



**USO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA
GENERACIÓN DE RESPUESTA INMUNE
INDUCIDA POR PÉPTIDOS SINTÉTICOS
DERIVADOS DE *Mycobacterium tuberculosis***

Christian David Sánchez Barinas

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento Ciencias Fisiológicas
Bogotá D.C, Colombia
2021**

USO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA GENERACIÓN DE RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE *Mycobacterium tuberculosis*.

Christian David Sánchez Barinas

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Bioquímica

Director:

Marisol Ocampo Cifuentes, Ph.D.
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC.

Codirector:

Carlos Arturo Guerrero, Ph.D.
Universidad Nacional de Colombia

Grupo de Investigación:

Grupo Funcional Tuberculosis
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas
Bogotá D.C, Colombia

2021

DEDICATORIA

“A mi ángel de la guarda mi abuela Ana Etelvina Pineda Moya, no olvidaré todo lo que hiciste por mí y mis hermanos”. Este 2021 te alejo de mi lado, pero nos volveremos a encontrar.

Fallé muchas veces como hijo, como pareja, como sobrino, como hermano y como amigo. No siempre digo lo correcto. No soy el hombre más guapo del mundo, pero soy yo. Tengo cicatrices porque tengo historias que contar. Algunas personas me aman, otras no. Hice cosas buenas, hice cosas malas. No pretendo ser alguien que no soy.

Soy quien soy, orgulloso, impulsivo, hasta un poco loco, pero así soy YO. Puedes amarme o no, pero si yo te amo, lo hago con todo mi corazón. Nunca me disculparé por ser yo. Ser yo me hace único, ser yo es lo mejor de cada día.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, en especial a mis padres Marisol y Juan por su apoyo incondicional y amor, a mis hermanos Andrés y Lorena por su ejemplo de trabajo y dedicación, a mi sobrina Sofía que con sus elocuencias me hace olvidar de mis problemas. Para ellos con todo mi amor.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, al doctor Manuel Elkin Patarroyo y en especial a la doctora Marisol Ocampo quienes, con su ejemplar dedicación y pasión por el trabajo del diseño de vacunas sintéticas, me hicieron ser partícipe de sus conocimientos y enseñanzas que hicieron de este trabajo un proceso de aprendizaje constante y que va a ser mi guía en mi desempeño profesional.

A todos los co-investigadores que de alguna forma han aportado a este trabajo: Mary Lilián Carabalí Isajar, Valentina Vergara, Claudia Gamboa, Diana Díaz, que durante varias tertulias logramos concluir varias ideas en pro de la ciencia para nuestro país. También quiero agradecer a todos los participantes quienes de manera desinteresada aportaron sus muestras de sangre en medio de una situación de salud que nos cambió totalmente la forma de percibir y enfrentar la vida.

A mis amigos y colegas Joseph Cepeda, Natalia Muñoz, Jennifer Nomelin, Luis Velandia, Erika Velandia, Andrés Caballero, Cristian Pulido, Juan Osorio, John Vanegas, Camilo Madero y Milena Maya, a ellos por ser personas guerreras, creativas, elocuentes, pero sobre todo incondicionales en mi diario vivir, gracias por sus risas y por ser receptores de mis historias.

Por último y no menos importante, quiero agradecerme. Quiero agradecerme por creer en mí, por trabajar duro. Quiero agradecerme por no tener días libres, por nunca darme por vencido. Quiero agradecerme por intentar hacer más bien que el mal, por ser yo en todos los términos.

RESUMEN

USO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA GENERACIÓN DE RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE *Mycobacterium tuberculosis*

Sánchez-Barinas Christian David ^{1,2}

¹ Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)

² Universidad Nacional de Colombia

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) es uno de los patógenos más exitosos de la humanidad, siendo el principal causante de tuberculosis, responsable del mayor número de muertes a nivel mundial por un agente infeccioso, estimándose que un tercio de la población mundial es portadora del bacilo. La adaptación evolutiva de este patógeno se debe principalmente a su habilidad para evadir el sistema inmune del hospedero, evitando que éste despliegue una respuesta inmune efectiva en casos donde se desarrolla tuberculosis activa. Es así como se hace necesario mejorar el reconocimiento del patógeno por actores del sistema inmune para lo cual se pueden emplear células dendríticas (CDs) derivadas por métodos estándares con 1,25 ng/mL IL-4 y 2,5 ng/mL GM-CSF fueron pulsados con péptidos sintéticos (n=114) provenientes de proteínas (n=16) involucradas en la interacción micobacteria-hospedero, los cuales han sido modificados en la secuencia de aminoácidos; los cambios estratégicos permiten una mayor interacción con el CMH-II del hospedero y de esta manera hacen que los péptidos sean más inmunogénicos que las secuencias nativas. Esta interacción permite entrar en contacto con linfocitos TCD4+ lo que se evaluó mediante la expansión clonal de células de memoria; además estos linfocitos permitieron el control del crecimiento intracelular de *Mtb* en macrófagos infectados. Este trabajo contribuye así a que empleando péptidos modificados considerados como candidatos vacunales contra tuberculosis y presentados por CDs, se pueda aumentar la respuesta inmunológica del individuo y llegar a contribuir en el control de la infección por *Mtb* mediante la presentación antigénica a linfocitos TCD4+ conocidos como los mayores efectores en la inmunidad contra tuberculosis.

Palabras clave: Tuberculosis, péptidos sintéticos, células dendríticas, linfocito T multifuncionales, inhibición de crecimiento.

ABSTRACT

USE A DENDRITIC CELLS IN THE GENERATION OF IMMUNE RESPONSE INDUCED BY SYNTHETIC PEPTIDES DERIVED FROM *Mycobacterium tuberculosis*

Sánchez-Barinas Christian David ^{1,2}

¹ Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)

² Universidad Nacional de Colombia

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) is one of the most successful pathogens of humanity, being the main cause of tuberculosis, responsible for the highest number of deaths worldwide by an infectious agent that estimates a third of the world's population is a carrier of the bacillus. The evolutionary adaptation of this pathogen is mainly due to its ability to evade the host's immune system, preventing it from displaying an effective immune response in cases where active tuberculosis develops. This is how it is necessary to improve the recognition of the pathogen by actors of the immune system for which dendritic cells (DC). That was how, DC's were derived by standard methods with 1,25 ng/mL IL-4 and 2,5 ng/mL GM-CSF were pulsed with synthetic peptides (n=114) from proteins (n=16) involved in the mycobacterial-host interaction, which have been modified in the amino acid sequence; the strategic changes allow greater interaction with the host MHC-II and thus make the peptides more immunogenic than the native sequences. This interaction allows contact with TCD4+ lymphocytes, which is evaluated by clonal expansion of memory; in addition, these lymphocytes allowed the control of the intracellular growth of *Mtb* in infected macrophages. This work thus contributes to the fact that using peptides modified specifically as vaccine candidates against tuberculosis and pulsed by CD, can increase the individual's immune response, and contribute to the control of *Mtb* infection by antigenic presentation to TCD4+ lymphocytes known as major effectors in immunity against tuberculosis.

Key words: Tuberculosis, synthetic peptides, dendritic cells, multifunctional T lymphocytes, growth inhibition.

Contenido

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	18
HIPÓTESIS	20
ANTECEDENTES	21
OBJETIVOS.....	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
MARCO CONCEPTUAL	24
1.1 Epidemiología de la Tuberculosis.....	24
1.2 Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB)	26
1.3 Respuesta inmune frente a una infección por <i>Mtb</i>	28
1.4 Papel de la célula dendrítica en la infección por <i>Mtb</i>	29
1.5 Métodos <i>in vitro</i> para la obtención de células dendríticas.....	30
1.6 Modelos <i>in vitro</i> para la evaluación de respuesta inmune.....	31
1.7 Procesamiento antigénico de las células dendríticas.....	31
1.8 Activación y diferenciación <i>in vitro</i> de Linfocitos T	33
1.8.1 Diferenciación de sub-poblaciones de Linfocitos T	34
1.8.2 Fenotipos funcionales de Linfocitos T ayudadores “helper”	36
1.9 Receptores inhibitorios en la presentación antigénica	39
1.10 Estado actual de las vacunas contra <i>Mtb</i>	40
5. METODOLOGIA	42
5.1 Análisis Bioinformático	42
5.2 Presencia y transcripción de genes.....	44
5.3 Expresión de las proteínas Rv3623 y Rv3632 en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	45
5.4 Microscopia Inmuno-electrónica (MIE)	46
5.5 Estructura secundaria de los péptidos de las proteínas LpqG y Rv3623.	47
5.6 Ensayo receptor-ligando.	47
5.7 Inhibición de la entrada de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a células blanco.	48
5.8 Evaluación de antigenicidad para los péptidos sintéticos	49
5.9 Análisis bioinformático de unión al MHC-II	50
5.10 Síntesis de péptidos.....	53
5.11 Aislamiento de PBMCs	54
5.12 Diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos	54
5.12.1 Obtención de macrófagos derivados a partir de monocitos	55
5.12.2 Diferenciación de macrófagos a células dendríticas inmaduras.....	55
5.12.3 Maduración de células dendríticas	55
5.13 Inmunofluorescencia.....	56
5.14 Mantenimiento del cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	56
5.15 Infección de macrófagos con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	57

5.16 Evaluación funcional de DC's y estimulación <i>in vitro</i> de LT.....	57
5.17 Linfoproliferación	57
5.17.1 Análisis de citoquinas en el <i>co-cultivo</i>	58
5.17.2 Medición de la producción de anticuerpos en el <i>co-cultivo</i>	59
5.18 Evaluación del control de crecimiento intracelular de <i>Mtb</i> H37Rv	60
6. RESULTADOS.....	61
6.1 Análisis Bioinformático.....	61
6.2 Presencia y transcripción de genes	64
6.3 Expresión de las proteínas en la envoltura celular de <i>Mtb</i>	65
6.4 Estructura secundaria de los péptidos que conforman las proteínas Rv3623 y Rv3632.....	67
6.5 Péptidos sintéticos se unen específicamente a células blanco de infección A549 y U937	70
6.6 Péptidos de alta unión bloquean el ingreso de <i>Mtb</i> a células epiteliales y macrófagos.....	72
6.7 Evaluación de antigenicidad para los péptidos de Rv3623 y Rv3632	76
6.8 Evaluación <i>in silico</i> de la unión de péptidos sintéticos al MHC II	78
6.9 Evaluación de la antigenicidad de péptidos sintéticos de <i>Mtb</i>	85
6.10 Obtención de células dendríticas a partir de PBMCs	87
6.11 Evaluación de la expansión clonal de linfocitos	92
6.12 Identificación del tipo de memoria inmunológica generada por la expansión clonal de linfocitos	97
6.13 Inhibición intracelular de <i>Mtb</i> en macrófagos mediado por linfocitos activados por la interacción TCR/pMHC-II.....	100
6.14 Evaluación de la producción de anticuerpos en el <i>co-cultivo</i> de CDs y linfocitos.	104
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	106
CONCLUSIONES	116
RECOMENDACIONES.....	118
ANEXOS.....	119
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	136
CONSIDERACIONES AMBIENTALES	141
BIBLIOGRAFÍA.....	142

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Incidencia estimada de TB, 2019 a nivel mundial	25
Figura 2. Perspectiva de la envoltura celular de micobacterias.....	27
Figura 3. Respuesta del hospedero frente a la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
Figura 4. Seguimiento de la marcación de células empleando éster diacetato de succinimidil carboxifluoresceína (CFDA, SE).....	34
Figura 5. Diferencia fenotípica de memoria presente en linfocitos	35
Figura 6. Citoquinas requeridas en la diferenciación de LT.....	36
Figura 7. Señalización y regulación transcripcional de la polarización de LT	38
Figura 8. Candidatos a vacuna contra TB.....	40
Figura 9. Diseño metodológico	42
Figura 10. Características de las proteínas Rv3623 y Rv3632 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> evaluadas <i>in silico</i>	62
Figura 11. Presencia y transcripción de los genes rv3623 y rv3632.....	65
Figura 12. Detección de la proteína Rv3623 y Rv3632 en la superficie micobacteriana .	66
Figura 13. Análisis estructural de la proteína Rv3632	68
Figura 14. Análisis estructural de la proteína Rv3623	70
Figura 15. Unión específica de los péptidos de las proteínas Rv3623 y Rv3632 a células blanco de infección.....	71
Figura 16. Citotoxicidad de los péptidos para las proteínas Rv3623 y Rv3632 en la línea epitelial alveolar A549	73
Figura 17. Citotoxicidad para los péptidos de las proteínas Rv3623 y Rv332 en la línea celular de macrófagos U937.....	74
Figura 18. Inhibición de la entrada de <i>Mtb</i> mediada por los HABPs a las células epiteliales A549.....	75
Figura 19. Inhibición de la entrada de <i>Mtb</i> mediada por los HABPs a los macrófagos U937	76
Figura 20. Reconocimiento antigénico de los péptidos que conforman a las proteínas Rv3623 y Rv3632.....	78
Figura 21. Perfil de unión al MHC-II por parte de las secuencias peptídicas HABPs provenientes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	81
Figura 22. Cantidad de uniones de las secuencias peptídicas al MHC-II.	83
Figura 23. Pronóstico de unión al MHC-II por cada uno de los donantes.....	85
Figura 24. Reconocimiento antigénico de los péptidos que conforman a las proteínas por los donantes.....	86
Figura 25. Estandarización de las concentraciones requeridas para optimizar el cambio de fenotipo a dendrítica a partir de monocitos	88
Figura 26. Inducción de la diferenciación de las células dendríticas a partir de PBMCs	90
Figura 27. Inducción del cambio de fenotipo para la formación de células dendríticas en los donantes analizados	91

Figura 28. Índice de proliferación por acción del mitógeno PHA.....	93
Figura 29. Índice de proliferación de linfocitos de donantes PPD- en respuesta a péptidos sintéticos nativos y modificados de <i>Mtb</i>	95
Figura 30. Índice de proliferación de linfocito de donantes PPD+ en respuesta a péptidos sintéticos nativos y modificados de <i>Mtb</i>	96
Figura 31. Inducción de células T multifuncionales específicas a péptidos después de la presentación <i>in vitro</i> mediada por células dendríticas.	99
Figura 32. Control del crecimiento e infección por <i>Mtb</i> en macrófagos para emplear en el <i>co-cultivo</i>	101
Figura 33. Inhibición intracelular de <i>Mtb</i> mediada por linfocitos estimulados al 3 día en el <i>co-cultivo</i>	102
Figura 34. Inhibición intracelular de <i>Mtb</i> mediada por linfocitos estimulados al 5 día en el <i>co-cultivo</i>	104
Figura 35. Determinación de anticuerpos IgG en los sobrenadantes del <i>co cultivo</i>	105

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Péptidos nativos y modificados de las proteínas seleccionadas como candidatos vacunales contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
Tabla 2. Comparación Alelo-péptido específico de unión al MHC-II por parte de donantes genotipificados.	84

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
APC	Células presentadoras de antígeno (del inglés: <i>antigen presenting cell</i>)
BCG	Bacilo Calmette Guérin
CD	Proteína de diferenciación membranal (del inglés <i>clusters of differentiation</i>)
CD's	Células dendríticas
CDi	Célula dendrítica inmadura
CDm	Célula dendrítica madura
CF	Citometría de flujo
CFSE	Carboxifluoresceína (Diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>Major Hystocompatibility complex</i>)
pMHC	Complejo mayor de histocompatibilidad cargado (del inglés <i>Major histocompatibility complex/peptide</i>)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito macrófago (del inglés <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HABPs	Péptidos de alta actividad de unión específica (del inglés <i>high activity binding peptides</i>)
HLA	Antígenos leucocitarios humanos (del inglés <i>human leukocyte antigen</i>)
IFN γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
LT	Linfocito T
LTh	Linfocito T helper o ayudador
PMBCs	Células mononucleares de sangre periférica (del inglés <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M Φ	Macrófago
MDR-TB	Cepas multi drogo-resistente de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización mundial de la salud
SFB	Suero fetal bovino
STAT	Proteínas activadoras de la transcripción y de las señales de transducción (del inglés <i>Signal transducer and activator of transcription</i>)
TB	Tuberculosis
TBA	Tuberculosis activa

Abreviatura	Término
TBL	Tuberculosis latente
TCM	Linfocito T de memoria central
TEF	Linfocito T efector
TEM	Linfocito T de memoria efectora
TEMRA	Linfocito T de memoria efectora CD45RA+
TF	Factor de transcripción (del inglés <i>transcription factors</i>)
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés <i>Toll Like receptor</i>)
TN	Linfocito T virgen o naïve
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocito T regulador
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

Listado de artículos y trabajos publicados

ARTÍCULOS PUBLICADOS

2019- Sánchez-Barinas Christian David, Tabares Luisa, Bermúdez Maritza, Patarroyo Manuel Alfonso & Patarroyo Manuel Elkin. “**Specific Binding Peptides from Rv3632: A Strategy for Blocking *Mycobacterium tuberculosis* Entry to Target Cells?**” *BioMed Research International*, 2019, 13 pages. DOI: [10.1155/2019/8680935](https://doi.org/10.1155/2019/8680935).

2018- Sánchez-Barinas Christian David, Ocampo Marisol, Vanegas Magnolia, Castañeda-Ramírez Jeimmy Johana, Patarroyo Manuel Alfonso & Patarroyo Manuel Elkin. ***Mycobacterium tuberculosis* H37Rv LpqG Protein Peptides Can Inhibit Mycobacterial Entry Through Specific Interactions.** *Molecules* 2018, 23(3),526. DOI: [10.3390/molecules23030526](https://doi.org/10.3390/molecules23030526).

DIRECCIÓN DE TRABAJOS

2020-Pregrado “**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN EFECTORA DE LINFOCITOS T ACTIVADOS POR PÉPTIDOS PROVENIENTES DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv EN MACRÓFAGOS INFECTADOS POR EL PATÓGENO**”. Estudiante Valentina Vergara Vanegas; Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.

2020-Pregrado “**ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOMODULADOR DE ANTÍGENOS PEPTÍDICOS PROVENIENTES DE *Mycobacterium tuberculosis* COMO HERRAMIENTA EN LA BÚSQUEDA DE UNA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS**”. Estudiante Claudia Marcela Gamboa Hernández; Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.

PARTICIPACIÓN EN PONENCIAS

Sánchez-Barinas Christian David; Ocampo Marisol; Vergara Valentina; Gamboa Claudia. 2021. The dendritic cell pulsed with peptides: Master of the regulation in immunology protective response against *Mycobacterium tuberculosis*. En el eje temático de Update on vaccination, diagnosis and treatment in TB, en el X Meeting of the SLAMTB. Monterrey-México.

Sánchez-Barinas Christian David; Ocampo Marisol. 2019. Células dendríticas pulsadas con péptidos sintéticos inducen una respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. En el eje temático de Neurociencia, Educación y Salud en el TERCER ENCUENTRO DE INVESTIGADORES COLOMBO FRANCESES. Pereira-Colombia.

Sánchez Barinas C; Ocampo Cifuentes M. 2018. Uso de células dendríticas en la inducción de respuesta inmune protectora contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. En el área temática de Salud Humana & Animal. III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular-C2B2. Bogotá-Colombia.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una infección transmitida por vía aérea, causada por el bacilo ácido alcohol resistente, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y por otras especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* MTC (1-3). La TB tiene una alta incidencia en la población mundial, afectó a más de 10 millones de personas en 2019 alrededor del mundo y es considerada la primera causa de muerte ocasionada por un único agente infeccioso (4). La aparición de nuevas cepas reportadas como multi-farmacorresistentes es una de las dificultades en el tratamiento médico efectivo (5, 6). Se estima que 2 mil millones de personas a nivel mundial se encuentran infectadas por la bacteria en estado de latencia y 3 millones de personas mueren por esta enfermedad al año (4). Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo del 10% de desarrollar la enfermedad a lo largo de la vida y este riesgo se incrementa en personas cuyo sistema inmune se encuentra comprometido por causa de otro agente infeccioso como el VIH, desnutrición o diabetes (4).

La vacuna BCG (*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin) aplicada desde 1920 protege de la forma diseminada de TB, pero no de la pulmonar; aunque tiene una eficacia variable en la población y cuenta actualmente con la aprobación de la OMS, ya que otorga protección parcial en TB pulmonar (4). Esta vacuna se aplica en dosis única a neonatos para protegerlos contra tuberculosis meníngea y miliar, sin embargo, en adultos no previene la infección ni el desarrollo de TB pulmonar (7, 8). Esto ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias de vacunación, actualmente se están probando 14 candidatos vacunales en diferentes fases clínicas, pero cabe mencionar que solo tres están han alcanzado la fase III (9, 10). Sin embargo, hasta ahora no ha obtenido evidencia suficiente y se desconocen los resultados al evaluar la respuesta inmunitaria protectora a largo plazo de estos candidatos a vacuna, además no existe una correlación entre la protección en modelos animales que pueda ser aplicada a estudios en humanos, lo que ha imposibilitado la validación de un modelo animal (4,10).

Por su parte, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) ha desarrollado una metodología lógica y racional en la búsqueda de antígenos candidatos para una vacuna eficaz contra diversos agentes etiológicos, entre ellos *Mtb*. El enfoque está basado en la identificación de secuencias peptídicas derivadas de proteínas de superficie celular del patógeno, con alta

capacidad de unión específica a células diana de infección (péptidos con alta actividad de unión, en inglés *High Activity Binding Peptides*-HABPs), que inhiben la entrada del patógeno *in vitro*, y con características estructurales específicas. Esta metodología ha llevado a postular antígenos para una vacuna anti-tuberculosa sintética derivados de 34 proteínas seleccionadas hasta la fecha (11-15). Se ha evidenciado que los péptidos sintéticos pueden desencadenar una respuesta inmune para inducir protección, mediante la modificación estratégica de residuos que permitan mejorar la presentación antigénica por medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II (16-18), sin embargo es indispensable que actores del sistema inmune como las células dendríticas potencialicen este efecto protector al presentar a los linfocitos los péptidos mediante la interacción pMHC/TCR y así desencadenar un efecto proliferativo de linfocitos, los cuales son conocidos como los mayores efectores de la respuesta inmune contra tuberculosis.

En este trabajo se propone el desarrollo de ensayos *in vitro* que permitan evaluar la respuesta inmune contra péptidos seleccionados que hacen parte de una propuesta vacunal multiepitópica contra TB, para ello se emplearon CD's derivadas de monocitos de sangre periférica para la correcta presentación de antígenos péptidos. Además se evaluó la carga bacteriana mediante un co-cultivo en el cual, linfocitos T activados por las células dendríticas maduras con los péptidos, permitieron controlar el crecimiento intracelular de *Mtb* H37Rv en macrófagos humanos infectados.

Se logró encontrar un perfil marcado de la polarización clonal de linfocitos T activados por las células dendríticas maduras (CDm) y que éstos tengan un efecto en la disminución de la carga micobacteriana intracelular, así como las citoquinas asociadas al control de la infección. Finalmente estas células dendríticas primadas correctamente podrán ser empleadas en la polarización de linfocitos para la formación de estructuras de granuloma, como también poder ser inoculadas de manera autóloga para contrarrestar los efectos deletéreos ocasionados por la infección de *Mycobacterium tuberculosis*.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La TB es un problema de salud pública, para 2018 la enfermedad cobró la vida de 2 millones de personas y se estimó que 10 millones de personas en todo el mundo están infectadas por la bacteria en estado de latencia (4). La eficacia variable de la vacuna BCG (*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin), junto con la aparición de resistencia a fármacos, ha impulsado la búsqueda de nuevas vacunas contra esta enfermedad (19). A pesar de la ardua labor que llevan a cabo diferentes grupos de investigación a nivel mundial respecto al diseño de una vacuna efectiva contra TB, no se ha logrado tener éxito (20). La carencia de un modelo animal donde reproduzca en su totalidad la sintomatología y patología de la enfermedad hace complejo el método de evaluación de una vacuna contra TB; por otra parte, el hecho de que no exista una correlación directa entre el modelo animal y la respuesta en humanos se ha convertido en una de las mayores limitantes en la evaluación de los candidatos a vacuna (4,10). Pese a los esfuerzos por erradicar la TB aún se hace necesario intensificar esfuerzos para abordar esta enfermedad, mejorando el reconocimiento del microorganismo *Mtb* por las células del sistema inmunológico del hospedero (21); lo anterior, se llevaría a cabo por la correcta presentación de péptidos candidatos a vacuna por parte de las APC. Por ello, se ha planteado usar células profesionales presentadoras de antígenos como lo son las CD, mediante diversos ensayos *in vitro*, identificarlas como una alternativa para la presentación celular, que permita la inhibición de la infección bacteriana a células blanco, identificando los requerimientos circundantes sistémicos como citoquinas, quimioquinas y anticuerpos involucrados en la respuesta contra *Mtb*.

En la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), basados en estudios previos obtenidos en el diseño de una vacuna contra el paludismo (16, 22, 23), se ha propuesto la misma aproximación metodológica aplicada a una vacuna multiepitópica contra tuberculosis. Es así, como se han caracterizado diversos péptidos derivados de proteínas de superficie de *Mtb* implicados en la interacción hospedero-patógeno (11-15), los cuales han demostrado estar involucrados en la interacción micobacteria-célula blanco, que inhiben la entrada de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv de manera dependiente a la dosis del péptido; sin embargo, se ha visto que estos péptidos conservados no son inmunogénicos y posiblemente no sean bien presentados por las células del sistema inmune, lo que hace difícil evaluar *in vitro* su papel en

la protección contra *Mtb*. Por ello, para el desarrollo de una vacuna sintética contra TB se plantea en el presente proyecto la evaluación *in vitro* del uso de células dendríticas y su efecto sobre la linfoproliferación de linfocitos en el modelo humano. Por lo tanto, la pregunta de investigación a responder es: **¿Las células dendríticas pueden presentar péptidos sintéticos (modificados y nativos) contra tuberculosis para generar una respuesta inmune frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en un modelo *in vitro*?**

HIPÓTESIS

El uso de células dendríticas como adyuvantes en la presentación de péptidos no inmunogénicos por el MHC clase II, permitirá una activación de la respuesta inmune, induciendo la proliferación de linfocitos y a su vez una expresión de citoquinas pro-inflamatorias, lo que tendría un efecto en la disminución del crecimiento intracelular de *Mtb* H37Rv en macrófagos infectados.

ANTECEDENTES

La TB es definida como una enfermedad infectocontagiosa que suele afectar los pulmones y es causada principalmente por una bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis*, esta bacteria es transmitida de persona a persona a través de gotas generadas desde el sistema respiratorio de personas con tuberculosis pulmonar activa (TBA), sin embargo, no todas las personas infectadas enferman pues la mayor parte de ellas, con un sistema inmune óptimo, pueden resolver rápidamente la infección (24, 25). El sistema inmune puede eliminar los bacilos de la TB que se multiplican o puede mantener a los bacilos en estado de latencia (TBL) durante años (26). Si no se recibe tratamiento, cada persona con tuberculosis infecciosa transmitirá los microorganismos patógenos a unas 10 a 15 personas cada año (25, 26). A la fecha, el tratamiento contra la TB consiste en la medicación por seis meses de una serie de antibióticos, donde el extenso período del tratamiento, junto con los efectos secundarios producidos por los medicamentos antituberculosos y la aparición de cepas drogo resistentes, hacen que éste sea una solución limitada con respecto al enorme problema que representa la enfermedad. Por otra parte, las investigaciones resultantes a la fecha para la comprensión de los mecanismos patogénicos e inmunológicos en TB se derivan de estudios en animales de experimentación; sin embargo, los resultados obtenidos en modelos animales para muchas enfermedades infecciosas y especialmente para tuberculosis son confusos con respecto a que la respuesta inmunológica no se extrapola con lo sucedido en humanos (25, 28).

Las células presentadoras de antígeno (APC), como las CD's juegan un rol crítico en la determinación de la polarización de linfocitos T (LTh1/Th2), además se conoce que las CD's orientan la relación entre inmunidad innata y adaptativa (24). Se ha reportado que después de que la APC ha presentado antígenos al LTCD4+ en el bazo, se dirigen al pulmón con el fin de controlar la infección, pero no logran erradicar la micobacteria lo que sugiere que las células T CD4+ efectoras no reconocen las células infectadas por *Mtb*. Esto puede ocurrir a través de la inhibición de la presentación del antígeno por las moléculas MHC de clase II (24-26) ocasionado por la micobacteria.

