein MPT64 (Rv1980c) using synthetic peptides and T-cell lines from M. tuberculosis-infected healthy humans. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2010;19(2):122-8. Epub 2010/02/06.
30. Rupa L, Srikantam A, Lakshmana Rao SS, Devi U, Sivasai K. Molecular analysis of Rv0679c and Rv0180c genes of Mycobacterium tuberculosis from clinical isolates of pulmonary tuberculosis. *Indian journal of medical microbiology*. 2016;34(4):471-5. Epub 2016/12/10.
31. Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes N, Vincent V, et al. Macroarray and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Microbiology*. 2004;150(Pt 2):483-96. Epub 2004/02/10.
32. Lavarti R, Ganugapati J, Ratcha S, Rao LS, SivaSai KS. Insights from the analysis of predicted Rv0679c protein peptide from Mycobacterium tuberculosis with Toll like Receptors in host. *Bioinformatics*. 2016;12(5):293-9. Epub 2017/03/02.
33. 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. *Critical reviews in microbiology*. 2014;40(2):117-45. Epub 2013/03/01.
34. Murphy KT, P. Walport, M. Janeway's Immunobiology. seventh ed2008.
35. Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes & development*. 2000;14(14):1693-711. Epub 2000/07/18.
36. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*. 2013;121(13):2402-14. Epub 2013/01/18.

37. Leung S, Liu X, Fang L, Chen X, Guo T, Zhang J. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cellular & molecular immunology*. 2010;7(3):182-9. Epub 2010/04/13.
38. Curtis MM, Rowell E, Shafiani S, Negash A, Urdahl KB, Wilson CB, et al. Fidelity of pathogen-specific CD4+ T cells to the Th1 lineage is controlled by exogenous cytokines, interferon-gamma expression, and pathogen lifestyle. *Cell host & microbe*. 2010;8(2):163-73. Epub 2010/08/17.
39. Gengenbacher M, Kaufmann SH. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. *FEMS microbiology reviews*. 2012;36(3):514-32. Epub 2012/02/11.
40. Vankayalapati R, Barnes PF. Innate and adaptive immune responses to human Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89 Suppl 1:S77-80. Epub 2009/12/17.
41. Handzel Z. The Immune Response to Mycobacterium tuberculosis Infection in Humans. In: Vats BHMAMG, editor. *Tuberculosis Current Issues in Diagnosis and Management*. IntechOpen: Dep Immunol.; 2013.
42. Lerner TR, Borel S, Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cellular microbiology*. 2015;17(9):1277-85. Epub 2015/07/03.
43. Hernandez-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, Aguilar D, Orozco H, Harboe M, et al. Persistence of DNA from Mycobacterium tuberculosis in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet*. 2000;356(9248):2133-8. Epub 2001/02/24.
44. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*. 2012;217(3):363-74. Epub 2011/08/05.
45. Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual review of pathology*. 2012;7:353-84.
46. Neyrolles O, Guilhot C. Recent advances in deciphering the contribution of Mycobacterium tuberculosis lipids to pathogenesis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011;91(3):187-95. Epub 2011/02/19.
47. Ward RJ, S. . *The Pathogenesis of tubersulosis1962*.
48. Tan Q, Xie WP, Min R, Dai GQ, Xu CC, Pan HQ, et al. Characterization of Th1- and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2012;31(6):1233-42. Epub 2011/11/02.
49. Zimmermann N, Thormann V, Hu B, Kohler AB, Imai-Matsushima A, Loch C, et al. Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against Mycobacterium tuberculosis. *EMBO molecular medicine*. 2016;8(11):1325-39.
50. da Costa C, Walker B, Bonavia A. Tuberculosis vaccines--state of the art, and novel approaches to vaccine development. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2015;32:5-12. Epub 2015/03/27.
51. Usman MM, Ismail S, Teoh TC. Vaccine research and development: tuberculosis as a global health threat. *Central-European journal of immunology*. 2017;42(2):196-204. Epub 2017/09/05.