Hasta ahora se ha reconocido que el nivel de efectividad para una vacuna contra TB radica en la capacidad de activar la respuesta inmune T helper1 (Th1) mediante las APC, se han reportado

muchas proteínas que son capaces de inducir la activación de LT CD4+, pero pocas se han probado en ensayos clínicos para el diseño de una vacuna contra TB (27). Los candidatos vacunales contra la TB se han centrado en antígenos fuertemente estimulantes de LT como lo son antígeno 85 (Ag85) y ESAT-6 (6 kDa *early secretory antigenic target*) (29, 30). Se ha demostrado que ESAT-6, componente de vacunas como H1 o H56, es capaz de conferir protección eficaz contra *Mtb* H37Rv en modelos animales mediante un ensayo de pre y/o post-exposición al agente infeccioso (31). Ensayos de este tipo, sugieren que antígenos micobacterianos inducen una inmunidad protectora mediante la activación de CD, lo cual es el objetivo en el desarrollo de una vacuna. De hecho, CD estimuladas con BCG o antígenos de *Mtb* inducen una protección respecto a la disminución de carga bacteriana en bazo y pulmón después de un reto con dosis moderadas de *Mtb* virulenta en modelo murino C57BL6 (32, 33).

Este tipo de estrategias tienen como finalidad recuperar o aumentar la respuesta del sistema inmunológico promovido por la infección con *Mtb* que permite el restablecimiento de la capacidad anti tuberculosis mediada por células T ayudadoras (LTh). Sin embargo, la principal dificultad de este sistema de vacunación radica la prevalencia en el tiempo de la respuesta generada, perdiendo su efectividad hasta el punto de tener una baja actividad en la protección contra el bacilo *Mtb* (32, 33).

El grupo funcional Tuberculosis de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia ha identificado, desde una aproximación funcional, péptidos derivados de las proteínas de *Mtb* localizadas en la envoltura bacteriana, que están presentes en la interacción antígeno-hospedero (11-15, 34-45) y para los cuales se ha demostrado están involucrados con el bloqueo de la entrada del bacilo a macrófagos y células epiteliales alveolares, pero se desconoce capacidad inmunogénica y su actividad después de ser reconocido por una célula especializada en la presentación de antígenos. Teniendo en cuenta que las secuencias de los péptidos identificados no son reconocidas por el sistema inmune del hospedero, este proyecto plantea el uso de células dendríticas en la presentación *in vitro* de las secuencias y hacerlas más inmunogénicas en el control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de células dendríticas para generar una respuesta inmune *in vitro* contra antígenos peptídicos provenientes de proteínas de superficie de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv como posibles candidatos a vacuna contra tuberculosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Identificar secuencias peptídicas candidatos a vacuna derivadas de proteínas de la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
- 2.** Identificar secuencias en los péptidos sintéticos que se presenten por MHC-II provenientes de *Mtb*, considerados como candidatos en la vacuna sintética contra TB.
- 3.** Evaluar el uso de células dendríticas en la presentación *in vitro* de péptidos sintéticos.
- 4.** Evaluar la inmunogenicidad *in vitro* inducida por los péptidos presentados por células dendríticas, en el control del crecimiento de *Mtb* en macrófagos infectados.

MARCO CONCEPTUAL

1.1 Epidemiología de la Tuberculosis

Luego de ser descubierto por Robert Koch la existencia del bacilo *Mtb* (en 1882), la publicación de su genoma para la cepa H37Rv (en 1998) proporcionó información con gran potencial para identificar, entre todo el repertorio de material genético, aquellos que son claves para la virulencia, patogénesis, supervivencia, y latencia de la micobacteria (1-3). Ese descubrimiento y el gran avance en el análisis del microorganismo hizo pensar en la posibilidad del diseño de fármacos contra la enfermedad y la obtención de una vacuna efectiva contra TB, para así finalmente mejorar o reemplazar la BCG, que actualmente está avalada por la OMS, pero que presenta una protección controvertida por la variedad de resultados entre 0-80 % (7, 8).

La Organización mundial de la salud (46) tiene como objetivo para el año 2030 dar fin a la epidemia mundial de TB (4). Aunque la mortalidad asociada a TB ha disminuido un 47 % desde 1997, gracias al avance para el diagnóstico efectivo y el tratamiento profiláctico previo al desarrollo de la enfermedad activa con antibióticos como rifampicina (47), (isoniacida, pirazinamina y etambutol entre otros, en todo el mundo la TB es una de las 10 principales causas de muerte y la principal a causa por un agente infeccioso, por encima de VIH/SIDA, causando un estimado de 1.3 millones de muertes anuales y un aproximado de 300 mil muertes adicionales en personas que presentan co-infección con HIV (4). Aproximadamente 10 millones de personas desarrollan TBA cada año, además se estima que hasta 2 mil millones de personas han sido infectadas con el agente causal, *M. tuberculosis* sin que desarrollen la enfermedad, es decir con tuberculosis latente (TBL), la enfermedad anualmente cobra la vida de 5.8 millones de hombres y 3.2 millones de mujeres (4).

El aumento de casos de TB a nivel mundial se ha atribuido a múltiples factores como la reemergencia de la enfermedad en lugares donde se consideraba eliminada, la aparición de nuevos casos de resistencia a antibióticos (TB- MDR) y TB extremadamente resistente a

medicamentos (TB- XDR), el incremento de las personas infectadas con VIH y los poco eficaces programas de control de la propagación de la enfermedad (4-6).

A nivel mundial en 2020, se estimaron 14 millones de casos de TB (**Figura 1**), equivalente a 133 casos por 100 mil habitantes, estos datos tienen una alta distribución, pero se localiza principalmente en algunos lugares como la región de Asia Sudoriental con un 44%, seguido de África y región del pacífico occidental con un 24 y 18 % respectivamente. Una menor proporción de la infección por el bacilo tuberculoso fue dada en la región del Mediterráneo oriental (8 %), las Américas con un 3 % y Europa con 3 %. La incidencia de la enfermedad se ha visto aumentada por la aparición de cepas multi-farmacoresistentes (MDR-TB), lo que dificulta su completo tratamiento mostrando medio millón de casos nuevos de TB resistentes a rifampicina (10 casos/100 mil personas) (4-6, 48).

Los países más afectados son India (27 %), China (9 %), Indonesia (8 %), Filipinas (6 %), Pakistán (6 %), Nigeria (4 %), Bangladesh (4 %), Sudáfrica (3 %) y otros que corresponden al 33 %. Aunque se han obtenido una disminución en la tasa de incidencia de 2.0 % por año entre 2019-2020, la reducción acumulada de casos entre 2015 y 2018 fue solo del 6.3 % y un 11% de disminución de muertes en el mismo lapso (4).

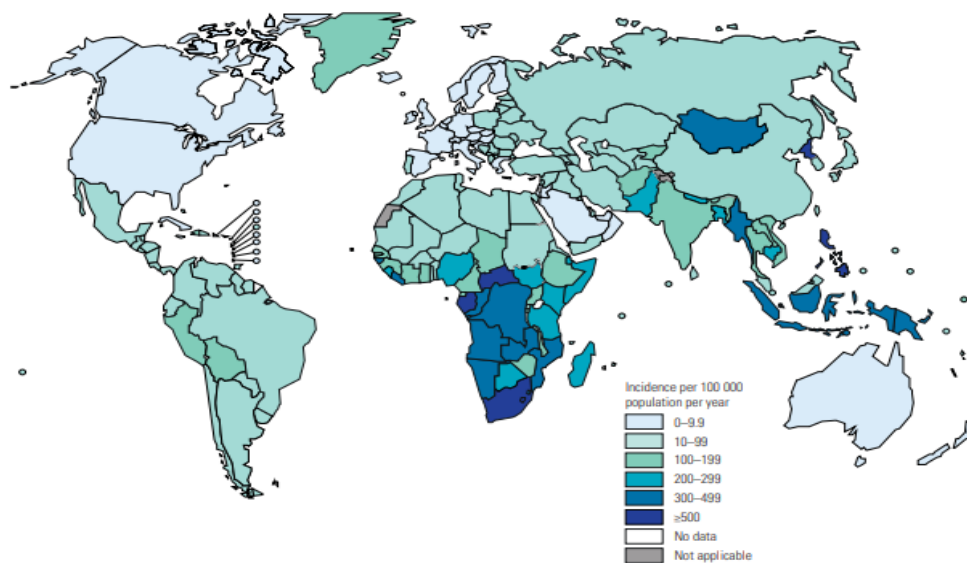


Figura 1. Incidencia estimada de TB, 2019 a nivel mundial. Los países con mayor presencia de *Mycobacterium tuberculosis* corresponden a Nigeria, Sur África, Pakistán, India, Bangladesh, Indonesia, China y Filipinas entre un rango aproximado de 100.000 – 2,5 millones de casos reportados. Los 30 países con alta carga bacteriana

representaron el 87% de todos los casos estimados de mayor prevalencia/incidencia en el mundo. Tomado de global Tuberculosis Report, World Health Organization-WHO, 2018 (4).

Según la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, Pan American Health Organization) para el 2019 se notificó para las Américas un total de 289.00 casos de TB en todas sus formas, 5.900 casos de TB asociada a VIH y 11.000 casos MTB-MDR. Los países con mayor incidencia de TB en general fueron Brasil (32 %), Perú (14 %) y México (10 %), Colombia reporta un total de 16.000 casos (6 %) ocupando el quinto puesto de casos presentados. Se estimó el número de muertes por TB en 1.400 personas (6%) para Colombia, para un total de 23.226 muertes en las Américas (46). La cobertura del tratamiento contra TB (en todas sus formas) es del 94.5 % y la tasa de éxito del tratamiento el del 76 %, perpetuando la cadena de transmisión en la comunidad, lo que limita el control de la enfermedad hacia la eliminación (46). Para el caso particular de Colombia, el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud (INS), para el reporte epidemiológico 16 de 2021 notificó la existencia de 8.182 casos de TB de todas las formas, un valor inferior al reportado en 2020 (9.868 casos incluyendo los datos por MDR-TB; en esta misma semana se reporta un 82,6 % de TB pulmonar con una incidencia de 12,09 casos/100.000 habitantes a nivel nacional, lugares con mayor incidencia son Antioquia, Bogotá, Cali, Santander, Valle y Barranquilla (49).

1.2 Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y está formado por bacilos aerobios, inmóviles (excepción *M. marinum*) y no esporulados que se caracterizan por ser bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR) debido a la presencia de una compleja pared celular, caracterizada por su alto contenido de lípidos (50, 51) el componente principal de la membrana celular micobacteriana es el fosfatidilinositol manósido, entre otras; la estructura continua con la pared celular que está conformada por: una capa de peptidoglicano (**PG**), arabinogalactano (**AG**) y lipoarabinomano (**LAM**); finalmente, la cápsula está compuesta por ácidos micólicos, porinas, dimicolato de trehalosa (**TDM**), lipomano (**LM**), trehalosa monomicolato (**TMM**) y **PIM** (50-52). Los ácidos grasos de cadena larga son característicos del género Actinobacteria, que ha demostrado estar involucrado en la capacidad de *Mtb* para sobrevivir dentro del hospedero al inhibir la respuesta inmune (**Figura 2**).

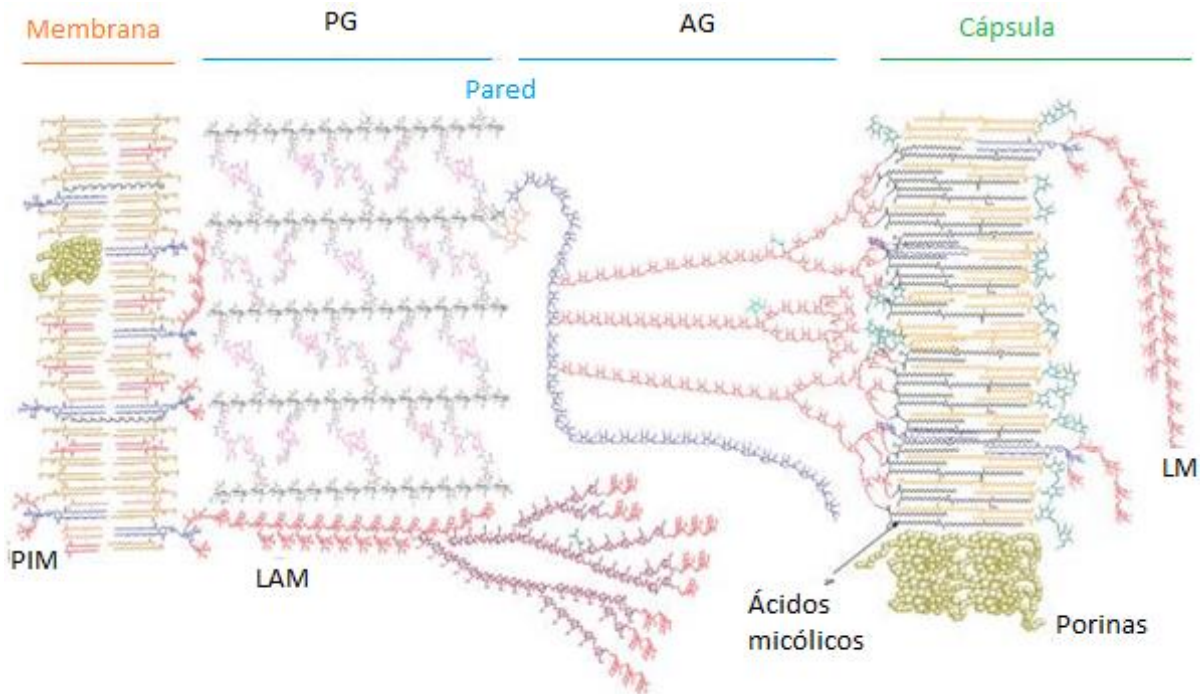


Figura 2. Perspectiva de la envoltura celular de micobacterias. La pared celular micobacteriana es una estructura compleja compuesta por tres macromoléculas distintas: peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos. En la membrana se encuentran diferentes proteínas y polisacáridos descritos como inmunógenos. Tomado y modificado de Kaur, 2009 (52) y Kieser, 2014 (53).

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) consiste en especies estrechamente relacionadas, con 95% de homología en su ADN que causan tuberculosis tanto en humanos como en animales (1-3, 54, 55). El complejo está conformado por 9 especies: el agente más importante es *M. tuberculosis*, este afecta a más de un tercio de la población humana; seguido de *M. canetti* y *M. africanum* que también causan la TB en humanos, principalmente de ascendencia africana; *M. bovis* afecta tanto humanos, como bovinos y cabras; *M. microtti* se ha aislado de roedores del género *Microtus*, aunque también se puede encontrar en humanos inmunosuprimidos; *M. caprae* se relaciona con la infección en cabras; *M. pinnipedii* que causa la infección en focas; *M. mungi* que afecta a las mangostas anilladas, mamíferos africanos⁶¹; por último, *M. orygis* descrita en el año 2012, se identificó en animales pertenecientes de la familia *Bovidae*: oryxes, gacelas, ciervos y antílopes (54, 55).

1.3 Respuesta inmune frente a una infección por *Mtb*

La persona infectada con TBA es capaz de transmitir por vía aérea mediante expectoración el bacilo intracelular obligado que se encuentra encapsulado en microgotas, el cual viaja hacia los alveolos pulmonares del nuevo hospedero y se aloja dentro de células epiteliales como de APC como los macrófagos. La fagocitosis mediada por diversos mecanismos de contracción celular, lleva al patógeno a nivel intracelular; algunas moléculas presentes en la membrana bacteriana de *Mtb* como lipoproteínas y glicolípidos (**Figura 2**) son reconocidas por receptores Toll-Like (TLR) (6, 57) y por proteínas de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) (58-60), dando como resultado la liberación de segundos mensajeros como citoquinas y quimioquinas inflamatorias; sin embargo, esto resulta ser poco eficiente debido a que la bacteria impide ser procesada por el fago-lisosoma para su posterior acople al MHC (21, 61). Luego algunas células presentadoras son capaces de viajar a órganos de presentación secundaria, como los nódulos linfáticos y allí es donde la inmunidad adaptativa se desarrolla a través de la presentación del antígeno a linfocitos T (LT) vírgenes mediante el complejo MHC/ péptido/ TCR, permitiendo el desarrollo de un perfil efector y de memoria. Los linfocitos efectores luego migran hacia sitios de la infección, para controlar el crecimiento de la bacteria, mediando la formación del granuloma por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (61).

En la infección temprana por *Mtb* en los pulmones se elevan los niveles de IFN- γ producido principalmente por LT (CD4+ principalmente) permitiendo el control de la carga bacteriana presente, o enviando señales para que activen otros tipos de células como LT CD8+, células T $\gamma\delta$, MAIT (mucosal associated invariant T), las cuales son importantes para el control de la infección y por consiguiente la diseminación bacteriana conformando el denominado granuloma temprano (**Figura 3**) (61, 62).

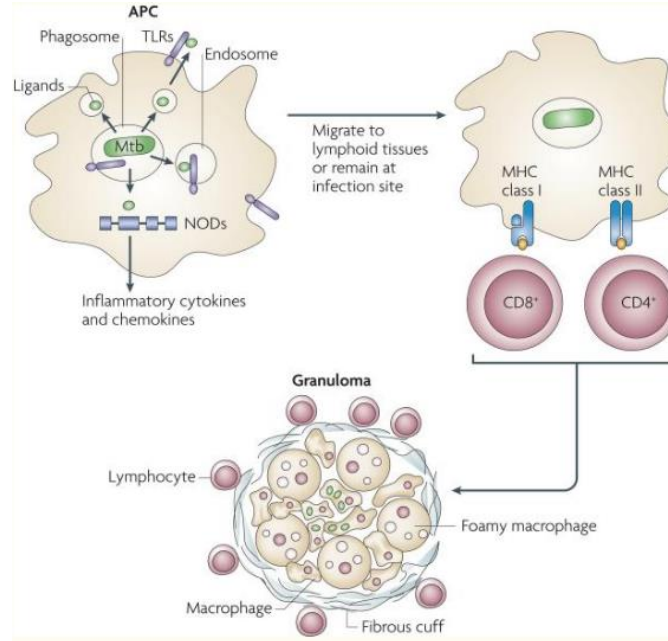


Figura 3. Respuesta del hospedero frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. El bacilo es fagocitado por una APC y sobrevive en el fagosoma, algunas partes estructurales de la bacteria son reconocidas por proteínas como TLR y NOD liberando a su paso citoquinas inflamatorias. Luego algunas células que logran reconocer a *Mtb* migran hacia nódulos linfáticos de presentación antigénica, procesando al antígeno mediante proteólisis para luego ser presentado por el MHC, los cuales migran al sitio de infección y mediante la secreción de citoquinas efectoras (pro-inflamatorias) dando origen a la contención del patógeno por la formación del granuloma. Tomado de Awuh, 2016 (61).

En los seres humanos 9 de cada 10 individuos sanos son capaces de controlar la infección por *M. tuberculosis* en los pulmones. Sin embargo, cuando no se eliminan, las micobacterias pueden persistir por muchos años, alojadas dentro de los macrófagos que hacen parte constitutiva del granuloma y logran evadir la respuesta inmune del huésped, como también se ha reportado que un tercio de la población mundial es capaz de contener la infección formando una estructura multicelular llamada granuloma (63, 64).

1.4 Papel de la célula dendrítica en la infección por *Mtb*.

Las CD's juegan un rol como células profesionales presentadoras de antígenos, en la respuesta inmune innata y la conexión con la respuesta inmune adaptativa manteniendo la tolerancia contra cualquier infección. *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es uno de los patógenos más exitosos en la supervivencia en el cuerpo humano (4), la adaptación del patógeno se debe a que sobrevive

dentro de APC como macrófagos (MΦ), monocitos (Mn) y CD's, inhibiendo la maduración del fagosoma para evitar la muerte y el despliegue de una respuesta inmunológica tal como la presentación de antígenos por parte de las células presentadoras, la asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II para bloquear el estímulo a linfocitos T CD4+ conocidos como los mayores efectores en la inmunidad contra tuberculosis (21, 65). Los diversos mecanismos existentes de evasión de la respuesta inmune permite a *Mtb* establecer una infección persistente o latente en las APC dando como resultado la inhibición dependiente del receptor tipo Toll-2 (Toll-like 2, TLR2) y de la expresión de MHC-II (66); esta reducción refleja un mecanismo general de retroalimentación negativa que previene la inflamación excesiva mediada por células T recreado un ambiente hostil de supervivencia para *Mtb* en los macrófagos infectados, permitiéndole evadir el reconocimiento por parte de células T CD4+ conjunto a las ambiente mediado por las citoquinas.

1.5 Métodos *in vitro* para la obtención de células dendríticas

En los seres humanos hay dos grupos de CD's primarias, unas de origen mieloide caracterizadas por la expresión de CD11c y CD33 que se hallan principalmente en la dermis de tejidos y circundantes en sangre y las CD's de linaje linfoide o plasmacitoides que expresan CD123 y CD45RA, circulantes en sangre. La baja frecuencia de CD's primarias en sangre periférica dificultó por mucho tiempo su estudio, hoy en día mediante diversas metodologías se han logrado diferenciar cantidades considerables de estas células a partir de monocitos (Mn) que son menos del 1% en sangre periférica. Varios métodos descritos *in vitro* proponen cultivar monocitos con citoquinas humanas (IL-4 y GM-CSF) (67-70) y madurarlos empleando diferentes agonistas de receptores tipo Toll (TLRs). Entre éstos, se han descrito el uso de citoquinas pro-inflamatorias IL-1β, IL-6 y TNF-α junto con PGE2 denominado como coctel estándar (67,71) o se puede emplear IL-1β, IL-6 y TNF-α en combinación con IFN (α-γ) y Poly I:C para obtener las conocidas como CD's tipo I alfa polarizadas (αDCs) que se caracterizan por inducir una respuesta Th1 mediadas por la producción de IL-12 (72). Cabe resaltar que ambas metodologías planteadas para la obtención de células dendríticas no muestran un perfil de maduración diferente, además ambos tratamientos son eficientes para estimular LT CD4+ y CD8+, la principal diferencia radica

en que las CD's tipo I alfa secretaron altas cantidades de IL-12p70 y fomentaron mejor la expansión de memoria Th1 (73).

1.6 Modelos *in vitro* para la evaluación de respuesta inmune

Existen diversos ensayos que permiten la evaluación de la respuesta inmune, pero no todos permiten el uso de baja cantidad de células, esto dificulta la evaluación de activación de LT mediado por CD. Recientemente el uso de PBMCs en alta densidad ha permitido simular una respuesta *in vivo*. El cultivo de PBMCs previo al reto con un antígeno favorece la capacidad de detección de las respuestas a LT, este modelo se basa en la inducción de CD's en la mezcla total de PBMCs sin previa purificación de monocitos (74, 75); una ventaja notable para esta metodología es que reduce el número de células requeridas para la evaluación funcional de LT específicos de antígenos además de ser observados en períodos cortos de tiempo *in vitro* (2-6 días), otro punto a favor es el tiempo de contacto que dura el cultivo pues los linfocitos siempre están en contacto en el proceso de diferenciación, maduración y presentación de moléculas antigénicas por parte de CD, lo cual facilita su activación dependiente en gran medida por los LT de memoria.

Otra metodología ampliamente empleada es la amplificación/diferenciación de LTCD4+ naïve (vírgenes) estimulados con CD's autólogas derivadas de línea linfoide, esta metodología resulta ser más compleja (14 días de activación), y facilita el estudio de LT vírgenes antígeno específico. Una ventaja de este método radica en que la dosis a emplear puede ser similar a la fisiológica, además que no emplea requiere factores de crecimiento durante el cultivo (como por ejemplo IL-2) y el procesamiento de antígeno es por mecanismos propios de CD y no por otros sistemas como transfección (73).

1.7 Procesamiento antigénico de las células dendríticas

La presentación de antígenos por parte de las células dendríticas depende del estado de diferenciación desde un perfil inmaduro (CDi) a uno maduro (CDm) (76), en donde en este último

ha disminuido la actividad endocítica y ha aumentado la expresión en superficie de moléculas MHC clase II (77), junto con la expresión de moléculas co-estimuladoras en un ambiente rico en citoquinas inflamatorias (78, 79 además la dendrítica deriva a un perfil no inflamatorio aumentando la excreción de IL-10 (80).

En condiciones homeostáticas, las CDi expresan el receptor CCR5 y migran en respuesta a la proteína inflamatoria-1 alfa (MIP-1 α) como señal para capturar el antígeno, luego se trasladan a órganos linfoides periféricos y presentan el antígeno a LT; esta migración desde vasos sanguíneos depende del receptor de quimiocina CC tipo 7 (CCR7) que tiene alta afinidad hacia su ligando CCL19 que es secretado por las células del sistema linfático (81) y responden exclusivamente a MIP-3 β y 6Ckine (CCL21), en este punto la CD ya ha cambiado a un perfil maduro. La eficacia de CDm en la estimulación de células T no radica solo en su capacidad de capturar y procesar el antígeno, sino también en sus altos niveles de expresión de moléculas co-estimuladoras CD80, CD83 y CD86 junto con un ambiente de citoquinas, la producción de quimioquinas, primordiales en la respuesta inmune celular (82, 83).

En la presentación antigénica, la superficie celular de la CD contiene receptores endocíticos como el receptor de manosa (84) y CD205 (DEC-205) para proteínas glicosiladas de antígenos, y receptores IgFc para complejos antígeno/anticuerpo de esta manera cualquier patógeno reconocido por la célula presentadora, es ingresado y pasa a ser degradado con el fin de obtener fragmentos peptídicos que se ensamblan al complejo mayor de histocompatibilidad (pMHC), que ocurre en compartimentos celulares endosómicos (proteosoma o lisosoma) y luego estos pMHC se transportan hasta la membrana celular para que ocurra la presentación a LT (79, 85,86). Se ha reportado que CDi que expresan en su superficie moléculas MHC-II vacías, así como HLA-DM, conjuntamente liberan proteasas que actúan extracelularmente para procesar proteínas con la finalidad de cargar nuevamente el MHC-II (87) funcionando como una vía de procesamiento antigénico. Y aunque normalmente las CD's son capaces de absorber el antígeno a través de endocitosis, una vía que es activa en APC, puede también darse un tipo de presentación sin necesidad de un procesamiento más complejo a nivel intracelular (88).

1.8 Activación y diferenciación *in vitro* de Linfocitos T

Para responder adecuadamente a una infección, el reconocimiento inmunogénico debe partir de una población de LT con fenotipo de células naïve (Th0) y dirigirlo a un perfil de células efectoras capaces de producir una variedad de citoquinas como IFN- γ , TNF- α y una serie de interleuquinas. Durante el proceso de diferenciación de vírgenes a efectoras debe pasar previamente por un fenotipo de memoria capaces de responder de manera efectiva contra el reto antigénico (89). La activación temprana de LT es evidenciable por varios fenómenos como internalización del TCR el cual está implicado en la interacción con el complejo mayor de histocompatibilidad cargado con el péptido (pMHC) de las APC, por otra parte se observa expresión de CD25 que hace parte del receptor de IL-2 que facilita la proliferación y diferenciación de las células mediante STAT5 y quinasas SOS/ERK, PI3K/AKT; la expresión CD69 es descrita como un marcador temprano de activación en LT CD4+ y CD8+, su rol radica en suprimir las células activadas al unirse con CD69L, y finalmente se expresa de manera constitutiva CD154 (CD40L) fundamental para activación de APC, lo cual conlleva a la producción de IL-12 necesaria para la síntesis de IFN- γ por parte de LT (90-94).

Para determinar la proliferación de linfocitos en presencia de un estímulo, se realiza comúnmente un ensayo de marcaje de células con éster succinimidil de carboxifluoresceína (CFDASE), que se caracteriza por su baja toxicidad garantizando la viabilidad celular. El CFDASE tiene una forma di-acetilada que facilita la permeabilización en la membrana celular; una vez ingresa al citosol, las esterasas intracelulares hidrolizan los dos grupos acetato laterales y permiten que se acople covalentemente a los grupos aminos libres de proteínas presentes, lo que permite mantener una emisión constante de fluorescencia definida por carboxifluoresceína (CFSE) (95) Cuando se clivan los grupos acetatos, la molécula se vuelve menos permeable; debido a su lipófila reducida (96). En algunos casos, la CFSE se acopla a moléculas para formar conjugados (CFR 1) que se degradan rápidamente y salen a través de la membrana plasmática, en otros casos los conjugados de CFSE (CFR 2) son estables y no pueden salir de la célula, estos son los que permiten el etiquetado final de los linfocitos (**Figura 4**) (95)

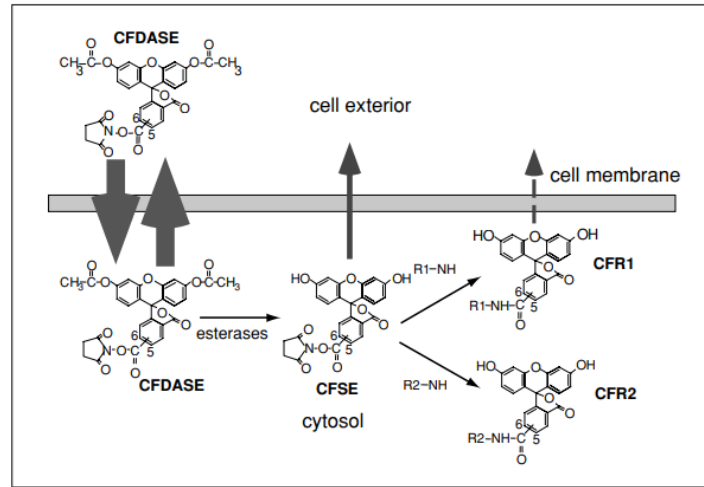


Figura 4. Seguimiento de la marcación de células empleando éster diacetato de succinimidil carboxifluoresceína (CFDA, SE). El CFDAse permeabiliza la membrana celular a través de dos grupos acetato en sus laterales; una vez ingresa al citosol, las esterasas hidrolizan los grupos acetato convirtiendo la molécula en CFSE que rápidamente se acopla covalentemente a los grupos amino libres de proteínas presentes en citosol, así se estabiliza su estructura en lo denominado CFR2. Tomado de Quah B. (2010) (95).