52. Tang J, Yam WC, Chen Z. Mycobacterium tuberculosis infection and vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016;98:30-41. Epub 2016/05/10.
53. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2:16076. Epub 2016/10/28.
54. Kaufmann SH. Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. *Journal of internal medicine*. 2010;267(4):337-53. Epub 2010/05/04.
55. Andreatta M, Karosiene E, Rasmussen M, Stryhn A, Buus S, Nielsen M. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. *Immunogenetics*. 2015;67(11-12):641-50. Epub 2015/09/30.
56. Patarroyo ME, Bermudez A, Patarroyo MA. Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. *Chemical reviews*. 2011;111(5):3459-507.
57. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(15):5131-5. Epub 1985/08/01.
58. Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical biochemistry*. 1970;34(2):595-8. Epub 1970/04/01.
59. Applied-Biosystems I. Introduction to Cleavage Techniques.1990. Available from: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_040797.pdf.
60. Quattricchi O, Abilaira, S., Laba, R. . Introducción a la HPLC. Aplicación y practica1992. Available from: <https://es.scribd.com/doc/215256226/Introduccio-n-a-la-HPLC-Aplicacio-n-y-Pra-ctica-O-A-Quattrocchi-S-A-de-Andrizzi-R-F-Laba>.
61. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004;22(5):460-6. Epub 2004/10/19.
62. 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. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2009;16(7):1025-32.
63. Martínez C BC, Rodríguez E, Fernando Y, Stepke L. . El animal como sujeto experimental aspectos técnicos y éticos.2017. Available from: <http://web.uchile.cl/archivos/uchile/bioetica/doc/libroanim.pdf>.
64. Lolas F QA, Rodríguez E. . Investigación En Salud. Dimensión Ética. 2006; Primera Ed.: [390 p.].
65. Becton. BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit Instruction Manual 2009.
66. Weemen VSA. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS LETTERS*. 1971;15(3):232-6. .
67. Lequin R. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*. 2005;51(12).
68. 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*. 1998;393(6685):537-44. Epub 1998/06/20.

69. Patarroyo ME, Cifuentes G, Pirajan C, Moreno-Vranich A, Vanegas M. Atomic evidence that modification of H-bonds established with amino acids critical for host-cell binding induces sterile immunity against malaria. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;394(3):529-35. Epub 2010/03/09.
70. Kaufman JF, Auffray C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger J. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell*. 1984;36(1):1-13. Epub 1984/01/01.
71. Denaro M, Gustafsson K, Larhammar D, Steinmetz M, Peterson PA, Rask L. Mouse MHC class II gene E beta 2 is closely related to E beta and to HLA-DR beta. *Immunogenetics*. 1985;21(6):613-6. Epub 1985/01/01.
72. Bai X, Wilson SE, Chmura K, Feldman NE, Chan ED. Morphometric analysis of Th(1) and Th(2) cytokine expression in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004;84(6):375-85. Epub 2004/11/05.
73. Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunological reviews*. 2008;226:191-204. Epub 2009/01/24.
74. Cavalcanti YV, Brelaz MC, Neves JK, Ferraz JC, Pereira VR. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. *Pulmonary medicine*. 2012;2012:745483. Epub 2012/12/20.
75. Kozakiewicz L, Phuah J, Flynn J, Chan J. The role of B cells and humoral immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;783:225-50. Epub 2013/03/08.
76. Casadevall A, Pirofski LA. A new synthesis for antibody-mediated immunity. *Nature immunology*. 2011;13(1):21-8. Epub 2011/12/20.
77. Glatman-Freedman A, Casadevall A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(3):514-32. Epub 1998/07/17.
78. Bermudez A, Calderon D, Moreno-Vranich A, Almonacid H, Patarroyo MA, Poloche A, et al. Gauche(+) side-chain orientation as a key factor in the search for an immunogenic peptide mixture leading to a complete fully protective vaccine. *Vaccine*. 2014;32(18):2117-26. Epub 2014/03/04.
79. Cifuentes G, Bermudez A, Rodriguez R, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Shifting the polarity of some critical residues in malarial peptides' binding to host cells is a key factor in breaking conserved antigens' code of silence. *Med Chem*. 2008;4(3):278-92. Epub 2008/05/14.
80. Espejo F, Cubillos M, Salazar LM, Guzman F, Urquiza M, Ocampo M, et al. Structure, Immunogenicity, and Protectivity Relationship for the 1585 Malarial Peptide and Its Substitution Analogues. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2001;40(24):4654-7. Epub 2002/10/31.
81. Guzman F, Jaramillo K, Salazar LM, Torres A, Rivera A, Patarroyo ME. 1H-NMR structures of the Plasmodium falciparum 1758 erythrocyte binding peptide analogues and protection against malaria. *Life sciences*. 2002;71(23):2773-85. Epub 2002/10/18.