Luego así, después de la estabilización de la molécula en el citosol, es posible evaluar la proliferación celular a través del proceso homeostático de mitosis, el cual mediante la división celular hay una disminución de la fluorescencia de manera secuencial en relación con la existencia de más poblaciones (95).

1.8.1 Diferenciación de sub-poblaciones de Linfocitos T

Los linfocitos T (Th0 o naïve) se caracterizan por no haber experimentado contacto con el antígeno específico; una vez estimulados, con la formación de la sinápsis inmunológica por APCs maduras cargadas con péptido específico y bajo un ambiente pro-inflamatorio, comienzan el proceso de diferenciación a LT de memoria o LT efectores; definidos bajo la caracterización de marcadores como CD45RA y CCR7, siendo las doblemente positivas el fenotipo virgen (TN), las células de memoria central (TCM) se caracterizan por el cambio de isoforma CD45 RA a RO y pierden la capacidad de migración CCR7 generando un fenotipo de células efectoras de memoria (97-99) y luego pasan a adquirir la isoforma RA del CD45, convirtiéndolas en células efectoras totalmente diferenciadas (TEF o también denominadas TEMRA) (Figura 5) (97).

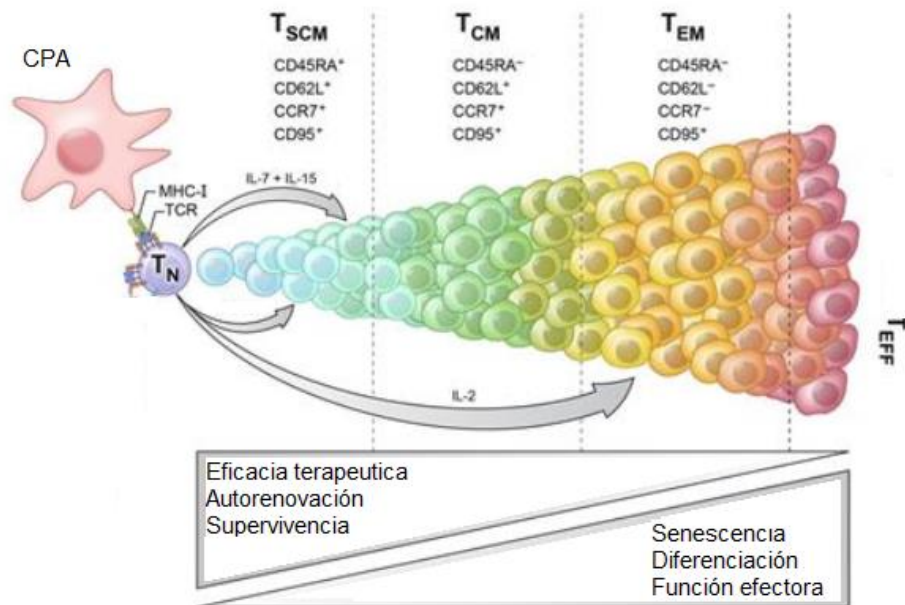


Figura 5. Diferencia fenotípica de memoria presente en linfocitos. Linfocitos expuestos a la presentación del antígeno por una APC es capaz de inducir no solo una diferencia a un perfil linfocitario (Th), sino desarrollar un tipo de memoria efectiva para responder a este estímulo cada vez que se exponga el hospedero, como se observa este tipo de memoria se puede evaluar por la sobreexpresión o supresión de algunas moléculas como CD45RA, CD45RO, CCR7, CD95 y CD62L. Tomada y adaptada de: Gattinoni (2013) (100).

Para que se de esta adquisición de fenotipo de memoria, se requiere de la presencia de IL-2 y IL-15, proporcionadas por las CD durante la presentación del antígeno; de esta manera se activan y proliferan las células T vírgenes. Además, requieren citoquinas de supervivencia, que van a estar involucradas en la transformación a célula de memoria, estas son la IL-7 y la IL-15, que tienen la función de inducir una ligera proliferación y de estimular la expresión de proteínas anti apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X L), brindando así, una vida media más larga (100).

El proceso de diferenciación de memoria de TN→T_{SCM}→T_{CM}→T_{EM}→TEF, está direccionado conjuntamente por la presencia de ciertas citoquinas como IL-7, IL-15 para TEM, mientras no tienen efecto sobre TCM ni sobre TN (89), cada una de estas cuatro sub-poblaciones posee funciones propias que las diferencian entre sí, TCM produce IL-2 mientras que TEM se caracteriza por la expresión de funciones efectoras como la producción de IL-4 o IFN-γ (Figura 5) (99).

1.8.2 Fenotipos funcionales de Linfocitos T ayudadores “helper”

La frecuencia de LT naïve específicas de epitopes tienen un papel importante en la formación de la memoria y en la especificidad de la respuesta inmune contra infecciones (101, 102), cuando entran en contacto con el antígeno adquieren un perfil de células T ayudadoras (LTh) CD4+ que presentan una gran diversidad de estados epigenéticos que caracterizan su función y fenotipo de supervivencia (80). Estos estados polarizados incluyen las células Th1, Th2, Th17 y Treg (Figuras 6 y 7) (102), así como poblaciones más recientes descritas como Th9, Th22 y Tfh (foliculares ayudadoras) (103).

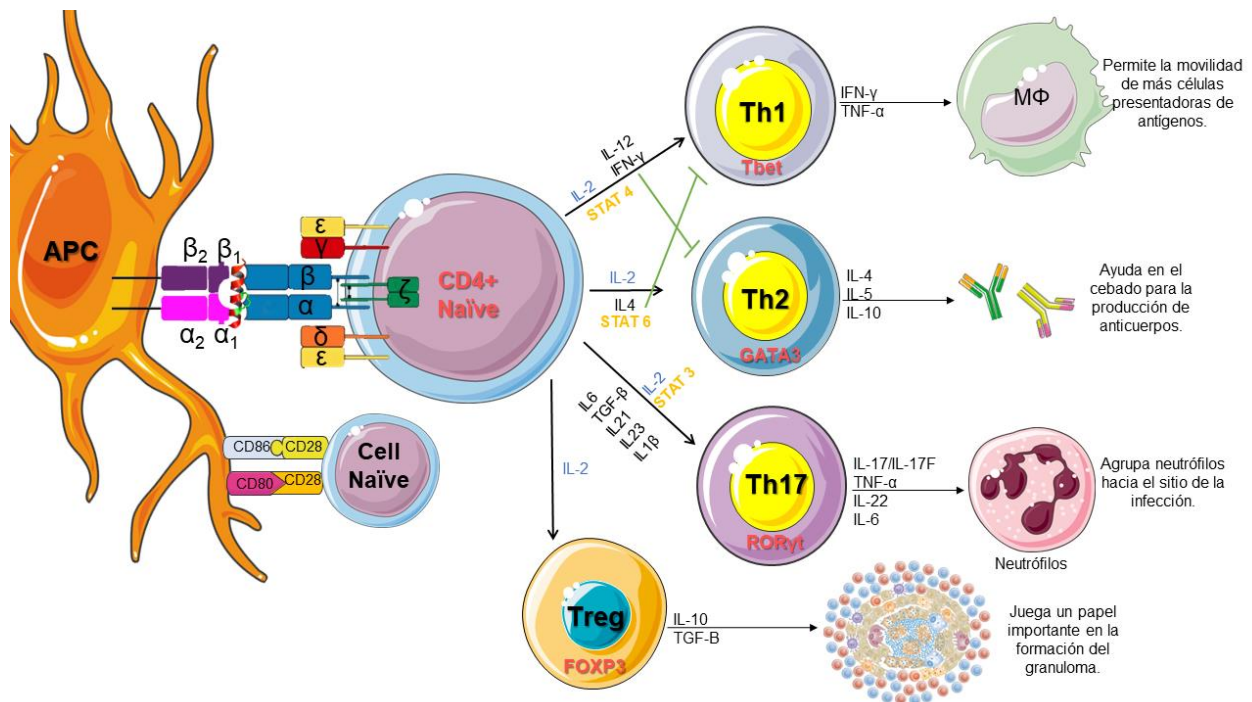


Figura 6. Citoquinas requeridas en la diferenciación de LT. Las citoquinas requeridas para inducir el cambio del fenotipo del perfil Th0 hacia diferentes linajes ayudadores (Th) que han sido estimulados por APC mediante pMHC/TCR LT este cambio de fenotipo Naïve se debe al ambiente circundante de citoquinas, como también a la activación de factores de transcripción mediados por proteínas STAT; al lado derecho se observan las principales citoquinas liberadas por cada subpoblación celular y su efecto en la respuesta inmune. Tomado y modificado de Leung, 2010 (104).

Se ha evidenciado que factores de transcripción (TF) tienen una gran influencia en el destino y la diferenciación de las células inmunitarias. El uso de ratones *knockout* han permitido la identificación de varios TF implicados en el compromiso con el linaje de células ayudadoras como

también en la regulación de la maduración de células NK. Los distintos estados diferenciados de las diversas subpoblaciones reguladoras efector CD4+ están determinados en gran medida por el conjunto de factores de transcripción que expresan y los genes que transcriben (**Figura 7**). La inducción de los patrones distintivos de la expresión génica puede lograrse de varias maneras, pero *in vitro* los principales determinantes del estado diferenciado de la célula son el conjunto de citoquinas presentes durante el proceso de activación mediado por el receptor de la célula T (TCR) (105).

Los factores de transcripción y las proteínas transductoras y/o activadoras de la transcripción de señalización (STAT) son indispensables para la determinación del destino de las células LTh y la producción de citoquinas. La actividad de los principales factores de transcripción está determinada principalmente por sus niveles de expresión, mientras que las de las STAT están reguladas por la modificación postraduccional mediante la presencia de citoquinas. Las proteínas STAT activadas, en colaboración con los principales factores de transcripción, no solo regulan la producción de las citoquinas clave por las células ayudadoras, sino que también juegan un papel importante en la inducción de los factores de transcripción. Otros factores de transcripción, expresados constitutivamente o inducidos por TCR y / o señalización mediada por citoquinas, también están implicados en la ejecución o ajuste de las funciones de las células LTh lo que es crítico en la expansión clonal de estas células (**Figura 7**) (103).

Los fenotipos celulares presentan un paradigma respecto a su acción en la regulación del control de la infección y se ha logrado establecer que células Th1 protegen al huésped de los patógenos intracelulares, mientras que las Th2 protegen contra agentes infecciosos extracelulares. Cabe resaltar que cada linaje expresa receptores de citoquinas únicos que pueden responder a las producidas por las células (80) (**Figura 7**). En etapas posteriores a la diferenciación de células ayudadoras, ellas expresan el receptor de la familia IL-1 capaz de inducir la producción de citoquinas efectoras de manera independiente al TCR.

Las células Th2 son inducidas por IL-4 a través de la señalización de STAT6 que regula a GATA3, produciendo citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13. Recientemente se ha descrito el perfil Th17 cuyos LT que se caracterizan por la secreción de IL17A e IL-17F, que se generan a partir de Th0 en presencia del factor de crecimiento transformante (TGF β) e IL-6 y señala a través de las proteínas de la familia Smad y STAT3 respectivamente la producción de las citoquinas. El factor

de transcripción de Th17 es ROR γ t, lo cual lo define como un linaje diferente a Th1/Th2, este linaje tiene una gran plasticidad funcional, ya que media protección en mucosas (contra hongos y bacterias), hasta procesos autoinmunes. Por otra parte el linaje Th1 se genera por la presencia de citoquinas inflamatorias, y es regulado por el factor de transcripción t-bet (**Figura 7**) (102, 103).

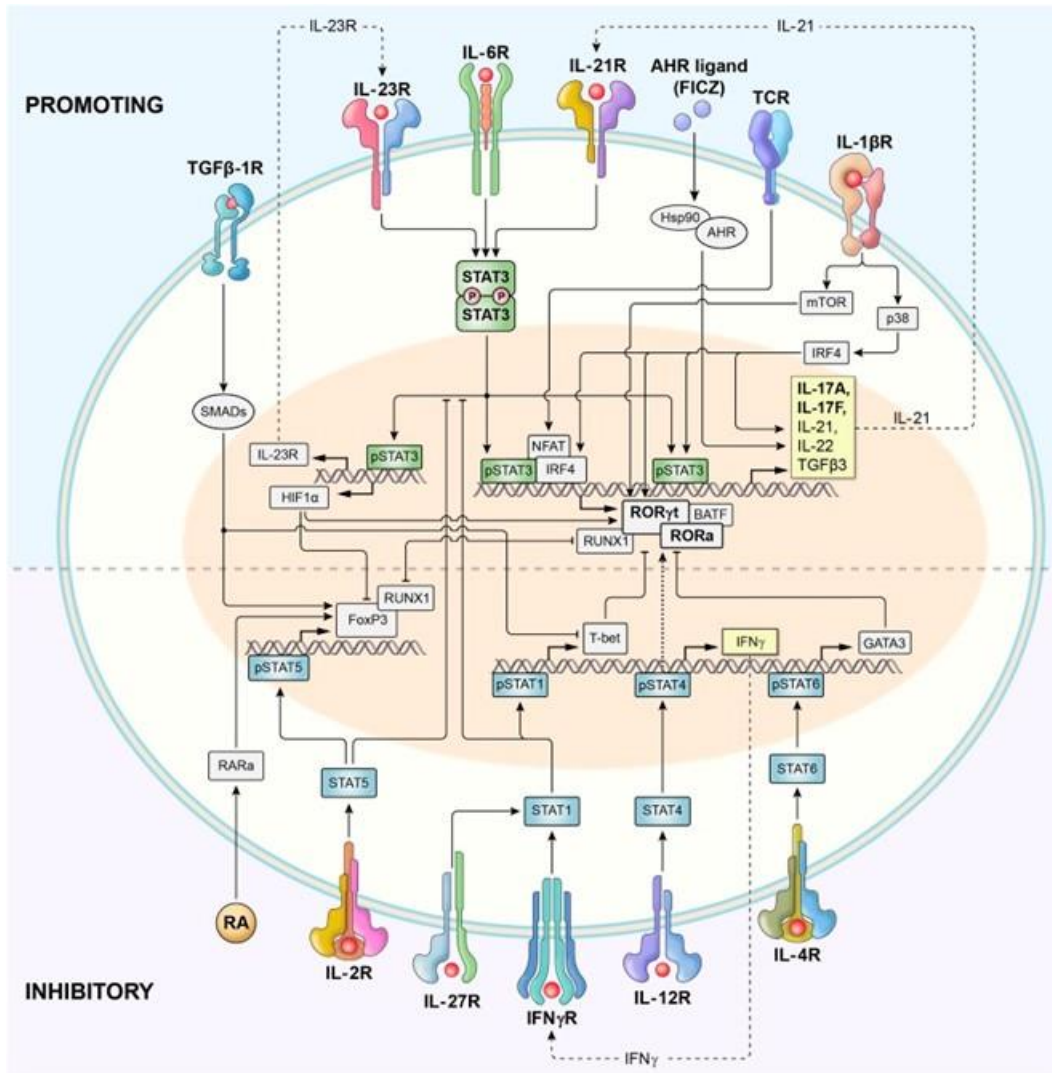


Figura 7. Señalización y regulación transcripcional de la polarización de LT. Señalización y regulación transcripcional de la polarización de LT. Vías de señalización implicados en la diferenciación Th1, Th2 y Th17. El destino celular de cada linaje LTh está determinado por muchos factores de transcripción, incluidos reguladores y proteínas de la familia STAT. Existen colaboraciones y regulaciones positivas entre los factores de transcripción durante la diferenciación de células T. Algunos factores regulan negativamente la expresión o función de factores de otros linajes. Tomado de Muranski, 2013 (103).

1.9 Receptores inhibitorios en la presentación antigénica

Para que exista una correcta presentación antigénica, las CD requieren de señales para activarse y poder cumplir su rol en el reconocimiento y posterior presentación del antígeno a los linfocitos T. Entre estas señales se encuentran la interacción entre el receptor de células T (TCR) y el MHC-II; la presencia de moléculas co-estimuladoras presentes en la membrana de APCs; y la liberación de citoquinas IL-10/IL-12 pues si hay presencia de IL-12 media una alta transcripción de moléculas CD80, CD83, CD86 y CD40; sin embargo, si existe una elevada liberación de IL-10 no permite que exista presentación, pues tiene un rol tolerogénico al elevar la expresión de ICOS y PD-1 que actúan de manera directa en la disminución de CD86 en CDm. Una integración de todas las señales mencionadas conlleva al proceso de diferenciación de células T optativo a un perfil inflamatorio o tolerogénico (73).

Los receptores inhibidores como PD1, CD160, ICOS, 2B4, CTLA-4, LAG3 y BTLA, se asocian frecuentemente con el “agotamiento de las células T” por su papel regulador en la homeostasis de la respuesta inmune en LT (106). Por ejemplo, la expresión de PD-1 (del inglés Programmed Cell Death 1) se da al ser estimulado por PDL1 o PDL2 llevando a cabo procesos de bloqueo de la proliferación de LT, como de apoptosis evitando consigo los procesos de diferenciación de LT efectoras o de memoria, también este fenómeno puede ser apreciado cuando CDi se estimulan con LPS o luego de la señalización de CD40 mejora la expresión de PD-L1 (107). Por otra parte la expresión de CTLA-4 compite con mayor afinidad con las moléculas co-estimuladoras CD80/86 en comparación con CD28 (análogo natural), suspende así la segunda señal entre la APC y el LT terminando con la activación (108). Para el caso de ICOS regula características generales de células T como el crecimiento, proliferación y supervivencia, además dependiendo del entorno inflamatorio, la interacción ICOS/ICOSL impulsa la polarización de las células T; cuando CDi libera bajas concentraciones de IL-10 genera funciones inmunosupresoras que evitan la diferenciación de células efectoras T inflamatorias, por consiguiente, generan un perfil regulador (Treg) (109-112).

Por otra parte, el ligando OX40L se expresa de forma constitutiva en APC, como también se co expresa en respuesta a mediadores inflamatorios como TNF- α , OX40L juega un rol central en la inmunidad y tolerancia, controla la supervivencia y la homeostasis de las células T y apoya a la generación de células T de memoria de larga duración (113).

1.10 Estado actual de las vacunas contra Mtb

La eficacia variante de la vacuna BCG (*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin) contra tuberculosis pulmonar, junto con la aparición de cepas resistentes a antibióticos, ha impulsado a la búsqueda de nuevas vacunas contra tuberculosis (7, 8, 114), además de ello la co-infección por VIH exige con urgencia medidas de control a través del desarrollo de nuevos fármacos y vacunas (115). Actualmente, la única vacuna avalada por la OMS en contra de la TB es la BCG (*Bacille Calmette-Guérin*), desarrollada en 1921, que se basa en el uso de una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* (116) induciendo respuestas de linfocitos T CD4+ (Th1) y linfocitos CD8+ (117). Pero esta vacuna solo confiere protección para las formas graves de TB en niños, pero su acción en los adultos es variable 0–80 % (118) además tiene un tiempo de protección entre 10-15 años (7, 8); por lo cual puede ocurrir que la bacteria persista en el individuo en estado de latencia, y debido a la deficiencia en la estimulación de los linfocitos, evidenciando una respuesta telorogénica (118).

Según la OMS, la lenta disminución de la incidencia de TB a nivel mundial demuestra la necesidad de una vacuna más efectiva que brinde protección contra todas las formas de TB en todos los grupos de edad (4). Hasta agosto de 2019 habían 14 candidatos a vacunas en ensayos clínicos; de los cuales, solo 3 se encuentran en fase III (10) (**Figura 8**).

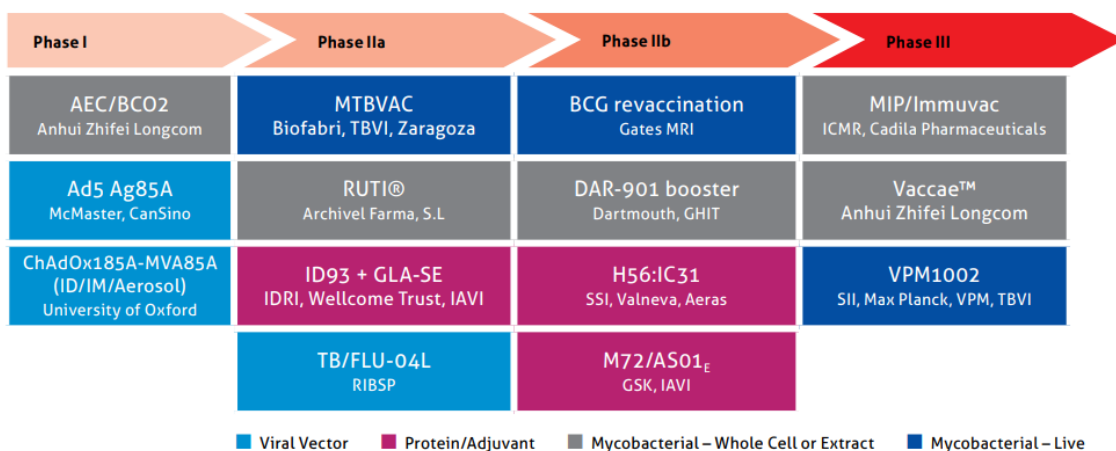


Figura 8. Candidatos a vacuna contra TB. Actualmente se reportan por la WHO, 2019 que hay 14 candidatos a vacuna contra la infección de *Mycobacterium tuberculosis*, pero solo 3 de estas se encuentran en fase III. Tomado de OMS (4).

Entre las alternativas que se presentan está el uso de vectores (Ad5 Ag85A y TB/FLU-04L); vacunas que usan proteínas recombinantes altamente antigénicas (AEC / BC02 y VPM1002); células completas inactivadas por calor (DAR-901); subunidades adyuvantes (H56:IC31, M72 / AS01E y ID93 + GLA-SE); cepas de *Mtb* atenuadas (MTBVAC); vacuna poli-antigénica no viva basada en la bacteria fragmentada (RUTI) y el uso de lisados (Vaccæ[™]) (4, 10).

Recientemente se descubrió, en un ensayo de fase IIb que el candidato M72/AS01E protege contra la enfermedad entre sujetos con TBL, con un 50% de efectividad; por lo cual, es necesario confirmar los resultados se en un ensayo de fase III. Por otra parte, resultados previos de las vacunas en fase III muestran una baja efectividad en términos de protección contra la infección por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (4, 10).

5. METODOLOGIA

A continuación, se presenta la metodología que se empleó en la evaluación de la respuesta inmune inducida por los péptidos provenientes de proteínas de la superficie de *Mycobacterium tuberculosis* definida como el aumento de la proliferación de linfocitos mediante la activación *in vitro* de células dendríticas y el control del crecimiento *in vitro* del patógeno en macrófagos infectados (Figura 9).

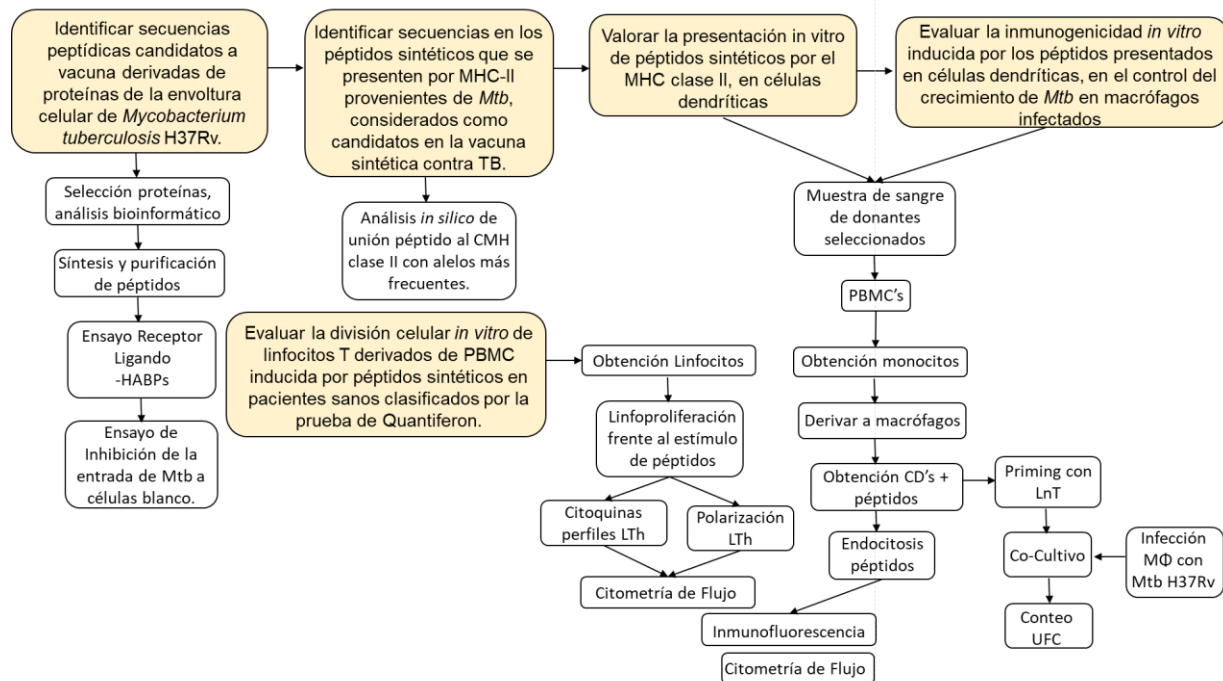


Figura 9. Diseño metodológico. Evaluación de células dendríticas en la presentación antigénica de péptidos sintéticos provenientes de *Mtb* y su acción directa en la proliferación celular y en el control del crecimiento intracelular del patógeno en macrófagos infectados.

5.1 Análisis Bioinformático

Debido a la importancia de estudiar proteínas que estén presentes en la envoltura celular y que participen en la interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con el hospedero, se llevó a cabo una metodología descriptiva por análisis *in silico* que han sido previamente validadas para *Mtb* (119, 120). Las secuencias de las proteínas Rv3623 (LpqG) y Rv3632 fueron obtenidas de la base de datos Mycobrowser (<https://mycobrowser.epfl.ch/>), para lo cual se hicieron diferentes análisis que

permitieron definir características topológicas y así predecir un rol en la interacción del patógeno-hospedero.

En principio se llevó a cabo un análisis de homología de regiones conservadas de las proteínas en diferentes cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante la herramienta BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y un alineamiento múltiple con CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (121). La caracterización de parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y índice GRAVY fue obtenido por la plataforma ProtParam <https://web.expasy.org/protparam/> (122).

En la aproximación del grupo funcional de Tuberculosis de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia FIDIC, se enfoca en proteínas que se encuentren en la envoltura subcelular, para ello fue primordial determinar la localización de las proteínas Rv3623 (LpqG) y Rv3632, que fueron predichas con las plataformas PSORTb v3.0.2 <http://www.psort.org/psortb/> (123) GposmPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/GposmPLOC.cgi>) (124, 125), también se implementó el uso del servidor TBpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/tbpred/>) de diseño exclusivo para micobacterias (126), las cuales ya han sido previamente validadas en este tipo de aproximaciones (119). Una vez determinado el análisis topológico concerniente a la presencia de las proteínas en la superficie de la micobacteria, se llevó a cabo la búsqueda de secuencias señal características para evaluar el tipo de secreción que presenta la proteína dentro de la bacteria, teniendo en cuenta cada una de las vías de transporte clásico descritas (Sec, Tat y lipobox) cuya predicción ha sido validada para su uso en *M. tuberculosis*; para este análisis se emplearon las herramientas computacionales disponibles: Signal P v3.0 y 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (127), TatP 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>) (128) y LipoP versión 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) (129), y para la secreción por vía no-clásica mediante el servidor SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) (130); por otra parte, se analizó la topología transmembranal mediante la presencia de hélices transmembranales por la herramienta informática TMHMM 2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> (131) y Phobius <http://phobius.sbc.su.se/> (132). Para determinar si las proteínas sufrían de cambios post-traduccionales se evaluó la secuencia proteica en los predictores NetOGlyc 3.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> (133) para analizar los sitios posibles de glicosilación y GPS-Lipid <http://lipid.biocuckoo.org/webserver.php> (134) útil para apreciar sitios de

modificación por lípidos. Las secuencias proteicas que codifican para LpqG y Rv3632 se analizaron por el software BepiPred 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) (135) con la intención de identificar los epítopes B presentes en su secuencia, para posteriormente determinar la localización celular de las proteínas con anticuerpos policlonales obtenidos luego de ser inoculados en modelo murino.

Por otra parte, se llevó a cabo la predicción de elementos estructurales de las proteínas con los servidores PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (136) para análisis de la estructura secundaria mientras que la conformación estructural se llevó a cabo por Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) (137) y validado por Swiss model <http://swissmodel.expasy.org/workspace/> (138, 139) y en caso de ser necesario se realizó un análisis de minimización energética en el software AMBER (<http://ambermd.org/>) (140).

Las secuencias de aminoácidos que conforman a las proteínas Rv3623 y Rv3632 se llevaron a análisis en el programa STRING versión 10.5 (<https://string-db.org/>) (141), con la finalidad de constatar si las proteínas interactúan con otras que hacen parte del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

5.2 Presencia y transcripción de genes

Los genes rv3623 y rv3632 que codifican para las proteínas Rv3623 y Rv3632 respectivamente, se analizaron en diferentes cepas de micobacterias con las que se disponen en el grupo de tuberculosis de la FIDIC: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177), *M. bovis* (ATCC 19210), *M. bovis* BCG (ATCC 27291) y *M. smegmatis* (ATCC 19420). El medio de cultivo para *M. bovis* y *M. bovis* BCG fue enriquecido con piruvato sódico y sin glicerol, se incubó a una temperatura de 37°C. Las otras cepas (H37Rv, H37Ra y *M. smegmatis*) crecieron en medio Middlebrook 7H9 durante un período de entre 10-20 días (DifcoLaboratories, Detroit, MI, USA) y se suplemento con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa), pasado este tiempo cuando se llega a la fase exponencial de crecimiento, se cosecharon (OD600 entre 0.5-1.0), al centrifugar a 13000 g por 40 minutos, luego se re-suspendió el pellet en PBS 1X y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Luego las cepas mencionadas se usaron para la extracción de ADN bacteriano genómico (gDNA_{Mtb}) empleando el kit Ultra Clean Microbial DNA isolation (MoBioLaboratories Inc. Carlsbad, CA, USA). La calidad del DNA_{Mtb} extraído fue verificada por PCR, empleando cebadores para el gen constitutivo *hsp65* (forward 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3' y reverse 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') con un tamaño de amplicon de 439 pb. Para corroborar la presencia y transcripción del gen *LpqG* se usaron los cebadores directo 5'-CAACGACATCGAGGTGAA-3' y reverso 5'-GAGATCACCTTGCCCTAGC-3' y para *rv3632* se usaron los cebadores: directo 5'-GATCATCGGGTTGCTGTTCT-3' y reverso 5'-CGCATGTAGGTGCTCAGTGT-3'.

Para evaluar la transcripción de los genes, el RNA fue aislado por el método de TRIZOL (Invitrogen) de las cepas analizadas, luego se trató con DNasa I (Invitrogen). La SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) se utilizó para la síntesis de ADN complementario (ADNc). Para cada muestra se incluyó un control negativo de la síntesis, sustituyendo la enzima reverse transcriptase por agua DEPC. Se empleó 1 µL de ADNc obtenido como molde para la amplificación por PCR al usar ADN polimerasa GoTaq (Promega, Madison, USA), 1,5 mM MgCl₂, 1mM dNTPs, y 1 µL de cada primer. Las condiciones de termociclaje fueron de 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 56 °C durante 30 s para *rv3623* y 58.4 °C durante 45 s para *rv3632*, 72 °C por 30 s y 95 °C por 30 s y una extensión final a 72 °C por 5 minutos para *rv3623* y 10 min para *rv3632*. Las amplificaciones se marcaron con SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se visualizaron en gel de agarosa al 2 %, registrando las imágenes en un fotodocumentador Bio-imaging Systems.

5.3 Expresión de las proteínas Rv3623 y Rv3632 en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Con el fin de verificar la expresión de las proteínas Rv3623 y Rv3632 en la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en condiciones estándar de cultivo, se llevaron a cabo tres inoculaciones en ratones hembra BALb/C con intervalos de 20 días con el péptido 16665 (¹⁰¹VAPQYSNPEPAGTATITGYR¹²⁰) para Rv3623 y el polímero 40057 CG⁹⁶ARIARALALEGAQAPEQTRY¹¹⁴GC (proveniente del péptido 39256, de la proteína Rv3632),

previamente identificados como epítopes B, a una concentración final de 80 µg, y se mezcló en una proporción 1:1 con el adyuvante incompleto de Freud (Sigma St. Louis, EE.UU.). El péptido polimérico se obtuvo por oxidación para integrar en un enlace disulfuro los residuos laterales de cisteína que contiene el péptido, se confirmó su completa polimerización mediante la prueba de Ellman's (5,5-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid]) a pH 8.0. La inoculación con los péptidos permitió determinar la expresión y posible localización de las proteínas Rv3623 y Rv3632 en *Mtb* H37Rv, mediante Western blot; la micobacteria fue sometida a sonicación 15 minutos a 80 % de amplitud dos veces en un buffer de lisis (pepstatina 0,69 µg/mL, leupeptina 0.5 µg/mL, PMSF 0.2 nM, DNasa 1 mg/mL, RNasa 1 mg/mL, lisozima 10 mg/mL en PBS 1X) luego se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se inactivó por 1^{1/2} horas a ebullición. El lisado completo se corrió en un gel de-naturante de acrilamida al 12 % por electroforesis y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (BIO RAD, EE.UU.), luego se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con el suero policlonal diluido 1:20, se lavó cinco veces con TBS-Tween 20 1% pH 7.4 y se incubó luego por 1 hora con anti-mouse IgG secondary antibody-alkaline phosphatase (Vector Laboratories) en dilución 1:10000 para finalmente revelar en el sistema BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro blue tetrazolium) de la casa comercial Promega, Madison, USA.

5.4 Microscopia Inmuno-electrónica (MIE)

El ensayo de microscopía inmuno-electrónica se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión HITACHI HU-12A, previamente se fijó *M. tuberculosis* H37Rv usando una solución de paraformaldehído al 4%/ glutaraldehído 0.5% por dos horas a 4 °C, luego el sedimento se deshidrató en etanol a una escala entre 50-100 % y luego se embebió en una resina LR-white hard-grade resin (Sigma), la polimerización de esta se llevó a cabo utilizando el catalizador specific cold (142). Luego el bloque de resina se llevó a micrótopo para tener secciones de 400 nm aproximadamente, luego se dispusieron los cortes en rejillas de níquel. Las rejillas se bloquearon con SFB al 5% y Tween 20 al 0.1 % por 30 minutos, seguido una inmersión en una solución de anticuerpo primario 1:20 a 4 °C /ON. Las rejillas se lavaron varias veces con una solución BSA al 0,5 % y Tween 20 al 0,1 % y luego se incubaron con anticuerpo IgG de ratón marcado con oro coloidal Sigma (5nm) por 1 hora a temperatura ambiente en una dilución 1:400

(142). Finalmente, las muestras se incubaron en 12 % de acetato de uranilo por 15 minutos en oscuridad antes de analizarlas al microscopio.

5.5 Estructura secundaria de los péptidos de las proteínas LpqG y Rv3623.

Los péptidos sintéticos de la proteína Rv3623 fueron codificados del 16660 hasta el 16671, mientras que la proteína Rv3632 está conformada por seis péptidos codificados de 39251-39256, éstos fueron obtenidos por síntesis múltiple en fase sólida, purificados por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (por sus siglas en ingles *RP-HPLC*) y caracterizados por espectrometría de masas MALDI TOF usando como matriz, ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (α -CCA) (143). Para establecer la estructura secundaria de los péptidos de las proteínas en estudio, cada péptido se disolvió a una concentración de 5×10^{-6} M en 30 % (v/v) de trifluoroetanol, la muestra fue leída por triplicado en un espectro-polarímetro JASCO J-810 arrojando valores de elipticidad (θ) medido en millidegrees (mdeg), para un barrido espectral entre 190-260 nm, luego se realizó la deconvolución de los datos mediante las diversas herramientas SELCON3, CDSSTR y CONTINLL (144), para estimar los elementos estructurales secundarios de cada péptido expresados en α -hélices, hojas plegadas β and random coils.

5.6 Ensayo receptor-ligando.

La capacidad de unión de los péptidos que conforman a las proteínas de interés a las células blanco de infección de *Mtb* (A549 y U937) (145). La marcación de los péptidos fue posible con la adición de un residuo de Tyr en las secuencias que no la contenían, adicionando 5 μ L del radionúclido Na¹²⁵I con una actividad de 100 mCi/mL y posterior separación de los productos de reacción en columna de Sephadex G10. En el ensayo de unión de tipo receptor-ligando se incubaron 1.2×10^6 células/pozo por 2 horas con concentraciones crecientes del péptido radiomarcado (0-950 nM) en presencia o ausencia de 15 μ L de 1 mg/mL del péptido sin radiomarcarse. Luego de la incubación se llevó a cabo la separación de las células por

centrifugación a 7000 rpm por 5 minutos en colchón de dioctyl phthalate/dibutyl phthalate (60:40 densidad 1.015 g/mL) el sobrenadante fue descartado y se midió la radiactividad del pellet mediante contador gamma (Gamma Counter Cobra III. Packard Instrument Co., Meriden, CT, EE.UU.).

Se denomina unión total al péptido radiomarcado unido a las células en ausencia del péptido sin radiomarcado y unión no específica o inhibida el péptido radiomarcado unido en presencia del mismo péptido no-radiomarcado en exceso (1 mg/mL); la diferencia existente entre la unión total y la unión no específica da como resultado la unión específica (142). Se considera que un péptido tiene alta actividad de unión específica (HABP) cuando la pendiente de la línea de unión específica es mayor o igual a 1%. Para la obtención de las constantes fisicoquímicas de la interacción HABP-célula se realizaron ensayos de saturación aumentando el rango de péptido radiomarcado adicionado (0-8.000 nM), siguiendo la metodología previamente descrita para el screening de los péptidos de la proteína. Se determinaron las constantes de disociación (K_D), coeficientes de Hill (nH) y los sitios de unión por célula para los HABPs. Cabe recalcar que cada ensayo se hizo por triplicado.

5.7 Inhibición de la entrada de *Mycobacterium tuberculosis* a células blanco.

Las líneas celulares blanco de infección por tuberculosis (A549 y U937) se incubaron a 2.5×10^5 células/pozo a 37°C y 5% CO₂, hasta la formación de monocapa o con una confluencia mayor al 80%, se removió el medio y se colocó en contacto con los péptidos previamente determinados como HABPs en concentraciones crecientes (2, 20 y 200 μM) por 2 horas, las células epiteliales alveolares (A549) se incubaron a condiciones estándar 37 °C y 5 % CO₂ (146, 147), pero los macrófagos (U937) se colocaron a 4°C con el fin de reducir su actividad fagocítica. Luego las células se sometieron a infección con *Mtb* H37Rv disgregada en una multiplicidad de infección (MOI) 1:75, se dejó toda la noche en contacto las células con la bacteria a las condiciones estándar de cultivo 37 °C y 5% CO₂. Al día siguiente se retiró el medio del pozo, se lavó la monocapa con PBS a pH 7.3 y se removieron las células adheridas con tripsina, una alícuota se plaqueó en medio Middlebrook 7H10 con OADC y se incubó a 37 °C. Pasados 20 días del ensayo se contaron las unidades formadoras de colonias (CFU). Como control de infección se

usaron células son ningún tratamiento y como control de inhibición se usó citocalasina D 30 μ M, cada ensayo se hizo por triplicado con el fin de evaluar la capacidad de inhibición por *Mtb* H37Rv a las células A549 y U937 con la interacción de los HABPs de cada proteína. Para calcular el porcentaje de inhibición, se tomó las CFU del control de infección (sin ningún inhibidor) como el 100 % de infección.

Por otra parte, se evaluó el efecto citotóxico de los péptidos de las proteínas en estudio mediante un ensayo de viabilidad por reducción de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium, en donde se dispusieron 5×10^4 células/pozo por un lapso de 2 horas con cada péptido a 20 y 200 μ M en PBS 1X con las condiciones de incubación previamente mencionadas para el ensayo de invasión; el SDS al 10% fue usado como control de citotoxicidad. Después de pasado el tiempo de contacto con los tratamientos, se colocaron 10 μ L de MTT por 12 horas, los cristales formados de formazan se disolvieron con SDS (dodecil sulfato sódico) para así finalmente realizar una lectura de absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro (MULTISKAN GO, Thermo Scientific), los datos arrojados fueron analizados por el software MultiSkan Go v. 3.2.

5.8 Evaluación de antigenicidad para los péptidos sintéticos

Para evaluar la capacidad antigénica se llevó a cabo un ensayo de Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) empleando 10 sueros de pacientes con tuberculosis latente asintomáticos con prueba de PPD positiva (TBL), 5 con tuberculosis activa basado en el diagnóstico microbiológico convencional (TBA) y 10 controles sanos (HD). Los péptidos fueron inmovilizados por triplicado en una caja de poliestireno de 96 pozos (COSTAR 3595), se llevaron a incubación por 12 h a 4 °C. Luego de tres lavados con PBS-Tween y agua, se bloquearon los sitios inespecíficos con leche descremada al 5% en PBS-Tween por 2h, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0.05% y agua respectivamente. Se dispusieron los plasmas de los pacientes en una dilución 1:100 en los pozos por 2 horas a 37°C. Posterior se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG human (MP Biomedicals) en una dilución de 1:5000 y se llevó a incubación a 37°C por 1 h para luego finalmente ser revelado en el sistema TBM-peroxidasa para ser leído en a 450 nm.

5.9 Análisis bioinformático de unión al MHC-II

La selección de péptidos sintéticos con alta probabilidad de unión al MCH clase II se llevó a cabo mediante la evaluación a través del software NetMHCIIpan 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>) (148), el cual predice la unión de los péptidos a los alelos humanos de HLA DRB más frecuentes en la población mundial obtenido a partir de la base de datos <http://www.allelefrecuencias.net/>.

Las proteínas seleccionadas hacen parte de estudios previos reportados por la FIDIC y corresponden a proteínas caracterizadas como parte de la membrana micobacteriana de *Mtb* H37Rv, estas proteínas son mencionadas en la **Tabla 1**. Se tuvieron en cuenta secuencias de 20 aminoácidos que hacen parte de cada proteína que presentan alta capacidad de unión específica a células blanco de infección y que finalmente estos péptidos denominados HABPs son capaces de inhibir la entrada de la micobacteria a células epiteliales alveolares A549 (ATCC CLL-185) y monocitos U937 (ATCC CRL-2367) en ensayos *in vitro*. De estos péptidos se usaron sus secuencias, basados en la base de datos Mycobrowser <https://mycobrowser.epfl.ch/> (**Tabla 1**). Por otra parte, de las 38 secuencias nativas se obtuvieron 30 secuencias con modificaciones puntuales en su secuencia de aminoácidos, con la finalidad de hacerlos más afines al acople del MHC-II (**Tabla 1**, se resaltan en colores las modificaciones en los bolsillos 1, 4, 6 y 9). Luego, al analizar las secuencias en la base de datos del software NetMHCIIpan 4.0 se mantuvieron los valores límites de unión fuerte (rango <0.5-2 %) y unión débil (rango 2.1-10 %) proporcionados por el mismo predictor, manteniendo constante la longitud del péptido de 20 aminoácidos (148).

Tabla 1. Péptidos nativos y modificados de las proteínas seleccionadas como candidatos vacunales contra *Mycobacterium tuberculosis*.

PROTEÍNA	PÉPTIDO		SECUENCIA	
Rv0180c	31024 _{mn}	41	AALYLGILNPMTNLRHFPI	60
	42454 _{pn}		CGAALYLGILNPMTNLRHFPIGC	
	40415 _{mm}		AALYLDPKLNPKTNLRHFPI	
	40416 _{pm}		CGAALYLDPKLNPKTNLRHFPIGC	
	31025 _{mn}	61	GPAGQQIVDGLVSGLDKNKF	80
	40417 _{mm}		GPAGQQIVDGLQSLGPMNLF	
	40418 _{pm}		CGGPAGQQIVDGLQSLGPMNIFGC	
	31028 _{mn}	121	RDFGASAVTPTRTRDRPAITFY	40

PROTEÍNA	PÉPTIDO	SECUENCIA	
	40423 _{mn}		SSQLRPF ^L GS ^A QR ^R PTRTDRP
	40424 _{pm}		CGSSQLRPF ^L GS ^A QR ^R PTRTDRPGC
	31032 _{mn}	201	KSTAYNPLP ^N NGTGNGLSAFY
	40419 _{mn}		KPSAF ^N PLD ^N GTANGLSAFY
	40420 _{pm}		CGKPSAF ^N PLD ^N GTANGLSAFYGC
	31039 _{mn}	341	LGLPSAGATVPLEAVPAFFRY
	40421 _{mn}		LGLPSAGATVPL ^E AL ^P SFFRY
	40422 _{pm}		CGLGLPSAGATVPL ^E AL ^P SFFRYGC
	31044 _{mn}	433	EHQAQYQARQSARESSSEQP
	42456 _{pn}		CGEHQAQYQARQSARESSSEQPGC
	40425 _{mn}		EHQAQL ^R AF ^Q SAR ^F SSSEQP
	40426 _{pm}		CGEHQAQL ^R AF ^Q SAR ^F SSSEQPGC
Rv0227c	16945 _{mn}	281	LKPEVTFADYQVTSTEETVE
	40391 _{mn}		QTFAD ^F QV ^S SSLE ^L LQESQVNA
	40392 _{pm}		CGQTFAD ^F QV ^S SSLE ^L LQESQVNAGC
	16951 _{mn}	402	PRLGSAQPPPPDAGHPDPG
	40393 _{mn}		PL ^F SG ^S QP ^P PS ^S QDAGHPDPG
	40394 _{pm}		CGPL ^F SG ^S QP ^P PS ^S QDAGHPDPGGC
	40395 _{mn}		PL ^F SG ^S QP ^P DS ^S QDAGHPDPG
40396 _{pm}		CGPL ^F SG ^S QP ^P DS ^S QDAGHPDPGGC	
Rv0679c	30987 _{mn}	146	YKNGDPTIDNLGAGNRINKE
	40449 _{mn}		LGAGPY ^K PLD ^N LK ^S NLGAGN
	40450 _{pm}		CGLGAGPY ^K PLD ^N LK ^S NLGAGNGC
Rv1268c	37964 _{mn}	21	AVALGLASPADAAAGTMYGD
	40397 _{mn}		AQAL ^S L ^S SPAD ^S AAGTMYGD
	40398 _{pm}		CGAQUAL ^S L ^S SPAD ^S AAGTMYGDGC
Rv1411c	37096 _{mn}	181	PDFNATQVPVATVWIQE
	40399 _{mn}		PDF ^N AL ^Q PV ^P STQWIQE
	40400 _{pm}		CGPDF ^N AL ^Q PV ^P STQWIQEGC
Rv1490	11073 _{mn}	281	GRVESHADYHDWVCEHVTP
	40401 _{mn}		FGRVESHAD ^F HP ^F QS ^Q HR ^R SP
	40402 _{pm}		CGFGRVESHAD ^F HP ^F QS ^Q HR ^R SPCG
Rv1911c	37763 _{mn}	1	MESPMTSTLHRTPLATAGLAY
	40433 _{mn}		LHRTPL ^T TD ^L GL ^K AY ^L QVAL
	40434 _{pm}		CGLHRTPL ^T TD ^L GL ^K AY ^L QVALGC
	37765 _{mn}	41	YVPKATTVDATTPAPAAEPL
	40435 _{mn}		PKATS ^F DAST ^P PAPAAEPL
	40436 _{pm}		CGPKATS ^F DAST ^P PAPAAEPLGC
	37767 _{mn}	81	GANVAPPLTWSSPAGAAELAY
	40437 _{mn}		GANVAPPL ^T WSS ^P PASAAQLAY
40438 _{pm}		CGGANVAPPL ^T WSS ^P PASAAQLAYGC	
Rv1980c	36827 _{mn}	41	TQIQMSDPAYNINISLPSYY
	42458 _{pn}		CGTQIQMSDPAYNINISLPSYYGC
	40443 _{mn}		SDPAY ^N L ^N L ^S LPS ^Y YPDQKS
	40444 _{pm}		CGSDPAY ^N L ^N L ^S LPS ^Y YPDQKSGC
	31107 _{mn}	161	IVQGELSKQTGQQVSIAPNAY

PROTEÍNA	PÉPTIDO	SECUENCIA		
	42460 _{pn}		CGIVQGELSKQTGQQVSIAPNAYGC	
	40445 _{mm}		VQGE L S M N T S V Q V S I A P N A Y	
	40446 _{pm}		CGVQGE L S M N T S V Q V S I A P N A Y G C	
Rv2004c	9111 _{mn}	261	AGYAVRSGDTAPASLRDFYI	280
	40439 _{mm}		AG F Q A F S S P T S P A S L R D F Y I	
	40440 _{pm}		CGAG F Q A F S S P T S P A S L R D F Y I G C	
Rv2270	37775 _{mn}	21	TSSNGARGGIASTNMNPTNPY	40
	40427 _{mm}		ARGG L S A D P K P N R G P P A T A E	
	40428 _{pm}		CGARGG L S A D P K P N R G P P A T A E G C	
	37777 _{mn}	61	ETWINLQVGD L A D L P P A D L Y	80
	40429 _{mm}		WIPQ L Q G D T R A P R P P A D L S R	
	40430 _{pm}		CGWIPQ L Q G D T R A P R P P A D L S R G C	
	37780 _{mn}	121	GFAPYTGQSVDTSPYSVAYL	140
	40431 _{mm}		GFAP F T A S S P V T V P Y S V A Y L	
	40432 _{pm}		CGGFAP F T A S S P V T V P Y S V A Y L G C	
Rv2301c	30960 _{mn}	112	CPNTRLVPGGYS L G A A V T D V	131
	40441 _{mm}		S M A N S T P N T R L Q P F G S S L S S A	
	40442 _{pm}		CG S M A N S T P N T R L Q P F G S S L S S A G C	
Rv2560	11024 _{mn}	121	VVALSDRATTAYTNTSGVSS	140
	40403 _{mm}		ALSDRATTAF T P T S G V S S K	
	40404 _{pm}		CGALSDRATTAF T P T S G V S S K G C	
Rv2707	16084 _{mn}	301	RIGVGT T T Y S S T A Q H S A V A A	320
	40405 _{mm}		RIGVGT P D F S A S D S L S V A A A	
	40406 _{pm}		CGRIGVGT P D F S A S D S L S V A A A G C	
Rv3166c	16295 _{mn}	181	LITRRQRKSAPARISGDRIY	200
	42450 _{pn}		CGLITRRQRKSAPARISGDRIYGC	
	40407 _{mm}		SE L T A L R R L K S P A S L R S G D R	
	40408 _{pm}		CGSE L T A L R R L K S P A S L R S G D R G C	
	16298 _{mn}	241	MERELSHVPGVAPQDFDTPY	260
	40409 _{mm}		MERE L S L V P G A Q P Q D F D T P Y	
	40410 _{pm}		CGMERE L S L V P G A Q P Q D F D T P Y G C	
	16300 _{mn}	281	VSLFAEARFSPHVMNEEHREY	300
	42452 _{pn}		CGVSLFAEARFSPHVMNEEHREYGC	
	40411 _{mm}		LQSLRAMK R L P S H Q M N E E H R	
	40412 _{pm}		CGLQSLRAMK R L P S H Q M N E E H R G C	
Rv3494c	38373 _{mn}	81	HMRLNSGTAIPSNVTATVRSY	100
	40447 _{mm}		AH M R L N S G P S L Q A D Q K G T R Q	
	40448 _{pm}		CGAH M R L N S G P S L Q A D Q K G T R Q G C	
Rv3587c	39265 _{mn}	155	VLAAYVYSLDNKRLWSNLDT	173
	39266 _{mn}	174	APSNETLVKTFSPGEQVTTY	192
Rv3623	16661 _{mn}	21	SGCD SH N S G S L G A D P R Q V T V Y	40
	16663 _{mn}	61	VTAADVTSAMNQTNDRQQAVY	80
	16664 _{mn}	81	IDALVGAGLDRKDIRTTRVY	100
Rv3629	16645 _{mn}	81	VFPLAIWTTAGLDPVRAME	100
	16646 _{mn}	101	LALRPPAHGALEFADGSPSY	120
	40413 _{mm}		WTTAGLDPVRAME L A L R P P A H G	
	40414 _{pm}		CGWTTAGLDPVRAME L A L R P P A H G G C	

PROTEÍNA	PÉPTIDO	SECUENCIA		
Rv3632	39254 _{mn}	61	GVERRGTDLMLYALVMAFSFT	80
	39255 _{mn}	81	TLSTYMRFKDLELRYARIAR	100
	39256 _{mn}	96	ARIARALALEGAQAPEQTRY	114

Los códigos de los péptidos corresponden a la numeración sistematizada de la FIDIC; los números antes y después de la secuencia del péptido corresponden a la posición del péptido dentro de la proteína de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; las abreviaturas corresponden a: monómero nativo (mn), monómero modificado (mm), polímero nativo (pn) y polímero modificado (pm). Dentro de la secuencia del péptido se resaltan las modificaciones realizadas en los bolsillos 1 (fucsia), 4 (azul), 6 (amarillo) y 9 (verde) (16-18, 22, 23); como también los péptidos resaltados en negrilla son aquellos que no se pudieron sintetizar aplicando la estrategia t-Boc.

5.10 Síntesis de péptidos

En el grupo funcional de Síntesis Química de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC llevó a cabo la síntesis de los péptidos, que presentan unión a los alelos HLA humano como consecuencia del resultado bioinformático, tanto los péptidos nativos (originales) de las proteínas de *Mtb*, como los modificados teniendo en cuenta ajustes estratégicos para mayor acople al MHC-II. La síntesis se llevó a cabo en fase sólida por las técnicas de t-Boc (tert-butiloxicarbonil). A manera de resumen la síntesis se llevó a cabo: en la resina, una vez activada, se adicionó uno a uno los aminoácidos que corresponden a la secuencia lineal del péptido, esto se hizo desde el extremo carboxi al amino terminal, para la unión del siguiente aminoácido se hace la remoción del grupo protector del amino mediante un tratamiento con ácido trifluoroacético al 40%, paso sucesivo con la unión de cada aminoácido. Una vez finalizado el acople del péptido con una longitud de 20 aminoácidos, se procedió a la remoción de la secuencia, mediante acetilación por tratamiento con ácido acético concentrado y luego se removió el péptido de la resina con ácido fluorhídrico.

Una vez concluida la síntesis, los péptidos fueron purificados mediante cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC) (Merck Hitachi, detector UV-L-450 L-450). Y finalmente, la pureza de los péptidos se garantizó con base en los análisis cromatográficos, donde se presentó una especie mayoritaria correspondiente al producto de interés y por los espectros de masas MALDITOF que indican el peso molecular esperado para cada uno de los péptidos.

5.11 Aislamiento de PBMCs

El grupo funcional de Inmunología de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC llevó a cabo una extracción de ADN genómico a 23 individuos (15 mujeres y 8 hombres) para incluir en este proyecto, con la finalidad de tipificar el HLA (DR β 1) trabajo que fue realizado por la empresa Hystogenetics y el grupo funcional de Inmunología de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia. Después de esta caracterización a los 23 individuos se realizó la predicción bioinformática de los péptidos que presentan mayor probabilidad de unión al HLA de cada donante. Luego a los individuos que resultaron viables para que presenten correctamente los péptidos se les tomó una primera muestra de sangre total (~ 60 mL) en tubo heparinizado con la finalidad de obtener monocitos y linfocitos, esta muestra se centrifugó a 1800 rpm por 10 minutos con el objetivo de obtener plasma que se usó para mantener el cultivo celular. El botón de glóbulos blancos, se llevó a un proceso de separación para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediante gradiente de Ficoll-Paque a 2800 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente, la capa leucotiraria se sometió a un proceso de limpieza mediante dos centrifugaciones continuas a 150 g por 10 minutos, para disminuir la presencia de plaquetas y el pellet se criopreservó en medio de congelación (50% RPMI 1640 + 40% de SFB + dimetil sulfóxido DMSO al 10%) a una concentración máxima de 10^7 células/mL por cada crio-vial las cuales se llevaron a nitrógeno líquido hasta su uso. La viabilidad celular se evaluó directamente con azul de tripan 5% o por citometría de flujo utilizando 7ADD (7-aminoactinomicin D). Pasados 9 días de la primera toma, se realizó una segunda toma de muestra donde se obtuvo 40 mL de sangre en tubo heparinizado del paciente con la finalidad de infectar macrófagos con *Mtb* H37Rv para el ensayo de co-cultivo.

5.12 Diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos

El proceso de derivación y maduración de CD's a partir de células de sangre periférica (monocitos purificados) se realizó como se describe a continuación. Para diferenciar las subpoblaciones celulares empleadas en este estudio, se evaluó la supresión o sobreexpresión de proteínas membranales CD14, CD80, CD86, CD83, CD11c, CD1c y HLA-II (Biolegend).

5.12.1 Obtención de macrófagos derivados a partir de monocitos

Los monocitos empleados de cada donante seleccionado fueron purificados usando la adhesión por 3 h en cajas Petri de poliestireno (100 x 20 mm Tissue Culture Dish CytoOne), los cuales después de la adhesión optaron a un fenotipo macrófago para luego ser fenotipificadas por la expresión de CD14, CD80, CD86, CD11c, CD1c y HLA-II. Después del tiempo de adhesión, se desprendieron los macrófagos mediante scraper (Fisherbrand 08-100-242) y se dispusieron en cajas de 96 pozos (FALCON F.A.S.T. 3933) con una confluencia de 3×10^4 células por pozo, estas células se mantuvieron por un período de 5 días en RPMI (suplementado con 10% de plasma autólogo y Antibiótico/Anti-micótico) en condiciones normales de cultivo (37 °C y 5% de CO₂).

5.12.2 Diferenciación de macrófagos a células dendríticas inmaduras

Los macrófagos que estaban en caja de 24 pozos fondo plano (Linbro 76-063-05) a una confluencia de 3×10^4 células/pozo se estimularon en 3 intervalos con 1.25 ng/mL de Interleuquina IL-4 (BioLegend®) y factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) a 2.5 ng/mL (BioLegend®), y se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo a 37 °C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por 24 horas a 7 días, realizando un cambio de medio cada 72 horas, para así finalmente obtener CDi.

5.12.3 Maduración de células dendríticas

La maduración de las CDi se indujo utilizando LPS (10 ng/mL Invitrogen) como activador del TLR4 para iniciar la diferenciación del fenotipo inmaduro al maduro de la célula dendrítica, por 48 horas en condiciones normales de cultivo (37°C y 5% CO₂). Luego de inducir la maduración se evaluó el fenotipo de CDm para determinar el grado de expresión de moléculas asociadas a su maduración como sobre-expresión de CD80, CD83, CD86, CD1c, CD11c y HLA-DR (BioLegend®) mediante el uso del software FlowJo.

5.13 Inmunofluorescencia

La actividad fagocítica de antígenos por parte de las CD's se evaluó mediante la incorporación del péptido 16661 marcado con rodamina B, para ello en una caja de 24 pozos (Linbro 76-063-05) se dispusieron con portaobjetos de 12 mm de diámetro (previamente desengrasadas) 2×10^5 CD en contacto con el péptido 16661 (2 mg/mL) marcada con el fluoróforo, por 12 h. Después se removió el sobrenadante y se lavó el pozo con 250 μ L de PBS 1X para luego adicionar citocalasina D 20 mM por 1 hora a 37 °C a temperatura ambiente. Luego se permeabilizaron las células con Tritón x-100 0.5 % por 20 minutos, se retiró la solución y se puso en contacto las células con Faloidina 165 nM (Invitrogen F432) por 20 min, luego se lavó con PBS 1X, y se colocó en contacto por 10 minutos con DAPI 0,33 mg/mL (Invitrogen D1306); para finalmente observar las láminas en un microscopio de fluorescencia.

5.14 Mantenimiento del cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv

Para el cultivo de *Mtb* H37Rv (ATCC 27294), se tomaron 5×10^6 bacterias crioconservadas en glicerol o en PBS 1X previamente descongeladas y diluidas en 100 μ L de medio Middlebrook 7H9 suplementado con glicerol, tween 20, y OADC (ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa). Luego se llevó a un volumen de 250 mL del medio 7H9. Posteriormente, se incubo a 37°C en agitación constante por un período de 30 días hasta alcanzar la fase logarítmica del cultivo. Se realizarán los controles de tinción de Gram y Ziehl Neelsen a los 7, 15 y 30 días posteriores al inicio del cultivo.

Para la cosecha de *Mtb*, se transfirieron 35mL de medio de cultivo a un falcón de 50 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 40 minutos, se descartó el sobrenadante en fenol al 5% manteniendo el pellet en el tubo y se repitió sucesivamente el proceso de centrifugación utilizando PBS 1X estéril, las veces que sean necesarias para acumular la mayor cantidad de biomasa. Finalmente, el pellet se re-suspendió en PBS 1X y se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL para ser crioconservadas a -20 °C.

5.15 Infección de macrófagos con *M. tuberculosis* H37Rv

El recuento de la cantidad de bacteria se realizó a partir de la transmitancia obtenida de una alícuota de 2 mL de muestra previamente cosechada y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, luego se aplicará la ecuación de la recta resultante teniendo en cuenta la curva McFarland realizada para la cepa H37Rv de *Mtb* con la finalidad de definir la cantidad de bacilos existentes y así ser empleados en la infección al MOI requerido.

Para obtener los macrófagos a infectar se tomó una muestra de sangre de 40 mL, los cuales se llevaron a caja de 96 pozos, con una confluencia de 3×10^4 células PBMCs/pozo, se dejaron adherir por $2^{1/2}$ horas y luego se lavaron dos veces con PBS y se infectaron con *Mtb* a 2×10^5 bacilos por pozo (MOI 10), posterior la monocapa se lavó con PBS 1X para eliminar los bacilos extracelulares (día 0), estas células infectadas se emplearon en el ensayo de *co-cultivo* junto con CD y LT.

5.16 Evaluación funcional de DC's y estimulación *in vitro* de LT

Establecidos las condiciones para la obtención de DC's maduras se evaluó la capacidad funcional de estas para activar e inducir la expansión clonal de LT totales obtenidos de la fracción no adherente de la diferenciación por adhesión en placas de Petri de los macrófagos; para ello se emplearon diferentes ensayos *in vitro* los cuales se describen a continuación:

5.17 Linfoproliferación

Los linfocitos de las personas genotipificadas, con una viabilidad > 90 % en cámara de Neubauer se depositaron en un eppendorf de 1,5 mL, en la parte superior del tubo se colocaron 100 μ L de PBS estéril y se agregaron CFSE a 1μ M (por 1×10^4 células se coloca 0,4 μ L de CFSE), se dió agitación en vórtex a velocidad baja, luego se incubaron las células por 10 minutos en completa oscuridad, después se colocaron 500 μ L de RPMI al 20 % SFB por 10 min, para así llevar a centrifugación por 2500 rpm en 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se re-suspendió en RPMI al 10 %, para dejar 15×10^2 células por pozo en 100 μ L en caja de 96 pozos de fondo

redondo (Linbro 76-013-05) en las cuales previamente se ha colocado el estímulo en el pozo que corresponde a 10 µg/mL del péptido o 10 µg/mL de PHA (Phytohaemagglutinin, Sigma Aldrich) como mitógeno inductor de la proliferación; el tiempo de contacto de las células con el estímulo fue de 5 días. De manera simultánea los linfocitos marcados se colocaron en contacto con células dendríticas autólogas cargadas (pMHC) en una relación 10:1, con la finalidad de apreciar si hay un aumento en la diferenciación linfocitaria CD4, CD8, CD19, CD45RA, CD45RO, CD62L.

Luego pasado el tiempo de contacto celular con el estímulo, las cajas de 96 pozos se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos y se colectaron los sobrenadantes para el ensayo de cuantificación de citoquinas; el remanente se dispuso en tubos de citometría, donde se adiciono 300 µL de PBS y leyeron las generaciones que proliferaron por citometría de flujo y su análisis fue interpretado por el software FCS Express.

5.17.1 Análisis de citoquinas en el *co-cultivo*

El sobrenadante obtenido en la linfoproliferación se colectó para ser empleado en la cuantificación de citoquinas principales para los perfiles de linfocitos T (Th1, Th2 y Th17) mediante el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17, el cual permitió determinar las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN γ e IL-17A, que podrían generarse por el estímulo de diferenciación de la respuesta inmune adaptativa por parte de las DCs primadas con los péptidos, provenientes de las proteínas de *Mtb*. El kit contiene una perla que tiene anclados en su superficie anticuerpos monoclonales dirigidos contra cada una de las citoquinas mencionadas de cada perfil, luego se dispuso la muestra a analizar y se puso en contacto con el mAc específico de cada citoquina, el cual se encuentra marcado con ficoeritrina PE, lo cual permitió generar una señal fluorescente proporcional a la cantidad (pg/mL) de la citoquina presente.

Para evaluar la transcripción de los genes que codifican para las citoquinas IL-10 e IL-12, el RNA fue aislado por el método de TRIZOL (Invitrogen) de 6x10⁴ células dendríticas de cada donante, luego se trató con DNasa I (Invitrogen). La SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) se utilizó para la síntesis de ADN complementario (ADNc). Se empleó 1 µL de ADNc obtenido como molde para la amplificación por PCR al usar ADN polimerasa GoTaq (Promega, Madison, USA),

1,5 mM MgCl₂, 1mM dNTPs, y 1 µL de cada primer. Las condiciones de termociclaje fueron de 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos a 57 °C durante 30 s para IL-12p35 y 60°C durante 30 s para IL-10, y 72 °C durante 30 s, 72 °C por 3 min y una extensión final a 10 °C por 5 minutos. Las amplificaciones se marcaron con SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se visualizaron en gel de agarosa al 2,5 %, registrando las imágenes en un fotodocumentador Bio-imaging Systems.

La calidad del DNA_c obtenido fue verificado por PCR, empleando cebadores para el gen constitutivo *gapdh* (forward 5'-CTGAGAACGGGAAGCTTGTC-3' y reverse 5'-GGCAGAGATGATGACCCTTT-3') con un tamaño de amplicon de 496 pb. Para corroborar la transcripción del gen *IL-10* se usaron los cebadores directo 5'-AGCTGTTTCCATAGGGTGA-3' y reverso 5'-GATAAATTAGAGGGAGGTCA-3' y para *IL-12p35* se usaron los cebadores: directo 5'- AAAGCTTCTGATGGATCCTA-3' y reverso 5'- AGCTCATCACTCTATCAATA-3', cada uno con un tamaño del amplicon de 110 y 115 pb respectivamente. Los primers se diseñaron a partir de las secuencias de referencia de la plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y luego se realizó un alineamiento múltiple por MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), para identificar regiones conservadas entre los transcritos de las diferentes variantes y luego se diseñó el primers sobre esta región en el programa Gen Runner.

5.17.2 Medición de la producción de anticuerpos en el *co-cultivo*

En los sobrenadantes obtenidos en el *co-cultivo* de las CD/LT, se identificó la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra los péptidos empleados, para ello se dispuso por cada pozo en una caja de 96 pozos fondo plano (FALCON 3933) 100 µL del péptido a una concentración de 10 µg/mL y por triplicado, luego se lavaron y bloquearon los sitios de unión no específica con PBS-Tween 0,5%; 100 µL de los sobrenadantes a un Fd:2 y se dejaron incubando por 3 h a 37°C, luego se lavó el contenido con PBS-tween y se colocó el anticuerpo secundario anti-IgG humano conjugado con peroxidasa (1:10000) por 1 h, se reveló empleando un sistema TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina Sustrato de la Peroxidasa), finalmente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

5.18 Evaluación del control de crecimiento intracelular de *Mtb* H37Rv

Macrófagos infectados (MOI 1), se colocaron en contacto con la mezcla en proporción 1:10 de DC y LT (previamente primados con él antígeno por 72 h), la placa se incubó por 3 días. El número de *Mtb* que ingresaron dentro de los macrófagos se calculó mediante la medición por citometría de flujo

6.RESULTADOS

6.1 Análisis Bioinformático

El análisis por homología múltiple de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Rv3623 y Rv3632 mostró para el gen *lpqG* que codifica para la proteína Rv3623 es ortólogo respecto a las cepas: *M. bovis* (Mb3647), *M. leprae* (ML0215), *M. marinum* (MMAR 5130) y *M. smegmatis* (MSMEG 6109). La proteína resulta ser conservada dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* con una identidad de 100 % para H37Rv, H37Ra, *M. caneti*, aislados clínicos *Mtb* T46, *Mtb* CDC551, *Mtb* T17, *Mtb* C; para *M. colombiense* del 98%, *M. szulgai* de 97 %, *M. kansasii* una homología del 92%, para *M. africanum* y *M. bovis* del 71 % (**Figura 10**).

Por otra parte, la proteína Rv3632 tiene un 100% de identidad con cepas del complejo tuberculoso (MTC) con *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. orygis*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* y *M. mungi* (**Figura 10**). También mostró identidad con aislados clínicos pertenecientes a tres linajes, linaje 1 de *Mtb* Phillipines and rim of indean ocean (T67, T17 y T92); linaje 2 *Mtb* East Asia (T85 y Beijing NITR203) y linaje 4 *Mtb* Europe, América and África (H37Rv, Haarlem, Erdman ATCC 35801 y KZN-605) (149) (**Anexo 1**).

Se establecieron propiedades fisicoquímicas mediante el corrimiento de las secuencias que codifican para las proteínas Rv3623 y Rv3632 en la plataforma ProtParam (**Figura 10**), que arrojó para Rv3623 un peso de 24836.80 Da, un GRAVY de -0.055, indicando que tiene un grado bajo de asociación a la membrana, característico de proteínas hidrofílicas. Para Rv3632 se calculó un peso molecular 13.068 kDa, punto isoeléctrico 10.40 y el promedio general de hidropatía de la proteína. De acuerdo con el índice de hidrofobicidad GRAVY (0.459) para esta proteína indica que también tiene un grado bajo de asociación a la membrana característico de proteínas hidrofóbicas (150, 151) (**Figura 10**).

	Rv3623 (LpqG)	Rv3632
Características	BLASTp 100 % identidad con: Cepas del MTC H37Rv, H37Ra, <i>M. caneti</i> , aislados clínicos <i>Mtb</i> T46, <i>Mtb</i> CDC551, <i>Mtb</i> T17, <i>Mtb</i> C; para <i>M. colombiense</i> del 98%, <i>M. szulgai</i> de 97 %, <i>M. kansasii</i> una homología del 92%, para <i>M. africanum</i> y <i>M. bovis</i> del 71 %. ProtParam Índice GRAVY: -0.055 pl teórico: 5.52 Peso molecular: 24.836 Kda	BLASTp 100 % identidad con: Linaje 1: <i>Mtb</i> (T87, T17 y T92) Linaje 2: <i>Mtb</i> (T85 y Beijing NITR 203) Linaje 4: <i>Mtb</i> (H37Rv, Haarlem, Erdman ATCC 35801 y KZN-605) Y con otras cepas de MTC (<i>M. bovis</i> , <i>M. bovis</i> BCG, <i>M. africanum</i> , <i>M. orygis</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. canetti</i> , <i>M. caprae</i> y <i>M. mungi</i>) ProtParam Índice GRAVY: 0.459 pl teórico: 10.40 Peso molecular: 13.068 Kda
Localización Sub-celular	Gpos-mPloc Membrana Plasmática TBpred Amino acids compositions-Anclada a la membrana por un lípido Score: 0.6567 Dipeptide Compositions-integral en membrana Score: -0.2604	Gpos-mPloc Membrana celular TBpred Amino acids compositions-integral en membrana Score: 2.8415 Dipeptide Compositions-integral en membrana Score: 1.90040 PSSM- Anclado a membrana por un lípido Score: 0.2829 PSORTb Membrana Citoplasmática Score: 10.0
Regiones Trans-membrane		TMHMM Transmembrane hélices: 3 Aminoacids outside: 21 Aminoacids inside: 35 Phobius Transmembrane hélices: 3 Aminoacids outside: 23 Aminoacids inside: 30
Vía de secreción	LipoP Score:25.17 Secreción de la proteína por vía clásica, por presencia de péptido señal	SecretomeP SecP:0.953927 Secreción de la proteína por una vía no clásica.
Modificación post-transcripcional	NetOglyc Position: Thr: 96,97,100 y 207. Ser: 218.	GPS- Lipid Position: 113 (Cys) S- Palmitoylation- Score: 2.966; Cutoff: 1.079 S- Farnesylation- Score:10.763; Cutoff: 3.71
Otros	BepiPRED 1.0 Position 101-120 Core: VAPQYSNPÉPAGTATTGYR STRING Co- expression and gene neighborhood whit: lppK y lppC.	BepiPRED 1.0 Position 106-114 Core: GAQAPEQQR STRING Co- expression and gene neighborhood whit: Rv3629c, Rv3630, Rv3631 and Rv3633

Figura 10. Características de las proteínas Rv3623 y Rv3632 de *Mycobacterium tuberculosis* evaluadas *in silico*. Relación predictiva de la localización, topología membranar y demás características propias de cada proteína.

Sin embargo, respecto a la localización subcelular el corrimiento para Rv3623 en el servidor Gpos-mPloc, indicó que la proteína debería ser considerada con ubicación extracelular (152). El mismo resultado fue presentado por TBpred, el cual definió a Rv3623 como una proteína integral de membrana o anclada a la misma por un lípido, mediante los análisis por composición de dipeptide compositions (score: -0.2604) y por amino acid (score: 0.6567) respectivamente (126). Se identificó a la proteína Rv3632 como parte de membrana citoplasmática en la micobacteria definida por PSORTb, pero para el servidor TBpred enmarca a la proteína Rv3632 como una proteína integral de membrana, mediante los análisis por composición de dipeptide and amino acid (score: 2.84) y por dipeptide compositions (score: 1.90); aunque también parece estar vinculada a la membrana mediante el anclaje por lípido, predicho por posiciones específicas de matriz (PSSM) con un score de 0.28 (**Figura 10**).

Por el software SignalP 4.0 se estableció que la proteína Rv3623, es exportada por la vía clásica de secreción presentando un péptido señal que de acuerdo con el valor de C-score (0.2), indica

que hay un sitio de clivaje ubicado en la posición Ser²⁵-His²⁶; sin embargo, por el predictor LipoP versión 1.0 establece que el péptido señal se encuentra ubicado en la posición Gly²² y Cys²³ (AALSG/CDSHN) con un score significativamente alto de 25.17. Mientras que para la proteína Rv3632 no presentaba péptido señal de escisión proteolítica para ser transportada a la membrana por la vía clásica, luego se realizó un análisis de la proteína por el servidor SecretomeP v2.0 donde se encontró que la proteína es secretada por la vía no clásica con un valor superior al umbral de 0.5 (**Figura 10**).

Por otra parte, respecto a la topología también se empleó el software TMHMM 2.0 la cual arrojó para Rv3632 tres hélices transmembranales localizadas entre las posiciones ⁴Ile-Arg²¹, ³⁰Ala-Leu⁴⁸ y ⁶⁸Leu-Tyr⁸⁵, del mismo modo se confirmó por la plataforma Phobius que posee tres hélices también, pero en diferentes posiciones ⁶Val-Arg²³, ³⁰Ala-Leu⁴⁸ y ⁶⁸Leu-Phe⁸⁸, la diferencia para esclarecer las regiones transmembranales depende del algoritmo y los parámetros que establece cada predictor. Para la proteína Rv3623 no presenta regiones transmembranales y que la predicción topológica (Phobius) corresponde a una región outer después del péptido señal (**Figura 10**). Las proteínas de superficie de micobacterias están expuestas a modificaciones por glicosilaciones o adición de grupos lipofílicos entre otros, por ello se encontró que Rv3632 por la plataforma GPS-Lipid, presentados modificaciones lipídicas posibles: S-palmitoylation (score: 2.97) y S-Farnesylation (score:10.76), las dos ubicadas en la ¹¹³Cys; por otra parte, no presentó modificaciones de tipo o-glicosídicas. Para Rv3623 en el servidor NetOGlyc v.4.0 arrojó cinco posibles sitios de glicosilación en las posiciones Thr⁹⁶, Thr⁹⁷, Thr¹⁰⁰, Thr²⁰⁷ y Ser²¹⁸ (**Figura 10**). Algunos de estos análisis concernientes al tipo de secreción concuerdan con lo reportado por Vizcaíno en 2010 (119).

La plataforma STRING v10.5, permitió constatar que Rv3632 interactúa de manera continua dentro de *Mtb* H37Rv con una gran cantidad de proteínas como: Rv3629c, Rv3630, Rv3631 y Rv3633, co-expresándose simultáneamente (**Figura 10**), mientras que Rv3623 se co-expresa conjuntamente con otras lipoproteínas: Rv1275 (LprC) y Rv2116 (LppK)(141).

6.2 Presencia y transcripción de genes

Para las muestras DNAg de las micobacterias usadas en este estudio, se muestra una buena integridad, se puede corroborar con la expresión del gen *hsp65* de aproximadamente 439 bp (**Figura 11A**). Se observa en la **Figura 11B** los productos de amplificación de 225 pb y 248 pb que muestra la presencia de los genes *rv3623* y *rv3632* respectivamente, en las cepas *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis*, *M. bovis* BCG pertenecientes al complejo MTC y *M. smegmatis* que es una cepa no patógena. El gen constitutivo *hsp65* también se usó como control de la transcripción para cada cepa micobacteriana, se confirmó que no había algún tipo de contaminación debida a DNAg (**Figura 11C**). Los fragmentos de amplificación de 225 y 248 pb se observaron en las cepas *M. tuberculosis* H37Rv; *M. tuberculosis* H37Ra; *M. bovis* y *M. bovis* BCG, se observa una señal para la cepa *M. smegmatis*, el ensayo permite indicar que los genes fueron transcritos en condiciones normales de cultivo de las micobacterias analizadas (**Figura 11D**).

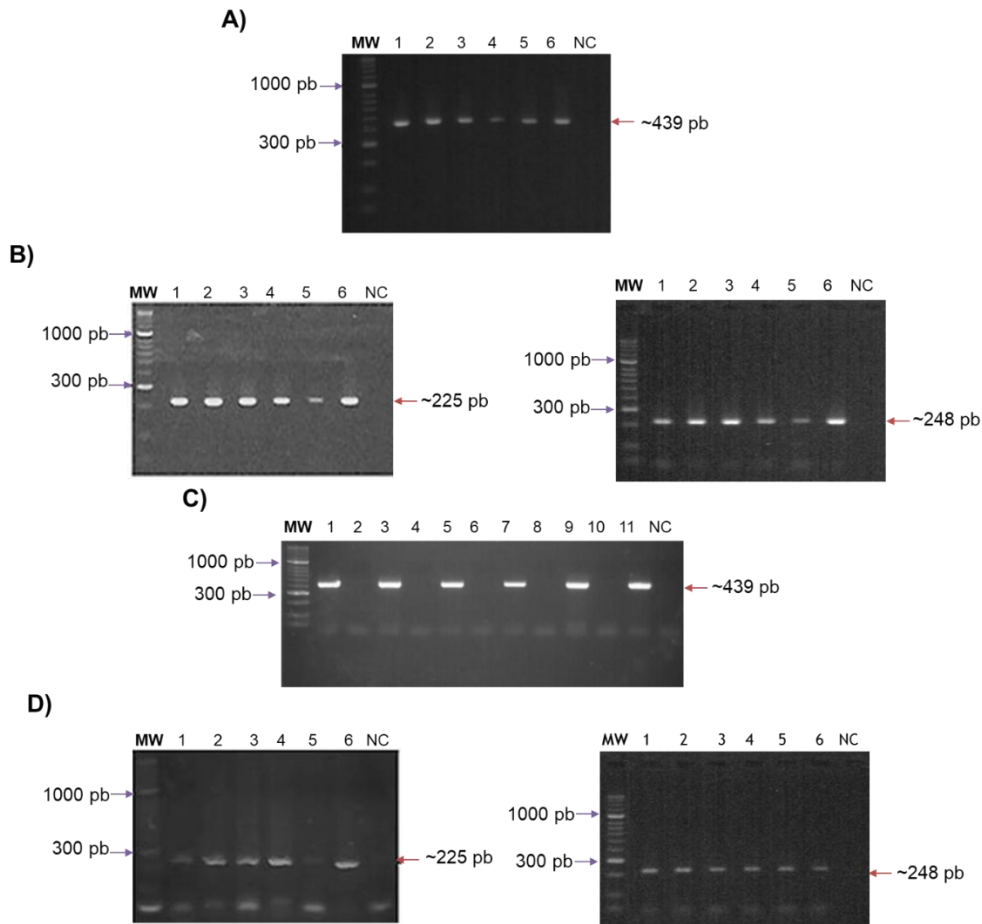


Figura 11. Presencia y transcripción de los genes rv3623 y rv3632. **A)** Amplificación del gen hsp65 a partir del gDNA aislado de: 1. *M. tuberculosis* H37Rv; 2. *M. tuberculosis* H37Ra; 3. *M.bovis*; 4. *M.bovis* BCG; 5. *M. smegmatis*; 6. Positive PCR control; NC: Negative PCR control. MWM: 50 bp molecular weight marker; **B)** Amplificación del gen rv3623 y rv3632 a partir de gDNA aislado de: 1. *M. tuberculosis* H37Rv; 2. *M. tuberculosis* H37Ra; 3. *M. bovis*; 4. *M. bovis* BCG; 5. *M. smegmatis*; 6. Positive PCR control; NC: Negative PCR control. Con un tamaño de amplicon de 225 y 248 pb para rv3623 y rv3632 respectivamente; **C)** Amplificación del gen hsp65 a partir de cDNA de: 1. *M. tuberculosis* H37Rv plus synthesis; 2. *M. tuberculosis* H37Rv minus synthesis; 3. *M. tuberculosis* H37Ra plus synthesis; 4. *M. tuberculosis* H37Ra minus synthesis; 5. *M. bovis* plus synthesis; 6. *M. bovis* minus synthesis 7. *M. bovis* BCG plus synthesis; 8. *M. bovis* BCG minus synthesis; 9. *M. smegmatis* plus synthesis; 10. *M. smegmatis* minus synthesis; 11. Positive PCR control (*M. tuberculosis* H37Rv gDNA); NC: Negative PCR control; MWM: 50 bp molecular weight marker; **D)** Amplificación de los genes rv3623 y rv3632 a partir de cDNA de: 1. *M. tuberculosis* H37Rv; 2. *M. tuberculosis* H37Ra; 3. *M.bovis*; 4. *M. bovis* BCG; 5. *M. smegmatis*; 6. Positive PCR control; NC: Negative PCR control. MWM: 50 bp molecular weight marker.

6.3 Expresión de las proteínas en la envoltura celular de *Mtb*

Se obtuvieron sueros policlonales por inoculación con cada uno de los péptidos predichos como epítodos B 16665-Rv3623 y 40057-Rv3632 (**Figura 10**) (153, 154). La inoculación con la mezcla

de péptidos 16660/16665 generó suero policlonal (**Figura 12A**) que reconoció una banda de aproximadamente 25 kDa que corresponde al peso teórico de la proteína Rv3623 en el lisado de *Mtb* H37Rv (**Figura 12A** línea 2). Por otra parte, se encontró que está presente en fracciones de pared y membrana de la misma micobacteria, pero no se encontró en citosol (**Figura 12A** líneas 5-6). El suero policlonal obtenido de la inoculación con el polímero de 40057-Rv3632 identificado como epítipo B (**Figura 10**), permitió el reconocimiento de una única banda alrededor de los 25 kDa (**Figura 12B** línea 2), el cual corresponde aproximadamente al doble de peso teórico de la proteína Rv3632 (13.07 kDa) en el lisado de *Mtb* H37Rv. No se observó reconocimiento por parte del suero pre-inmune (**Figura 12A** y **9B** línea 1). La microscopía inmuno-electrónica confirmó la presencia de Rv3632 (**Figura 12C**) del suero de una tercera inoculación con el epítipo B analizado por el servidor BepiPRED 1.0, las flechas indican partículas electrodensas que corresponden al reconocimiento del anticuerpo secundario marcado con oro coloidal de 10 nm. En regiones se observan las partículas de oro sobre la superficie bacteriana, lo cual confirma que la proteína Rv3632 hace parte estructural de la membrana celular.

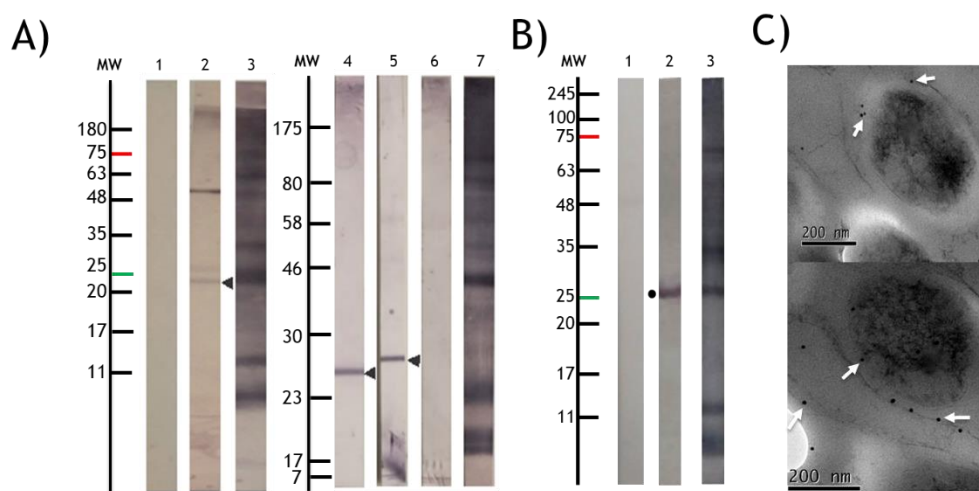


Figura 12. Detección de la proteína Rv3623 y Rv3632 en la superficie micobacteriana. A) Wester blot del reconocimiento proteico-Rv3623 en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 1: Suero preinmune. Línea 2: post-tercera inmunización de la mezcla 16660/16665/BSA contra *Mtb* H37Rv lisada. Línea 3,7: Reconocimiento del suero del hiper-inmune control + (obtenido por inoculación *Mtb* H37Rv sonicada). Líneas 4-6 muestran la identificación de proteínas de membrana, pared y citosol respectivamente del lisado de H37Rv por parte del suero del ratón inmunizado con la mezcla 16660/16665/BSA. **B)** Wester blot del reconocimiento de la proteína Rv3632 en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 1: Suero preinmune. Línea 2: post-tercera inmunización del polímero 40057 contra *Mtb* H37Rv lisada. Línea 3: Reconocimiento del suero del hiper-inmune control + (obtenido por inoculación *Mtb* H37Rv sonicada). **C)** Localización de la proteína Rv3632 por ensayo de IEM en la envoltura de bacilos *M. tuberculosis* H37Rv. Se observa una densidad electrónica hacia la superficie del bacilo debido al anticuerpo etiquetado con oro coloidal, indicados con flechas blancas (amplificación 5000x).

6.4 Estructura secundaria de los péptidos que conforman las proteínas Rv3623 y Rv3632

Para poder definir la estructura secundaria de los péptidos que conforman a las proteínas Rv3623 y Rv3632 se realizó un análisis experimental mediante difracción circular (144,155). Para la proteína Rv3632 se obtuvo que los péptidos tienen alta predominancia estructural de tipo alfa hélice como lo son: 39252 (²¹RSRRSARSRAWVKVGYVLFV⁴⁰); 39254 (⁶¹GVERRGTDLMLYALVMAFSFT⁸⁰) y 39256 (⁹⁶ARIARALALEGAQAPEQTRY¹¹⁴) con 100 % de identidad para esta estructura secundaria, que se caracteriza por tener un máximo de elipticidad molar a 192 nm y dos mínimos a 209 y 222 nm. Por otra parte aunque los péptidos 39253 (⁴¹LAGIYAVLRPDDTTVVANWF⁶⁰) y 39255 (⁸¹TLSTYMRFKDLELRYARIAR¹⁰⁰) predominan en un 98 % y 98,4 % la estructura alfa helical poseen un 2 % y 1,5 % respectivamente de estructura hoja plegada beta (**Figura 13A**). Estos datos son congruentes con lo que se evidenció al emplear las plataformas PSIPRED y Phyre², lo cual demuestra que los péptidos tienen una predominancia hacia este tipo de estructura alfa helical con la presencia de unas regiones cortas de random coil (**Figura 13B**).

Por otra parte, cuando se hizo el modeling de la protein 3D structure en Phyre² y la validación en Swiss model se obtuvo un QMEAN score de 0.121, se obtuvo una estructura fiable con el test de Ramachandran Plot de 88.5% para las regiones más favorecidas (**Figura 13C**). Los aminoácidos dieron una ubicación de 10.6 % en regiones permitidas adicionales, dando como resultado una estructura energéticamente estable. La localización de los HABPs respecto a la estructura propuesta por el servidor Phyre² para Rv3632 reveló la distribución e interacción que tienen los péptidos 39254, 39255 y 39256 para interactuar con ambas líneas celulares (**Figura 13D**). Con respecto a los elementos estructurales determinados experimentalmente de cada péptido encontró similitud con la estructura tridimensional predicha por Phyre² para la proteína Rv3632 y no hubo tampoco una diferencia entre lo predicho para la estructura secundaria.

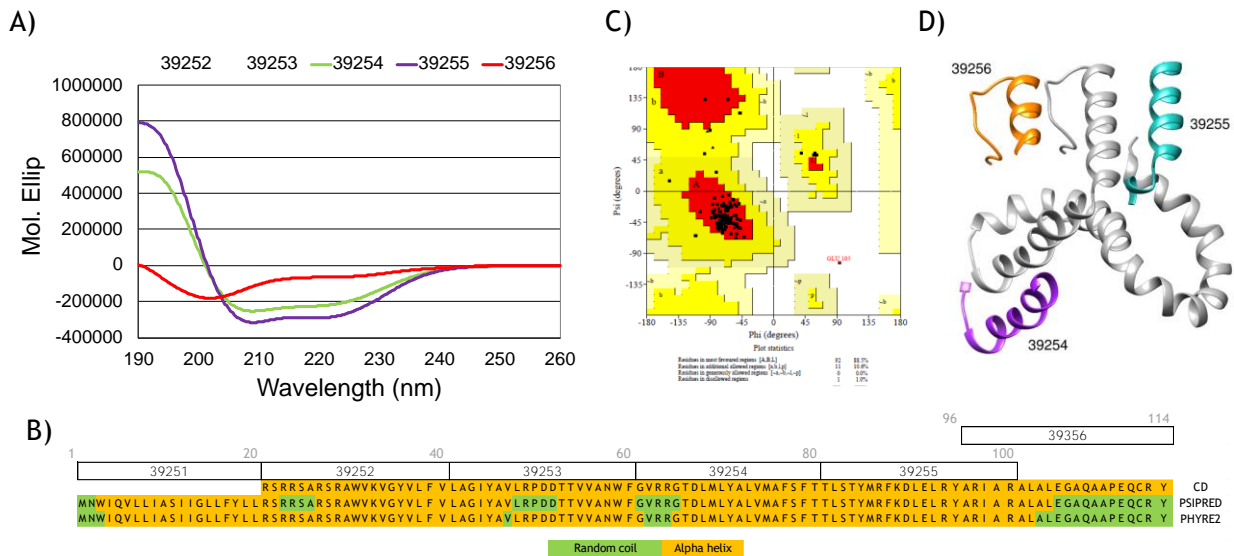


Figura 13. Análisis estructural de la proteína Rv3632. **A)** Dicroísmo circular elipticidad molar vs longitud de onda, para los péptidos que cumplen una estructura alfa hélice en la interacción del hospedero. **B)** Comparación de estructura secundaria obtenida por dicroísmo circular (DC), predictores bioinformáticos PSIPRED y lo observado por modelamiento en Phyre². **C)** Evaluación del modelo estructural por Phyre² mediante el análisis de Ramandram Plot, las zonas de color rojo indica regiones favorecidas y las que estas en tono amarillo son las regiones permitidas. **D)** Estructuración tridimensional de los 114 aminoácidos que conforman a la proteína Rv3632 obtenida por el software Phyre² y validada conjuntamente por el servidor Swiss-model, el modelo que se observa fue realizado por Chimera 1.11.2. los péptidos de alta unión se resaltan en la imagen.

Para el caso de la proteína Rv3623 (LpqG), constituida por 12 péptidos sintéticos que abarcan de manera lineal el total de la secuencia proteica. El péptido 16660 (¹MIRLVRHSIALVAAGLAAALY²⁰) tiene un 100 % de estructura de hoja β caracterizada por tener un máximo a 196 nm y un mínimo a 218 nm (**Figura 14**). Por otra parte los péptidos con predominancia de estructura α -helical (**Figura 14A**) fueron: 16661 (²SGCDSHNSGSLGADPRQVTVY⁴⁰); 16662 (⁴FGSGQVQGVPTLIADVGIQY⁶⁰); 16663 (⁶VTAADVTSAMNQTNDNRQQAVY⁸⁰); 16664 (⁸IDALVGAGLDRKDIRTTRVTY¹⁰⁰); 16666 (¹²ADNDIEVKIHPTDAASRLAY¹⁴⁰); 16668 (¹⁶DDSQLVKDARARAFQDAKNRY¹⁸⁰); 16669 (¹⁸ADQYAQLSGLRLGKVISISE²⁰⁰) y 16670 (²⁰ASGAAPTHEAPAPRGLSAVY²²⁰). Finalmente los péptidos 16665 (¹⁰VAPQYSNPEPAGTATITGYR¹²⁰) y 16667 (¹⁴LVVSTGGDATRISSVSYSIG¹⁶⁰) no presentan elementos estructurales definidos (**Figura 14A**), para el caso del péptido 16671 no se pudo sintetizar, por consiguiente no se tienen la aproximación experimentales de la estructura secundaria.

La predicción de estructura secundaria con el servidor PSI-PRED muestra en la proteína Rv3623 cuatro regiones α -helicales donde están contenidos los péptidos 16660, 16663, 16666, 16668, 16669 y 16671 una región rica en hojas beta (16662) (**Figura 14B**). Por otra parte cuando se hizo el modeling de la protein 3D structure en Phyre² y la validación en Swiss model and AMBER se obtuvo un QMEAN score de 0.54, luego se realizó una minimización energética por el programa AMBER para así mejorar y obtener una mejor concordancia en el modelo realizado (**Figura 14D**). Finalmente, para tener un modelo que abarque por completo la proteína fue necesario diseñar el péptido 16661 mediante Chimera 1.11.2, basándose en los resultados obtenidos por dicróismo circular. En la evaluación del modelo se obtuvo una estructura confiable al aplicar el test de Ramachandran Plot, el cual arrojó un 89.1% de coincidencia entre las regiones permitidas (**Figura 14C**), con relación a la ubicación de los residuos de aminoácidos en regiones adicionales permitidas es del 8,6 % y respecto a las regiones generosas un 1,1 %, lo que la hace una estructura estable energéticamente.

Teniendo en cuenta los elementos estructurales determinados experimentalmente para cada péptido se encuentra una alta similitud con con la estructura tridimensional predicha para la proteína (**Figura 14D**), pero diferencias apreciables con la predicción de estructura secundaria (**Figura 14B**).

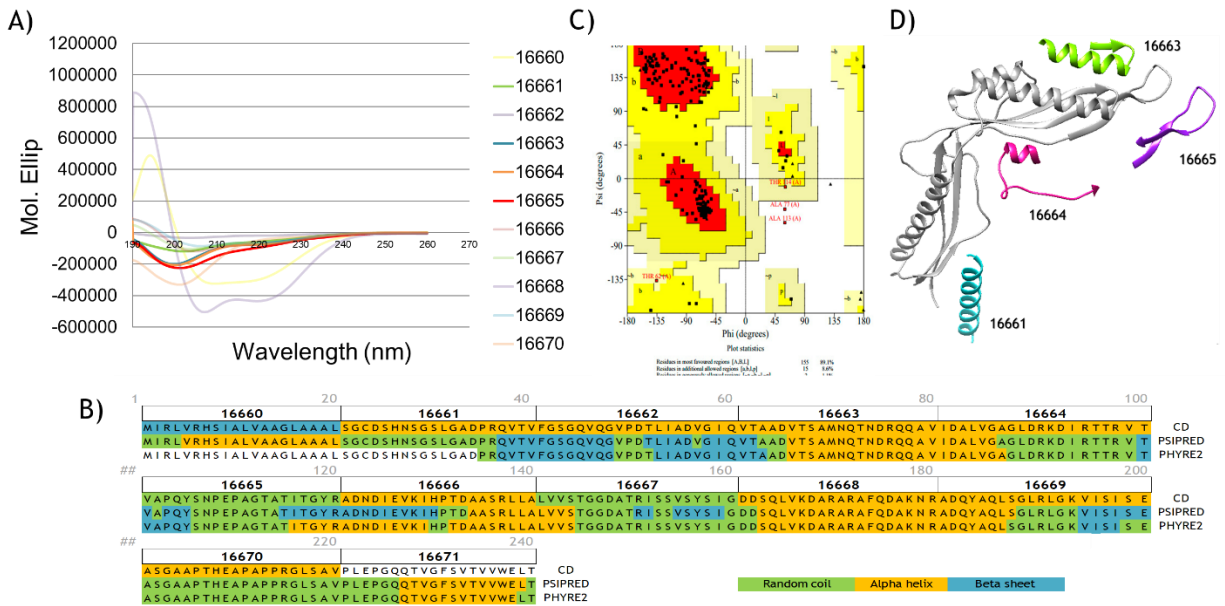


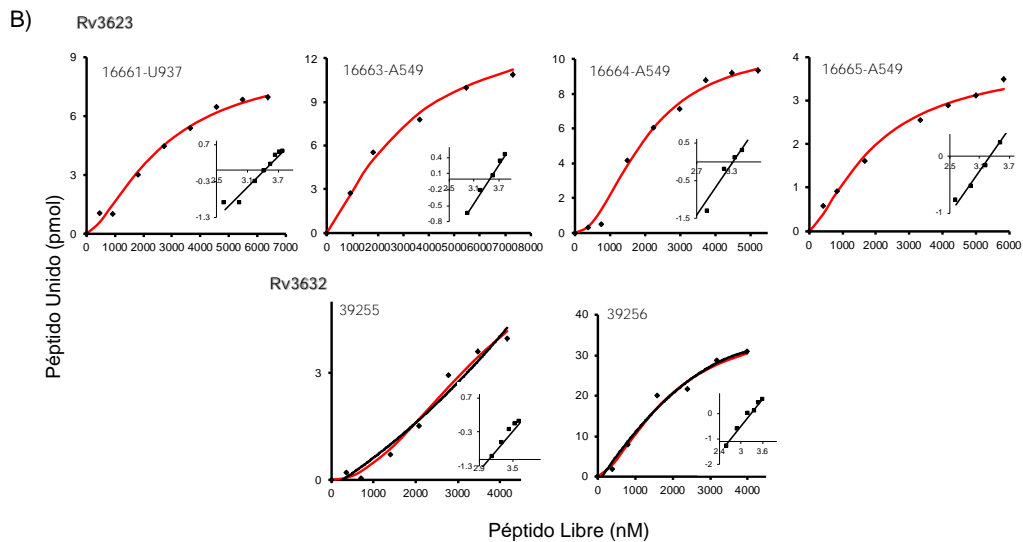
Figura 14. Análisis estructural de la proteína Rv3623. **A)** Dicroísmo circular elipticidad molar vs longitud de onda, para los péptidos que cumplen una estructura alfa hélice en la interacción del hospedero con la línea celular alveolar A549 y macrófagos derivados de monocitos U937. **B)** Comparación de estructura secundaria obtenida por dicroísmo circular (CD), predictores bioinformáticos PSIPRED y lo observado por modelamiento en Phyre². **C)** Evaluación del modelo estructural por Phyre² mediante el análisis de Ramandram Plot, las zonas de color rojo indica regiones favorecidas y las que estas en tono amarillo son las regiones permitidas. **D)** Estructuración tridimensional de los 114 aminoácidos que conforman a la proteína Rv3623 obtenida por el software Phyre² y validada conjuntamente por el servidor Swiss-model que se le ha realizado una minimización energética por AMBER (solvatación), el modelo que se observa fue realizado por Chimera 1.11.2. Los péptidos de alta unión se resaltan en la imagen.

6.5 Péptidos sintéticos se unen específicamente a células blanco de infección A549 y U937

La secuencia proteica de Rv3623 está constituida por 12 péptidos sintéticos de 20 aa de longitud, lo cual abarca todos los 240 aminoácidos; para el caso de Rv3632 la proteína es constituida por 114 aminoácidos, de los cuales se obtuvieron 6 péptidos de 20 aa consecutivos. Estos péptidos se sintetizaron en fase sólida mediante la estrategia t-Boc, con la finalidad de identificar la interacción de estos fragmentos con receptores de las células epiteliales A549 (ATCC CLL-185) y macrófagos U937 (ATCC CRL-2367). En la **Figura 15A** se muestran los resultados de unión específica para cada uno de los péptidos sintéticos frente a las líneas celulares blanco de infección. Los péptidos con una actividad de unión específica (diferencia entre la unión total y la unión inhibida) superior o igual a 1%, se consideraron como un péptidos de alta unión específica a la célula blanco HABPs (high activity binding peptides).

A)

Proteína	Número Péptido	Secuencia	Actividad de Unión (%)			
			A549		U937	
			1	2	1	2
Rv3623	16660	1 M I R L V R H S I A L V A A G L A A A L Y 20				
	16661	21 S G C D S H N S G S L G A D P R Q V T V Y 40	█		█	█
	16662	41 F G S G Q V Q G V P D T L I A D V G I Q Y 60	█		█	█
	16663	61 V T A A D V T S A M N Q T N D R Q Q A V Y 80	█		█	█
	16664	81 I D A L V G A G L D R K D I R T T R V T Y 100	█	█	█	█
	16665	101 V A P Q Y S N P E P A G T A T I T G R Y R 120	█		█	█
	16666	121 A D N D I E V K I H P T D A A S R L L A Y 140	█		█	█
	16667	141 L V V S T G G D A T R I S S V S Y S I G 160	█		█	█
	16668	161 D D S Q L V K D A R A R A F Q D A K N R Y 180	█		█	█
	16669	181 A D Q Y A Q L S G L R L G K V I S I S E 200				
	16670	201 A S G A A P T H E A P A P P R G L S A V Y 220	█		█	█
16671	221 P L E P G Q Q T V G F S V T V V W E L T Y 240					
Rv3632	39251	1 M N W I Q V L L I A S I I G L L F Y L L 20				
	39252	21 R S R R S A R S R A W V K V G Y V L F V 40				
	39253	41 L A G I Y A V L R P D D T T V V A N W F 60	█		█	█
	39254	61 G V R R G T D L M L Y A L V M A F S F T 80	█	█	█	█
	39255	81 T L S T Y M R F K D L E L R Y A R I A R 100	█	█	█	█
	39256	96 A R I A R A L A L E G A Q A P E Q T R Y 114	█	█	█	█



C)

HABP-Célula blanco	Constante de Disociación (K_D), nM	Coefficiente de Hill (n_H)	Sitios de unión por célula
16661-U937	2,700	1.5	5×10^6
16663-A549	2,800	1.4	9×10^6
16664-A549	2,000	3.0	7×10^6
16665-A549	2,000	1.4	3×10^6
39255-A549	2,250	3.3	2.7×10^6
39255-U937	1,800	1.2	1.9×10^6
39256-A549	1,900	1.6	2.5×10^7
39256-U937	1,800	1.6	1.2×10^7

Figura 15. Unión específica de los péptidos de las proteínas Rv3623 y Rv3632 a células blanco de infección.
A) Péptidos sintéticos muestran unión específica a las células A549 y U937. Las barras muestran el porcentaje de unión específica a células blanco, si es mayor o igual a 1% es considerado un HABP. En rojo está un aminoácido adicionado al N-terminal con el fin de permitir su radiomarcación. **B)** Curvas de saturación para los péptidos 16691, 16663, 16664, 16665, 39255, y 39256 en ambas líneas celulares. En el recuadro la abscisa es LogF en el Hill Plot y la ordenada es Log[B/Bmax-B], siendo Bmax la cantidad máxima de péptido unido, B el péptido unido y el peptide libre F. **C)** El análisis de los coeficientes de Hill facilitó la obtención de las constantes de afinidad y la cantidad de sitios de union por célula.

Se identificaron cuatro HABPs en la proteína Rv3623: para la línea celular A549 la región comprendida entre los péptidos 16663 y 16665 (⁶¹VTAADVTSAMNQTNDRQQAVYIDALVGAGLDRKDIRTTRVTYVAPQYSNPEPAGTATITGYR¹²⁰); y el péptido 16661 (²¹SGCDSHNSGSLGADPRQVTY⁴⁰) para la línea U937. Para el caso de Rv3623 se encontraron HABPs para las dos líneas celulares que comprenden la región C-terminal de la proteína entre los aminoácidos Thr⁸¹ y Arg¹¹⁴, mientras que la secuencia del péptido 39254 (⁶¹GVRRTDLMLYALVMAFSFT⁸⁰) solo es HABP para la línea celular epitelial alveolar A549 (**Figura 15A**).

Las curvas de saturación para cada péptido permitió determinar las constantes fisicoquímicas de la interacción del HABP-receptores celulares de las líneas blanco de infección (**Figura 15B**). Las constantes de disociación (KD) para los HABPs se encuentran en el rango entre 1800-2800 nM, los coeficientes de Hill (nH) para estas interacciones fueron mayores que uno, siendo esto característico de cooperatividad positiva. Se calcularon entre $1.2 \cdot 10^6$ y $2.5 \cdot 10^7$ sitios receptores por célula para el péptido, cabe mencionar que los posibles receptores celulares no se han establecido (**Figura 15C**).

6.6 Péptidos de alta unión bloquean el ingreso de *Mtb* a células epiteliales y macrófagos

Previamente se llevó a cabo el ensayo de toxicidad, que permitió identificar para la línea epitelial alveolar A549 una mayor susceptibilidad de los péptidos a 200 μ M, el resultado más sobresaliente para la proteína Rv3623 fue respecto al péptido 16670 que tuvo un porcentaje de citotoxicidad del 48,7 %, mientras que los HABPs (16661,16663, 16664 y 16665), tres de los cuatro presentaron un porcentaje de toxicidad de 35, 44.9 y 36.4 para los péptidos 16663, 16664 y 16665 respectivamente a 200 μ M. Para Rv3632 corresponde al péptido 39252 que mostró un porcentaje de citotoxicidad de 70.4 %. Los HABPs 39254, 39255 y 39256 presentan porcentajes de citotoxicidad de 28.0, 41.7, 44.7 respectivamente a la mayor concentración empleada (**Figura 16**).

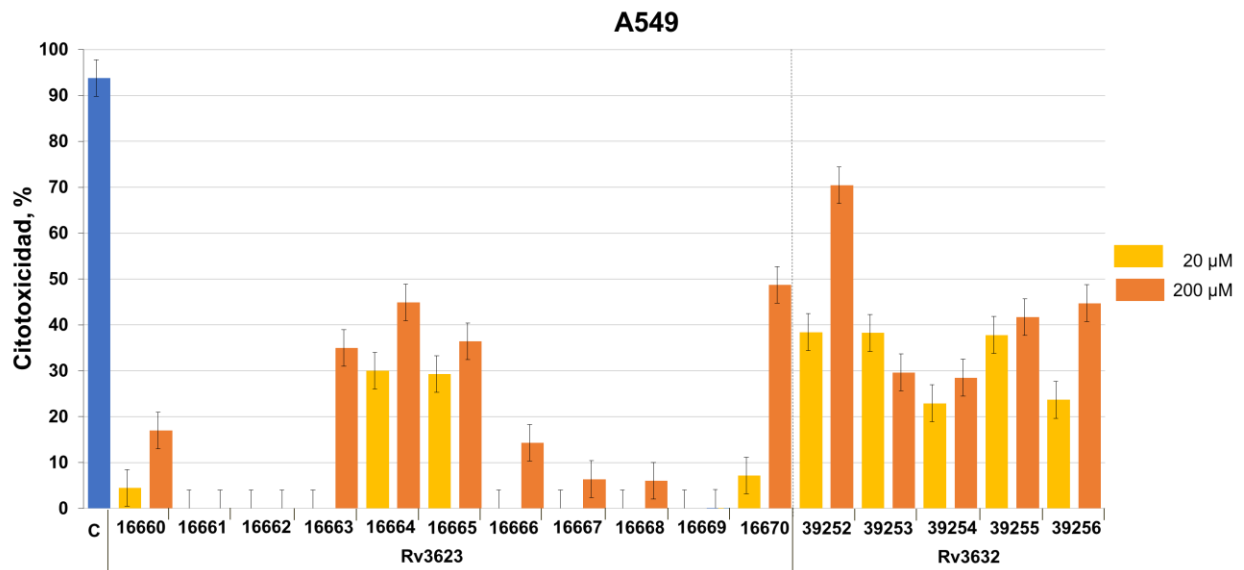


Figura 16. Citotoxicidad de los péptidos para las proteínas Rv3623 y Rv3632 en la línea epitelial alveolar A549. El porcentaje de citotoxicidad de cada péptido para células A549 fue evaluado a dos concentraciones 20 y 200 µM. El SDS fue usado como control citotóxico.

Para la línea de macrófagos U937 no hay efecto citotóxico >10 % en la mayoría de los péptidos de las dos proteínas en estudio a ninguna concentración evaluada, solo el péptido 39252 (Rv3632) alcanzó una citotoxicidad del 34.8 % a 200 µM (**Figura 17**). Por otra parte, el SDS empleado como control positivo mostró un porcentaje de citotoxicidad de un 92 % aproximado para ambas líneas.

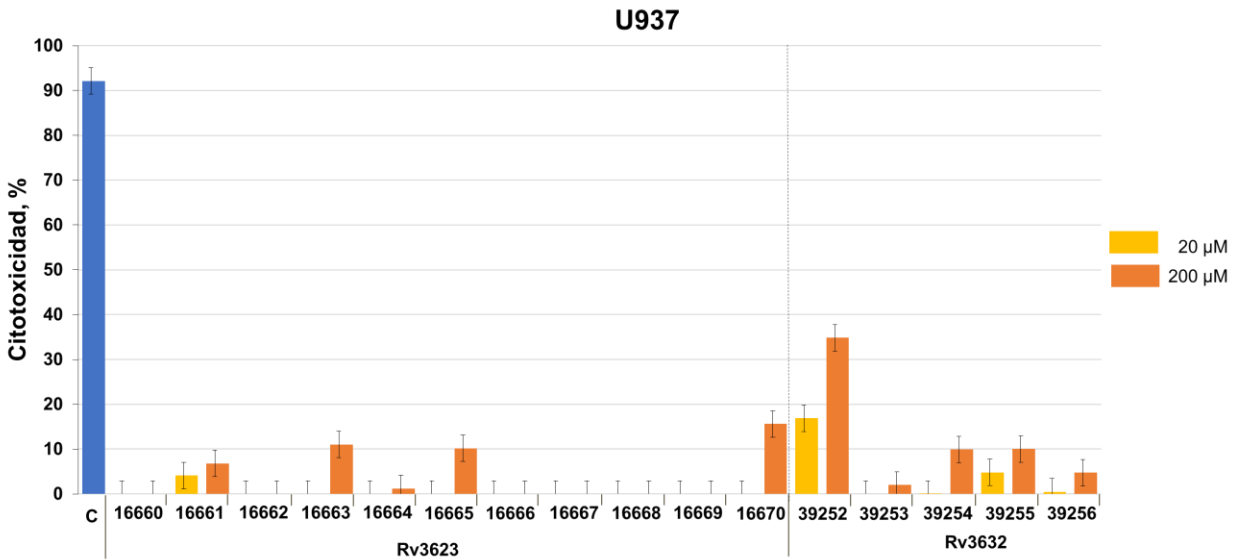


Figura 17. Citotoxicidad para los péptidos de las proteínas Rv3623 y Rv332 en la línea celular de macrófagos U937. El porcentaje de citotoxicidad de cada péptido para células U937, evaluado a dos concentraciones 20 y 200 μM . El SDS fue usado como control citotóxico.

Solo se determinó la capacidad de los péptidos 16661, 16663, 16664 y 16665 (identificado como HABPs para Rv3623) para boquear la entrada de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a cada línea celular (es decir que tienen unión específica a las células blanco de infección). Como control del ensayo se utilizó lisado de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv el cual tuvo alrededor de 60 % de inhibición para ambas líneas celulares (**Figura 18**). El péptido 16663 inhibió la entrada de micobacterias a las células A549 independiente de la concentración aproximadamente un 50 % a una concentración de 20 μM , mientras que los HABPs 16664 y 16665 inhibían la entrada de la bacteria en un 59 % y 36 % a 200 μM y 2 μM respectivamente. El péptido 16670 considerado no HABP inhibió la entrada de micobacterias a ambas líneas celulares, independiente de la concentración. En este caso el control de inhibición que corresponde al lisado de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estuvo alrededor del 62 % para las epiteliales y un 58,6 % para la línea macrófago. Para el caso de Rv3632, los HABPs 39255 y 39256 inhiben el ingreso de la micobacteria a las epiteliales alveolares de manera inversa a la concentración del péptido; respecto al HABP 39254 de la línea A549 inhibe la entrada de la micobacteria independiente de la concentración del péptido (**Figura 18**).

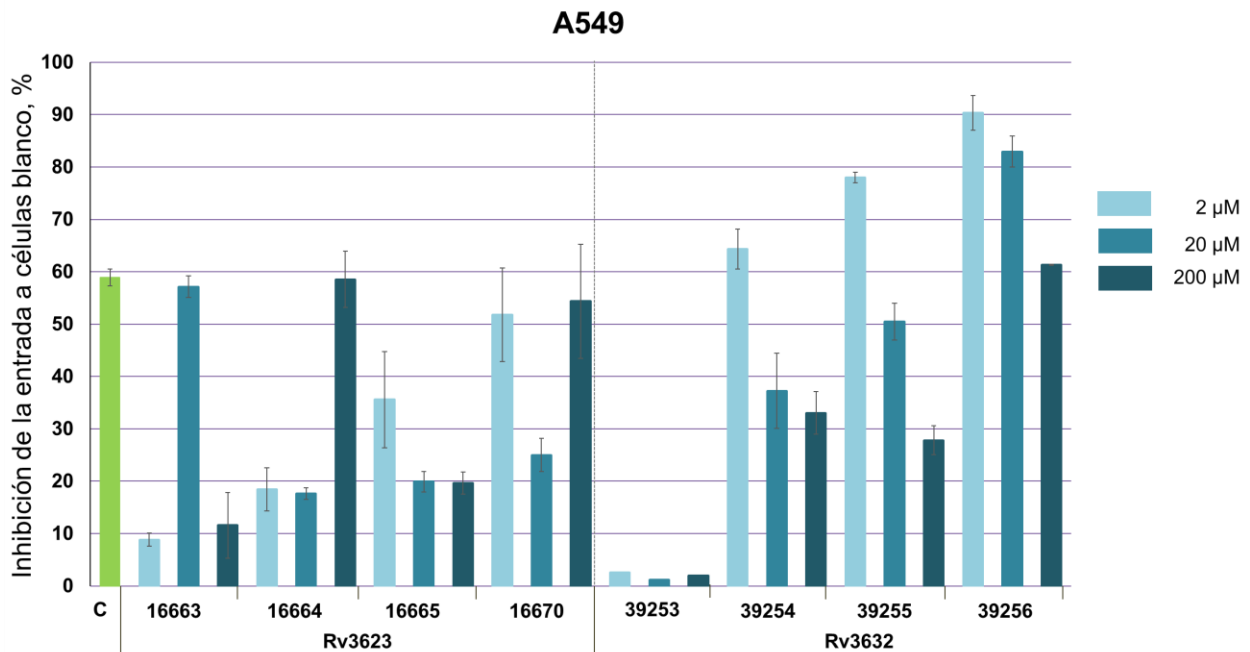


Figura 18. Inhibición de la entrada de *Mtb* mediada por los HABPs a las células epiteliales A549. Porcentaje de inhibición del ingreso de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a células diana de infección a concentraciones crecientes (2, 20 y 200 μM en azul) de los péptidos 16663, 16664, 16665 (Rv3623) y 39254, 39255, 39256 (Rv3632). La Citocalasina D considerada en este ensayo como control positivo de inhibición fue empleada a 30 μM. Además los péptidos 16670 y 39253 corresponden al control no HABP para este estudio.

Como resultado se puede apreciar que la Citocalasina D presentó un bloqueo de ingreso de la micobacteria a células blanco alrededor de 60 % para las epiteliales y 80 % aproximadamente para los macrófagos derivados de monocitos. El HABP 16661-LpqG inhibió la entrada de la micobacteria a los macrófagos U937 derivados de monocitos de una manera dependiente de la concentración con un valor de 42 % a la máxima concentración (**Figura 19**). Para el caso de la proteína Rv3632 se usó como control un péptido que no presentó alta unión específica: 39253 (⁴¹LAGIYAVLRPDDTTVVANWF⁶⁰). Por otra parte, los HABPs 39255 y 39256 inhiben el ingreso de la micobacteria a los macrófagos (U937) hasta en un 80 % y de manera dependiente de la concentración (**Figura 19**). El péptido 39253 empleado como control, no presentaba unión específica a ambas líneas celulares y no estuvo involucrada en el ingreso de la micobacteria a la célula diana de infección.

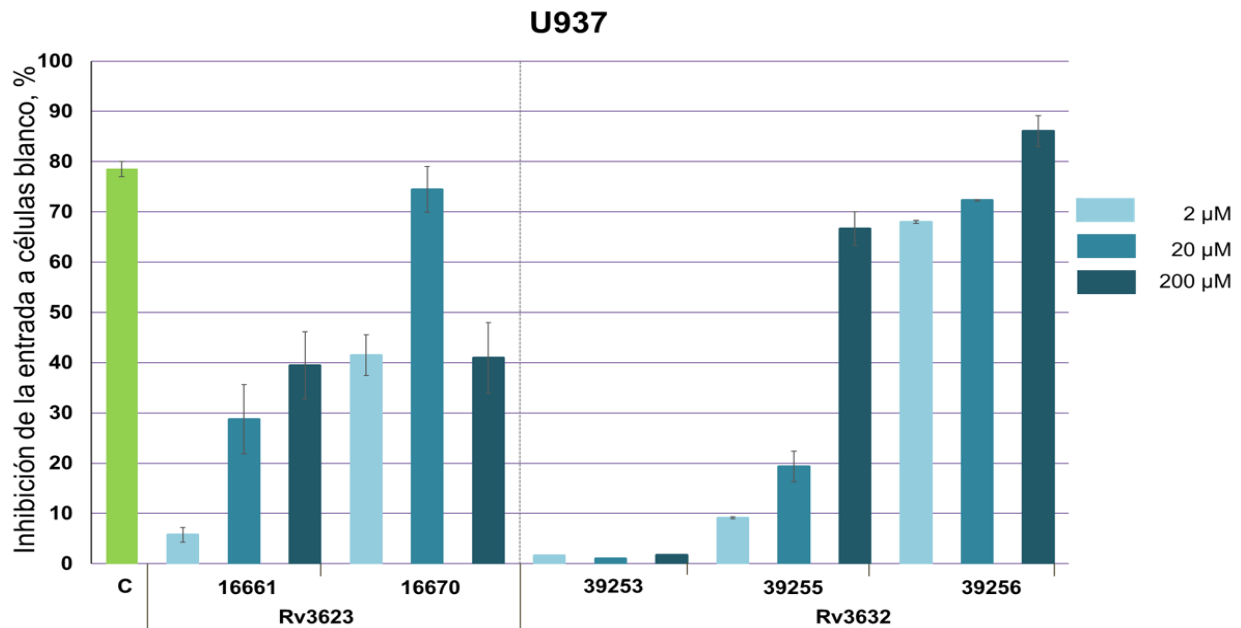


Figura 19. Inhibición de la entrada de *Mtb* mediada por los HABPs a los macrófagos U937. Porcentaje de inhibición del ingreso de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a células diana de infección a concentraciones crecientes (2, 20 y 200 µM en azul) de los péptidos 16661 (Rv3623) y 39255, 39256 (Rv3632). La Citocalasina D considerada en este ensayo como control positivo de inhibición fue empleada a 30 µM. Además los péptidos 16670 y 39253 corresponden al control no HABP para este estudio.

6.7 Evaluación de antigenicidad para los péptidos de Rv3623 y Rv3632

Para la creación de una vacuna multiepitópica contra tuberculosis, se hace necesario evaluar si los péptidos de las proteínas en este estudio Rv3623 y Rv3632 son reconocidos por sueros de donantes clasificados como tuberculosis activa (TBA), en estado de latencia (TBL) o donantes sanos (DS). Se observa en la **Figura 20** que el péptido 39252 (²¹RSRRSARSRAWKVG YVLFV⁴⁰) considerado un no HABPs de la proteína Rv3632 cercano a la región N-terminal de la proteína, tiene alto reconocimiento por los sueros de los donantes con tuberculosis en estado de latencia TBL, y que presenta diferencias significativas respecto al reconocimiento por los sueros de los individuos TBA y donantes sanos (DS). Los péptidos más antigénicos de esta proteína hacen parte del C-terminal de la proteína, que abarcan los residuos ⁶¹Gly→⁸⁰Thr (39254) y ⁹⁶Ala→¹¹⁴Tyr (39256), asociado con la capacidad de unión e inhibición de la entrada de *Mtb* H37Rv a ambas líneas celulares.

Los datos obtenidos en el ensayo de ELISA mostraron por el análisis de Kolmogorov-Smirnov una normalidad para lo cual fueron sometidos los valores a un análisis de ANOVA de una vía y análisis múltiple de comparación Tukey's con la intención de evaluar la existencia de diferencia entre las poblaciones analizadas en este ensayo. Solo se apreció una diferencia significativa para el péptido 39252 entre los sueros de los pacientes con tuberculosis latente-TBL versus los activos-TBA y DS (**Figura 20**), algo que no sucedió con el HABP 39255 ($^{81}\text{TLSTYMRFKDLELRYARIAR}^{100}$) el cual mostró un alto reconocimiento por parte de los anticuerpos de pacientes TBL y bajos títulos para TBA, pero por el análisis estadístico no mostró diferencia entre las poblaciones estudiadas.

Para el caso de la proteína LpqG, se llevó a cabo la prueba de comparación múltiple de Dunnett, que no proporcionó diferencias significativas con respecto al reconocimiento del suero de los grupos en estudio a cada péptido conformacional de la proteína, a pesar de que la absorbancia estaba por encima del umbral 0.086 (calculado en ausencia del antígeno). El reconocimiento de los péptidos de la proteína Rv3623 fue tan bajo como el mostrado para el sobrenadante micobacteriano (Sauton) para todos los sueros utilizados.

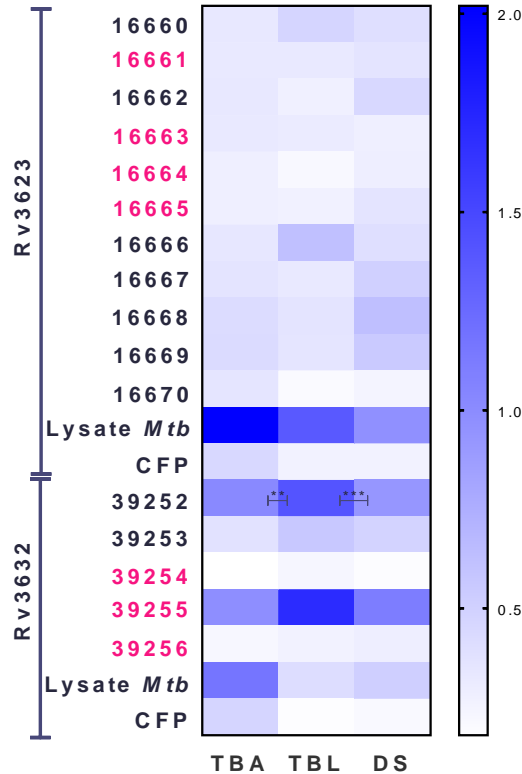


Figura 20. Reconocimiento antigénico de los péptidos que conforman a las proteínas Rv3623 y Rv3632. Evaluación de los sueros de individuos que tienen tuberculosis activa (TBA), latente (TBL) y personas sanas (DS). En fucsia se encuentran señalados los HABPs de cada una de las proteínas. Se utilizó como control negativo PBS1X, también se usaron el lisado de *Mtb* H37Rv y las proteínas liberadas por la micobacteria al medio Sauton (CFP) como antígeno. Las absorbancias están por encima del umbral (0,0503) calculado en ausencia de antígeno. Los HABPs están resaltados de color rojo. ** $p > 0.028$; *** $p > 0.0003$ análisis múltiple de comparación Tukey's. Gráfica realizada en GraphPad Prism v.7.0.

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

Se analizó por el predictor NetMHCIIpan 4.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/> (148), 19 proteínas que corresponden a 36 secuencias de péptidos derivados de proteínas de superficie de *Mtb*: Rv0180c; Rv0227c; Rv0679c; Rv1268c; Rv1411c; Rv1490; Rv1911; Rv1980c; Rv2004c; Rv2270; Rv2301c; Rv2560; Rv2707; Rv3166c; Rv3494c; Rv3587; Rv3623; Rv3629 y Rv3632, seleccionados con base en resultados de estudios previos realizados en la FIDIC, que cumplen con ciertas características para ser consideradas dentro de un modelo de vacuna contra TB, estos péptidos han sido reportados como secuencias de alta unión específica a células blanco de infección (HABPs), que logran disminuir significativamente y proporcionalmente a la

concentración del péptido el ingreso de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a células hospederas como monocitos derivados a macrófagos U937 (ATCC CRL-2367) y células epiteliales alveolares tipo II A549 (ATCC CLL-185), indicando así que pueden ser funcionalmente importantes en la interacción hospedero-patógeno.

Inicialmente se analizaron 36 secuencias peptídicas que correspondían a secuencias nativas conservadas (cHABPs), las cuales dieron lugar a 30 nuevas secuencias modificadas (mHABPs) para un total de 66 secuencias, teniendo en cuenta que la modificación del péptido, se hace con la intencionalidad de generar un mejor acople a los bolsillos 1,4,6 y 9 del MHC-II, otorgándole al péptido una mejor unión al MHC, con ello sería capaz de inducir la generación de una respuesta inmune de acuerdo a las reglas establecidas y ampliamente divulgadas en el desarrollo de una vacuna sintética contra paludismo (16-18, 22, 23), pues se ha establecido que péptidos conservados pueden ser inadecuados para desencadenar una respuesta inmune protectora.

El análisis de predicción de unión a alelos de HLA clase II se inició a partir de los resultados obtenidos por los alelos más frecuentes HLA DR β en la población mundial desde el servidor allelefrequencies (<http://www.allelefrequencies.net/>) con lo cual se obtuvo un total de 57 alelos DR β para analizar, repartidos en 49 para DR β 1; 5-DR β 3; 1-DR β 4 y 2 para DR β 5 [(DR β 1= 01:01, 01:02, 03:01, 03:02, 03:05, 04:01, 04:02, 04:03, 04:04, 04:05, 04:06, 04:07, 04:08, 07:01, 07:04, 08:01, 08:02, 08:04, 09:01, 09:02, 10:01, 11:01, 11:02, 11:04, 11:06, 11:11, 12:01, 12:16, 13:01, 13:02, 13:03, 13:05, 13:07, 13:30, 14:01, 14:03, 14:04, 14:05, 14:06, 14:08, 14:14, 14:25, 14:32, 15:01, 15:02, 15:03, 16:01, 16:04, 16:15) (DR β 3= 01:01, 02:01, 02:02, 02:09, 03:01) (DR β 4 01:01) (DR β 5= 01:01, 02:02)]. Adicionalmente, se evaluaron cinco alelos (DR β 1: 01:03, 04:11, 07:11, 14:02 y 16:02) que no pertenecen a los más frecuentes diagnosticados, ya que algunos donantes (13, 15, 17, 18 y 27) tienen al menos uno de estos.

Luego se hizo un corrimiento de cada una de las secuencias (68 péptidos) al acople del MHC-II a partir de la plataforma NetMHCIIpan 4.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>), donde se codificó de manera binaria los resultados obtenidos: 2- si existía unión fuerte (148) o 1- unión débil (UD) y 0- a lo que no tenía unión, los cuales corresponden a un score de 0-2% Rank; 2.1-10% Rank y > a 10% respectivamente (**Anexo 2**), lo cual mostró que de las 19 proteínas analizadas, 16 proteínas se unieron al MHC-II, que corresponden a 32 secuencias que presentaron unión al MHC-II (**Figura 21**). Se estimaron en total 257 uniones a los diferentes

alelos del MHC-II, lo cual fueron definidos como 206 de unión débil y 51 de unión fuerte (**Figura 21**). Sin embargo, los péptidos de las proteínas Rv1268c, Rv2301c y Rv3629 no presentaron pronóstico de unión, como también los alelos DR β 1 (14:01; 14:04 y 14:32) no presentaron unión a ninguno de los péptidos analizados (**Figura 21**).

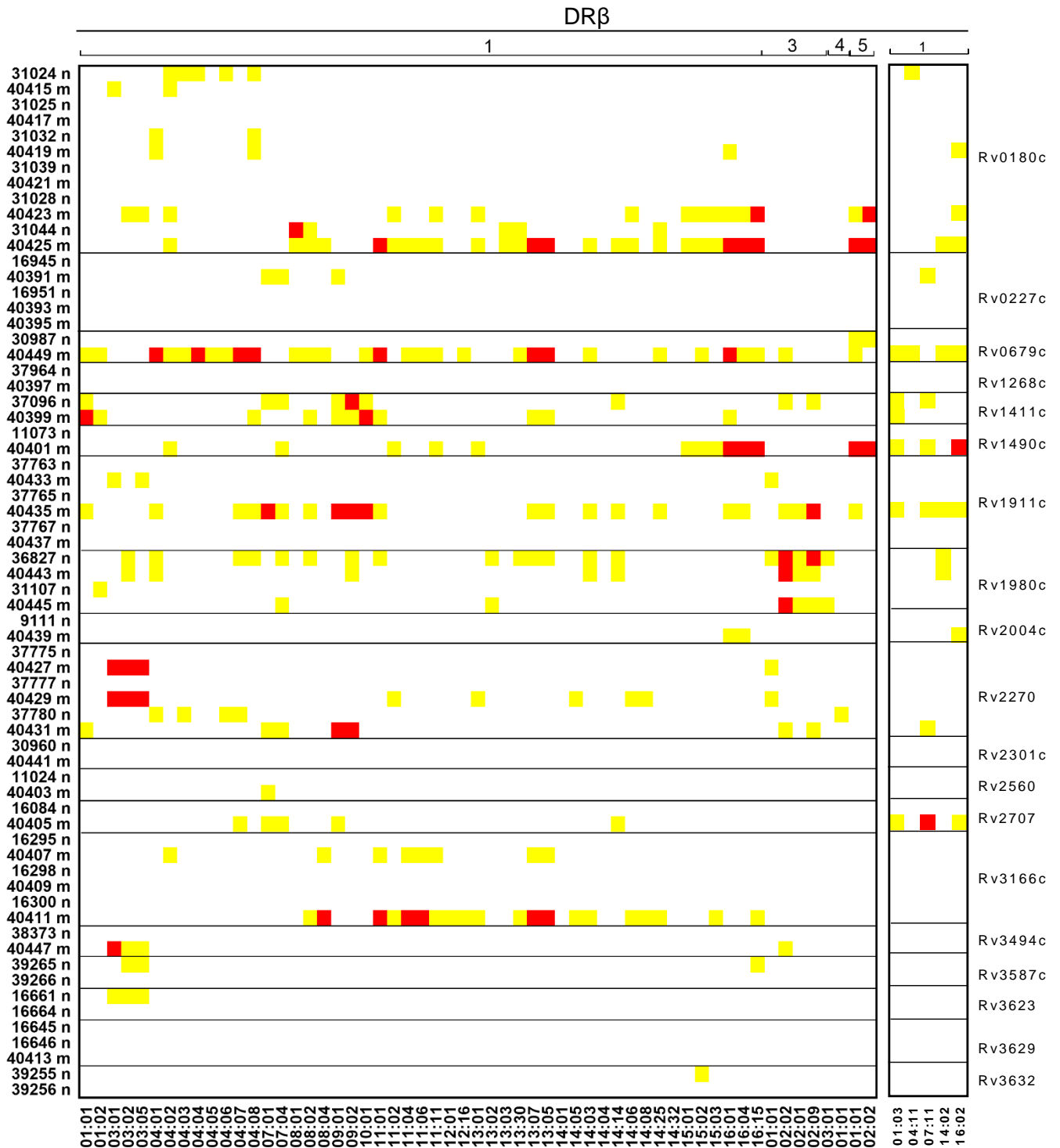


Figura 21. Perfil de unión al MHC-II por parte de las secuencias peptídicas HABPs provenientes de *Mycobacterium tuberculosis*. En el eje X se presentan los 62 alelos HLA-DRβ 1,3,4 y 5; 57 son los más frecuentes se muestran al lado izquierdo; y en el lado derecho del eje X se encuentran los alelos menos frecuentes. En el eje Y los péptidos HABPs nativo monómero (*n*) y modificado monómero (*m*). La predicción de la unión de los péptidos a los diferentes alelos se encuentra señalado en código de colores: rojo para uniones fuertes, amarillo para uniones débiles y blanco para lo que no presentaba unión.

De las 66 secuencias peptídicas analizadas, 34 no presentaron unión por el servidor NetMHCIIpan 4.0 a ninguno de los 62 alelos, entre ellos están: 31025, 40417, 31039, 40421 y 31028 (Rv0180c); 16945, 16951, 40393 y 40395 (Rv0227c); 37964 y 40397 (Rv1268c); 11073 (Rv1490); 37763, 37765, 37767 y 40437 (Rv1911c); 9111 (Rv2004c); 37775 y 37777 (Rv2270); 30960 y 40441 (Rv2301c); 11024 (Rv2560); 16084 (Rv2707); 16295, 16298, 40409 y 16300 (Rv3166c); 38372 (Rv3494c); 39266 (Rv3587c); 16664 (Rv3623); 16645, 16646 y 40413 (Rv3629) y 39256 de Rv3632 (**Figura 22A**). También se puede notar que las secuencias modificadas en la mayoría de los casos mejoran la cantidad de uniones (resaltado en el superíndice) en comparación con su secuencia homóloga nativa, tal es el caso del péptido 31045 paso de tener 5 uniones a 26 uniones su homólogo modificado 40445 (Rv0180c), este mismo fenómeno se encontró en otros péptidos: Rv0180c (31028⁰ → 40423¹⁵), Rv0679c (30987² → 40449³⁰); Rv1490 (11073⁰ → 40401¹³), Rv1911c (37765⁰ → 40435²²), Rv2270 (37777⁰ → 40429⁹), Rv2707 (16084⁰ → 40405⁵) y Rv3166c (16300⁰ → 40411²⁰) (**Figura 22A**).

Por otra parte, no siempre las modificaciones generaron mayor unión a los alelos que la secuencia nativa, caso particular sucedió con: Rv0180c (31024⁵ → 40415²); Rv1980c (36827¹⁹ → 40443⁸), donde el nativo tiene mayor preferencia alélica respecto a la modificación. Como en otros casos, donde las dos secuencias nativa y modificada no presentaron unión, tal fue el caso para: Rv0180c (31025 → 40417; 31039 → 40421); Rv0227c (16951 → 40393, 40395); Rv1268c (37964 → 40397); Rv1911c (37767 → 40437); Rv2301c (30960 → 40441); Rv3166c (16298 → 40409); Rv3629 (16645, 16646 → 40413) (**Figura 21 y 22A**).

Finalmente, el análisis de unión reveló que algunas secuencias peptídicas presentaron una alta unión aleatoria a varios alelos DRβ, donde se resalta: 40449 (52,6 %), 40425 (45,6 %), entre otros de todos los alelos contemplados en este estudio. Lo que demuestra que las secuencias modificadas son más prominentes a ser presentadas por el complejo mayor de histocompatibilidad clase II, para este caso se demostró que estas secuencias incrementan su unión a los alelos de una manera exponencial con respecto a las secuencias de origen (**Figura 22B**).

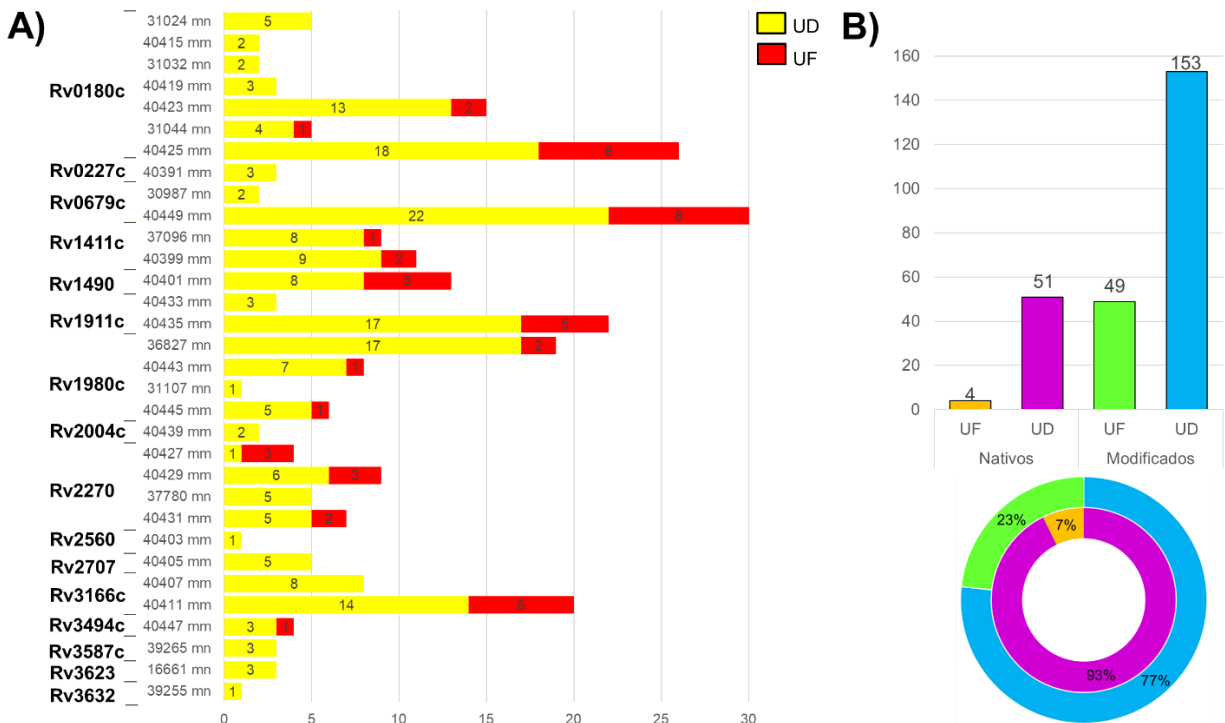


Figura 22. Cantidad de uniones de las secuencias peptídicas al MHC-II. **A)** La gráfica de barras muestra la cantidad de uniones calculadas por cada péptido, se encuentra señalado en código de colores: rojo para uniones fuertes (30) y amarillo para las uniones débiles (UD). **B)** Distinción de la cantidad de uniones totales para las secuencias nativas y modificadas, en la gráfica circular se observa el porcentaje de cada una de las secuencias. Las abreviaturas de los péptidos corresponden a: monómero nativo (mn), monómero modificado (mm), polímero nativo (pn) y polímero modificado (pm).

Luego de este análisis *in silico* se cotejaron los resultados de unión alélica MHC-II (DRβ1) a 36 donantes genotipificados (resultados obtenidos de hystogenetics) para poder determinar si existía una unión alelo-específico dependiente del péptido a evaluar. De los cuales, se seleccionaron 16 donantes, debido a que en estudio previos en el grupo de investigación se les había aplicado la prueba diagnóstico de TB: PPD (derivado proteico purificado de *Mtb*) con la intención de saber si habían estado expuestos a micobacterias; por lo tanto, se separaron las personas en dos grupos: **(G1)** los que habían estado en contacto con *Mtb* y **(G2)** los que no reaccionaron o no mostraron respuesta a las pruebas aplicadas, las cuales se denominaron como donantes no expuestos a micobacterias (**Tabla 2**). En el primer grupo de donantes se encuentran 6 personas que son reactivas (PPD+) y en el segundo, 10 donantes que hacen parte del grupo negativo (PPD-). Se determinó un total de 96 uniones al CMH-II, 82 débiles y 14 de tipo fuerte; los donantes que presentaron mayor cantidad de acoples en el ensayo *in silico*, con 13 y 12

uniones cada uno, fueron los identificados con los códigos 18 y 28 respectivamente, y quienes pertenecen a los dos grupos de estudio (**Tabla 2**).

Tabla 2. Comparación Alelo-péptido específico de unión al MHC-II por parte de donantes genotipificados. Se muestra % Rank de los péptidos que presentaron unión al alelo del donante genotipificado (Tipificación HLA-DRB1 mediante el exón 2, cromosoma 6).

Donante	Alelo	RV0180c					RV0227c	RV0679c	RV1411c	RV1490	RV1911c	RV1980c			RV2004c	RV2270		RV2560	RV2707	RV3166c	RV3494c	RV3623					
		31024 mm	40415 mm	40423 mm	31044 mm	40425 mm	40391 mm	40449 mm	37096 mm	40399 mm	40401 mm	40433 mm	40435 mm	31107 mm	40445 mm	36827 mm	40443 mm	40439 mm	40427 mm	40429 mm	37780 mm	40431 mm	40403 mm	40405 mm	40407 mm	40411 mm	40447 mm
19	01:01	F																									
22,25,29,29	01:02	F																									
27	01:03	NF																									
12,27,28	03:01	F																									
28	04:02	F																									
17,20	04:05	F																									
22,23,25,26	04:07	F																									
17	04:11	NF																									
23	07:01	F																									
15	07:11	NF																									
16	08:02	F																									
20	10:01	F																									
18	11:02	F																									
13,19	11:04	F																									
16	13:02	F																									
26	13:03	F																									
11	13:05	F																									
13,15	14:02	NF																									
11	15:01	F																									
12	15:03	F																									
18	16:02	NF																									

Abreviaturas: (F) alelo frecuente; (NF) alelo no frecuente; (mn) monómero nativo, (mm) monómero modificado, (pn) polímero nativo y (pm) polímero modificado. En azul la unión débil del péptido modificado, morado la unión débil del péptido nativo y en verde unión fuerte del modificado al MHC-II. Los donantes que pertenecen al grupo positivo (PPD+) son 13, 15, 16, 25, 27 y 28; y los considerados como no expuestos (PPD-) son: 11, 12, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26 y 29.

Del total de péptidos evaluados los donantes con prueba PPD+ presentaron unión a 5 péptidos nativos (**16661, 31024, 31044, 36827 y 37096**) y 19 modificados (**40391, 40399, 40401, 40405, 40407, 40411, 40415, 40423, 40425, 40427, 40429, 40431, 40433, 40435, 40439, 40443, 40445, 40447 y 40449**). Por otra parte, los donantes PPD- tuvieron unión a 7 péptidos nativos, además de los ya mencionados a **31107 y 37780**; en cuanto a las uniones a péptidos modificados se evidencio adicionalmente que presentaban unión a 17 péptidos exceptuando a **40443, 40445, 40439** (**Tabla 2 y Figura 23**).

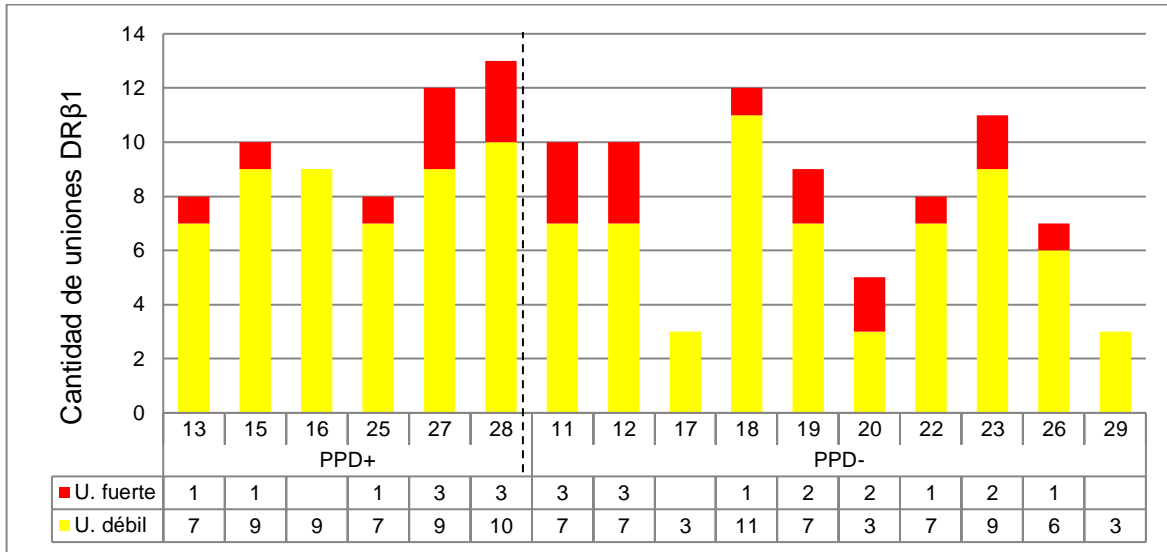


Figura 23. Pronóstico de unión al MHC-II por cada uno de los donantes. Cantidad de uniones débiles (amarillo) y fuertes (rojo) pronosticadas para los donantes que conforman cada grupo.

6.9 Evaluación de la antigenicidad de péptidos sintéticos de *Mtb*

Por otra parte, se hizo necesario evaluar si los 61 péptidos de las 13 proteínas seleccionadas eran reconocidos por sueros de los donantes clasificados como tuberculosis activa (TBA), e estado de latencia (PPD+) o donantes sanos (PPD-), el ensayo de la ELISA mostró que tanto las personas que han estado en contacto con micobacterias, de las que no han estado, reconocen a los péptidos pues la señal del ensayo leído a 450 nm está por encima del control negativo en ausencia del antígeno (PBS 1x) 0.0487.

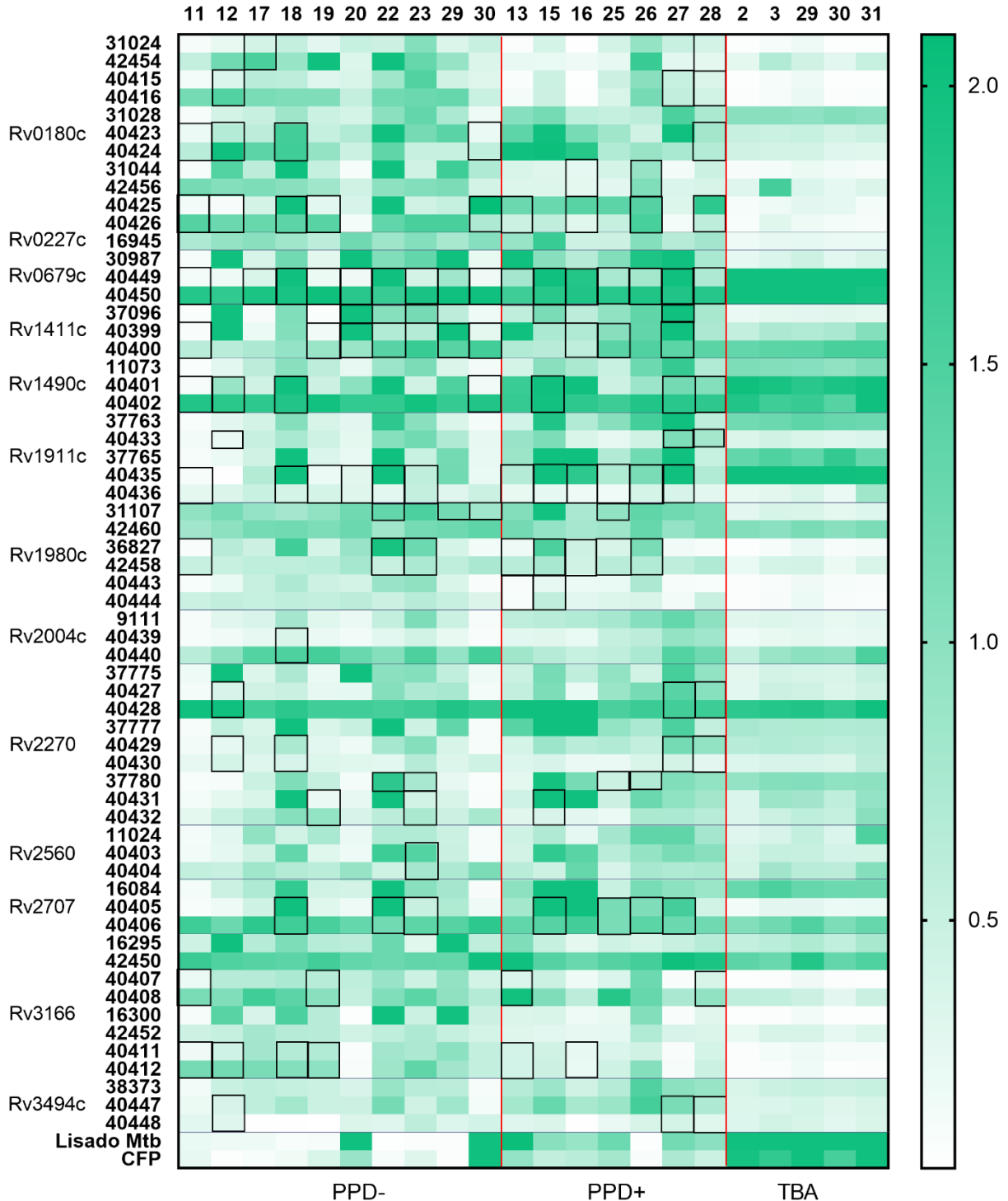


Figura 24. Reconocimiento antigénico de los péptidos que conforman a las proteínas por los donantes. La figura muestra la antigenicidad evaluada para cada péptido en secuencias monoméricas nativas CHABPs seguido de las secuencias modificadas mHABPs y sus formas poliméricas todo de manera individual, el recuadro negro señala que el péptido por la predicción *in silico* de unión al alelo que codifica para el MHC-II de cada donante. Se utilizó como control negativo PBS1X, y como control positivo se usó el lisado de *Mtb* obtenido por sonicación de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y las proteínas liberadas por la *Mycobacterium tuberculosis* al medio Sauton (CFP) como antígeno.

En una escala de 0 a 2 absorbancia a 450 nm, lo que se observa es el promedio de un triplicado. Gráfica realizada en GraphPad Prism v.7.0.

Los datos obtenidos mostraron por el análisis de Kolmogorov-Smirnov una normalidad, para lo cual fueron sometidos a un análisis de ANOVA de una sola vía y un análisis múltiple de comparación Tukey's con la intención de evaluar la existencia de diferencia entre las poblaciones analizadas en este ensayo (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0,0005$). De los 61 péptidos analizados, 30 definidos como: **Rv0180c** (42454, 40415, 31028 y 40423); **Rv1411c** (37096, 40399 y 40400); **Rv1490** (40402) **Rv1911c** (37763, 40433, 37765 y 40436); **Rv1980c** (42460 y 36827); **Rv2004c** (40440); **Rv2270** (37775, 40428, 37777, 40429, 40430, 37780, 40431 y 40432); **Rv2560** (11024, 40403 y 40404); **Rv2707** (16084); **Rv3166c** (16295 y 42450) y **Rv3494** (40448), no presentaron diferencia significativa entre los tres grupos evaluados.

Sin embargo, hubo diferencia significativa entre los grupos PPD- vs TBA: **Rv0280c** (31024*, 40416*** y 31044*); **Rv0227c** (16295***); **Rv0679c** (40449**); **Rv1490** (11073* y 40401*); **Rv1911c** (40435**); **Rv1980c** (31107***, 42458***, 40443*, 40444***); **Rv2707** (40406*); **Rv3166c** (40407**, 40408*, 16300*, 42452**, 40411** y 40412 ***). Para los grupos comparados PPD-/PPD+ se definió la significancia de los péptidos: **Rv0180c** (40416** y 42456*); **Rv1980c** (40444**); **Rv2004c** (9111* y 40439**); **Rv2270** (40427*); **Rv3166c** (42452** y 40412*) y **Rv3494c** (38373* y 40447**). Finalmente, cuando se compararon los grupos PPD+ vs TBA se identificó una significancia para: **Rv0180c** (40424* y 40425*); **Rv0227c** (16295**); **Rv0679c** (30987* y 40450*); **Rv1980c** (31107***, 42458*** y 40444*); **Rv2004c** (9111** y 40439*); **Rv2270** (40427*); **Rv2707** (40405*); **Rv3166c** (40408**) y **Rv3494** (40447**).

Para el caso de los controles positivos, el lisado de *Mtb* solo presentó diferencia significativa entre (PPD- vs TBA)**, en cambio las proteínas de CFP mostraron diferencias significativas entre los grupos (PPD- vs TBA)*** y (PPD+ vs TBA)***.

6.10 Obtención de células dendríticas a partir de PBMCs

En esta aproximación del uso de células dendríticas para potencializar el reconocimiento de los péptidos HABPs a los linfocitos y definir su papel en el control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, fue necesario estandarizar la concentración mínima necesaria para poder

transformar los monocitos a dendríticas. Para ello se evaluaron diferentes concentraciones (n= 5 tratamientos) del coctel estándar de maduración definido por las citoquinas IL-4 y GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocítico macrófago), tomando como parámetro mayor la concentración reportada por [Irshad Ahmed, et al., 2015 \(156\)](#), que fueron 20 ng/mL de IL-4 y 40 ng/mL de (GM-CSF). Para estandarizar la técnica se emplearon 2 donantes, y 5 tratamientos a diferentes concentraciones, manteniendo una proporción 1:2 de las citoquinas mencionadas (**Figura 25**, panel **A**); se estableció que se requiere de 3 pulsos/semana de 1,25 ng/mL de IL-4 y 2,5 ng/mL de GM-CSF para la completa transformación a dendrítica (**Figura 25 A**), tomando como positiva en esta transformación la disminución de CD14 y un equilibrio variable entre las co-estimuladoras CD80 y CD86 (**Figura 25 B**).

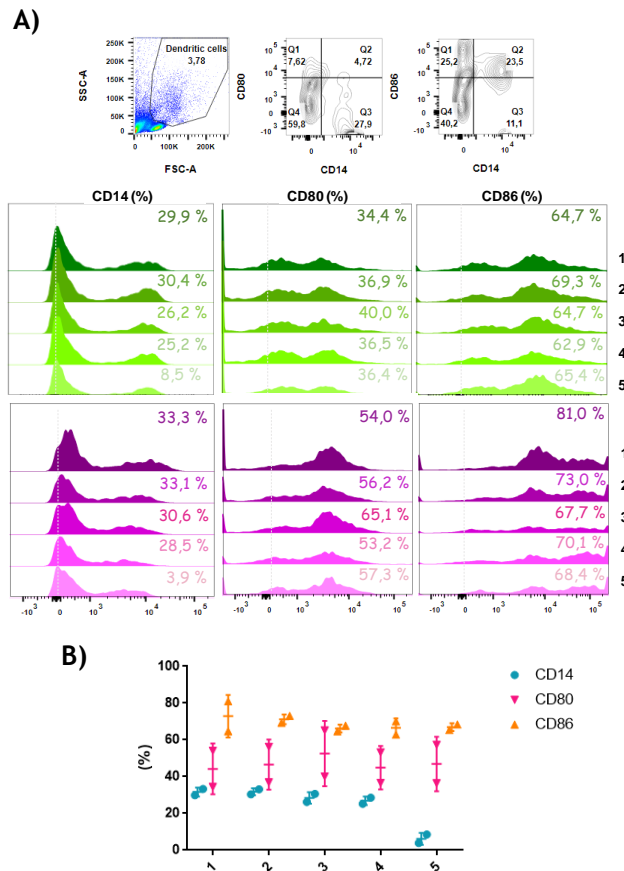


Figura 25. Estandarización de las concentraciones requeridas para optimizar el cambio de fenotipo a dendrítica a partir de monocitos. Panel **A)** se muestran los resultados de la expresión de CD14, CD80 y CD86 a partir de los 5 tratamientos: **1.** 20 ng/mL IL-4 y 40 ng/mL GM-CSF; **2.** 10 ng/mL IL-4 y 20 ng/mL GM-CSF; **3.** 5 ng/mL IL-4 y 10 ng/mL GM-CSF; **4.** 2,5 ng/mL IL-4 y 5 ng/mL GM-CSF y **5.** 1,25 ng/mL IL-4 y 2,5 ng/mL GM-CSF. Gráfica realizada en FlowJo V10. En **B)** se observa de manera resumida la variación de CD80 y CD86, mostrando la diferencia de la expresión de estas moléculas entre los donantes, como también la baja señal para CD14. Gráfica realizada en GraphPad Prism v.7.0.

Por otra parte, se llevó a cabo el análisis del estado morfológico y fenotípico de la transformación de las células dendríticas derivadas a partir de monocitos en sangre periférica ($_{mo}CD$) de 16 donantes, evaluado desde 0-9 días; como también su relación con la capacidad fagocítica y migratoria (**Figura 25**). En principio, los monocitos aislados por gradiente de Ficoll, fueron cultivados en una concentración de 3×10^5 células/500 μ L en cajas de cultivo de 24 pozos con RPMI 1640 al 10% de PA, a condiciones estándar 37°C y 5% CO_2 ; durante 5 días y en presencia de 2,5 ng/mL de GM-CSF y 1,25 ng/mL de IL-4, fueron pulsadas y transformadas en CD (**Figura 25 A y B**). Este tiempo fue suficiente para observar el cambio del fenotipo de monocitos pasando a macrófagos y obteniendo finalmente células dendríticas inmaduras, factores que se evaluaron mediante microscopía y marcación de moléculas de superficie CD14, CD80, CD86, HLA-II, CD11c y CD1c (**Figura 26**).

Las células refractantes que se observaron bajo el microscopio a 40X permitieron apreciar que los monocitos tienen una morfología esférica; que luego de 3-5 días presentaron un alargamiento en forma de aguja característico de macrófagos (**Figura 26B**). Por otro lado, los monocitos que se sometieron al pulso con el coctel estándar de maduración para la obtención de dendríticas permitieron observar que las CDs eran de forma circular hasta el 3 día y luego hasta el día 7 adquirieron una forma alargada muy similar a los macrófagos, además se evidenció la presencia de pseudópodos cortos (**Figura 26B**) y expresan altos niveles de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y HLA-II (**Figura 26**). La distinción entre el perfil maduro e inmaduro de la célula dendrítica se evaluó mediante la captación del antígeno; para ello se realizó la marcación de dendríticas para núcleo, membrana y el péptido 16661 (Rv3623); lo cual mostró que en el día 7 pasadas 24 horas desde el primer pulso con el péptido-rodamina tiene mayor captación de procesamiento del péptido por las células inmaduras con respecto a las maduras que se sometieron primero con LPS (10 ng/mL) y luego puestas en contacto con el péptido (**Figura 26C**). Para que exista dicho procesamiento antigénico por parte de células presentadoras, se ha reportado que requieren de la liberación de proteasas al medio circundante para su activación en la fagocitosis, una actividad que fue evaluada por zimograma, lo cual arrojó que por debajo de 25 kDa no hay una diferencia entre el macrófago y la CDi, y solo a <10 kDa el macrófago presentó una actividad, lo cual hace que exista una diferencia entre el perfil de proteasas que requieren las células presentadoras para el adecuado procesamiento del antígeno (**Figura 26D**).

La migración o desprendimiento (menor adherencia) de las células dendríticas en la monocapa se evaluó mediante la expresión de marcadores de superficie CD14, CD80, CD86 y HLA-II, lo cual mostró que la porción celular desprendida (color amarillo, **Figura 26E**) tiene un mayor CD14- que las adheridas (color naranja, **Figura 26E**), incluso esta fracción fue la más representativa en masa con respecto a las adheridas, también se apreció una regulación en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 y una elevación en la membrana de HLA-II. Por eso nosotros consideramos este fenómeno como una capacidad de la presentadora para migrar a cumplir su rol en los órganos secundarios donde activara a los linfocitos y consigo desencadenar una respuesta inmune (**Figura 26E**).

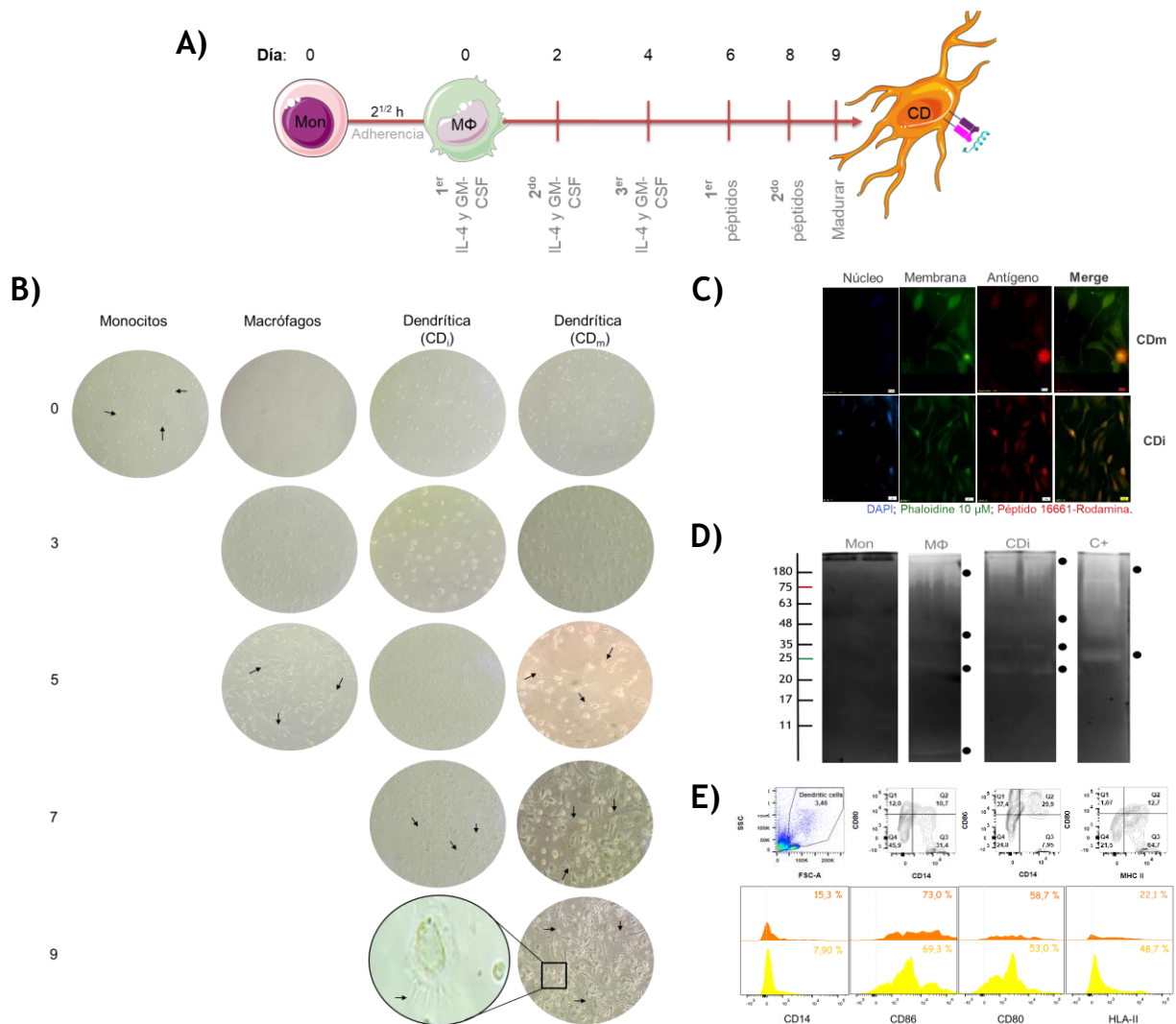


Figura 26. Inducción de la diferenciación de las células dendríticas a partir de PBMCs. A) Esquema empleado para la inducción y obtención de células dendríticas con la concentración estandarizada del coctel de maduración

(1,25 ng/mL de IL-4 y 2,5 ng/mL de GM-CSF). **B)** Fotografías de monocitos, macrófagos y células dendríticas (maduras e inmaduras) evaluadas desde el tiempo 0-7 días; las flechas indican las estructuras morfológicas de las células evaluadas. **C)** El cambio drástico en la morfología de la dendrítica en sus dos fases, se asocia a la absorción del antígeno, particularmente el fenotipo de CDi tiene mayor captación del antígeno (péptido 16661) con respecto al perfil maduro. Fotografía tomada en un microscopio de fluorescencia Ref Olympus BX51 a 100X. **D)** La zimografía permitió evaluar la actividad proteasa, una característica activa en macrófagos y dendríticas. Como control positivo se colocó la serin-proteasa tripsina. **E)** Evaluación del perfil dendríticas CD14, CD80, CD86 y HLA-II, en células adheridas (color naranja) y en suspensión (color amarillo) de la caja de cultivo. Gráfica realizada en GraphPad Prism v.7.0.

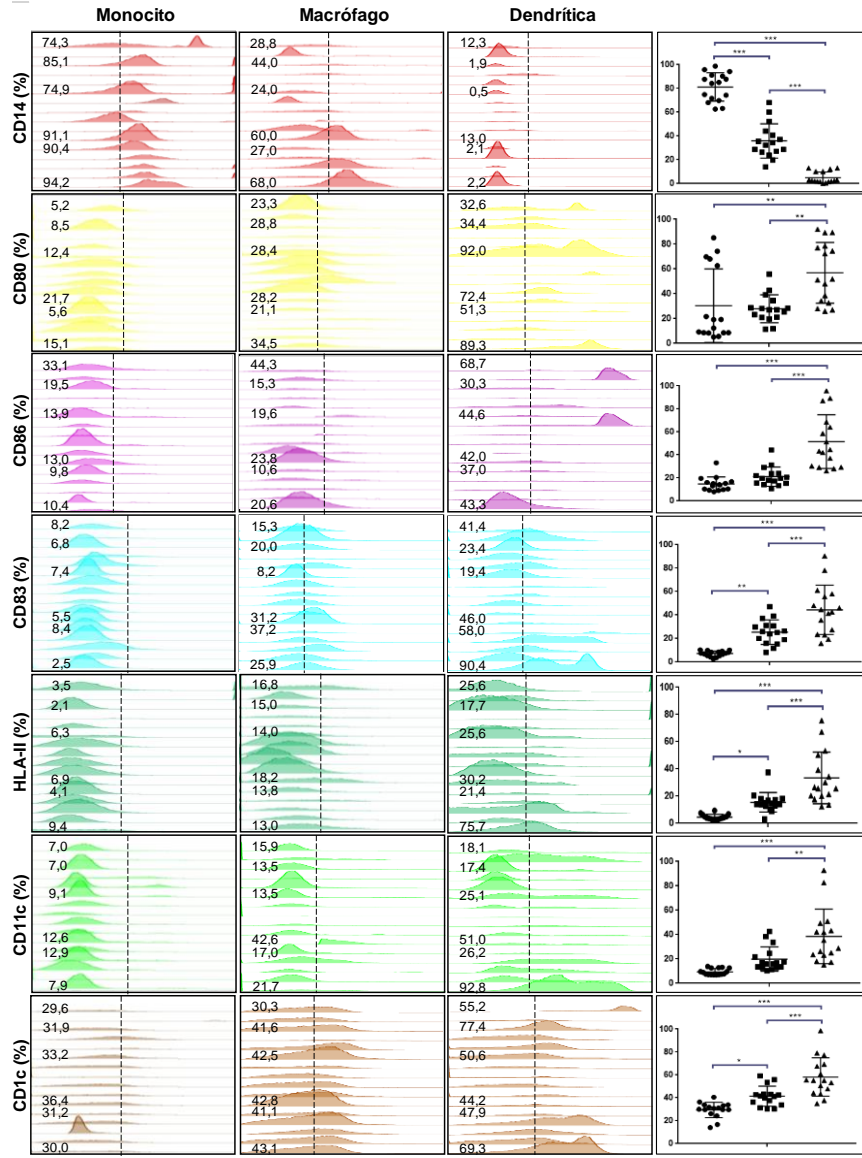


Figura 27. Inducción del cambio de fenotipo para la formación de células dendríticas en los donantes analizados. A 16 personas se les tomó una muestra de sangre para aislar PBMCs, y a causa de un pulso de citoquinas se transformaron en CD, las cuales se evaluó el cambio de monocito a dendrítica a partir del porcentaje (%) de CD14, CD80, CD86, CD83, HLA-II, CD11c y CD1c; también se muestra un resumen del cambio fenotípico de las células. Los datos sometidos a un análisis de ANOVA de una sola vía y un análisis múltiple de comparación Tukey's, mostraron la significancia entre monocito (●), macrófagos (■) y dendríticas maduras (▲) * p<0.05; ** p<0.005; *** p<0,0005. Gráficas realizadas en FlowJov.10.

En resumen, previamente demostramos que al aumentar la cantidad de pulsos por semana de la concentración estandarizada de citoquinas IL-4 (1,25 ng/mL) y 2,5 ng/mL de GM-CSF en el cultivo celular (**Figura 26A**), permitió al 7 día apreciar una disminución en CD14 y la regulación en la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80/CD86), una característica propia del perfil inmaduro de células dendríticas (**Figura 26**). Al adquirir un fenotipo inmaduro se procedió a dar dos pulsos consecutivos de péptidos sintéticos (10 µg/ml) previamente clasificados dependiendo del alelo que acopla para MHC-II de cada donante, todos los ensayos planteados de manera individual (**Figura 27**). Pasado el pulso de péptido se procedió a la maduración de las células con LPS a 10 ng/mL; se observó en los 16 donantes un mismo patrón significativo en la reducción de CD14 (***p*<0,0005), una elevación considerable en la expresión del cluster de diferenciación CD80, CD86 y CD83 (***p*<0,0005), también se apreció una elevación en la expresión del MHC clase II (**Figura 27**); y se asoció la capacidad de captación del antígeno de la dendrítica formada por la evaluación de CD11c y CD1c (**Figura 27**). Por otra parte, las CDm indujeron significativamente la secreción de IL-12p35 y de IL-10 de manera representativa para ambos grupos de estudio (**Anexo 3**).

6.11 Evaluación de la expansión clonal de linfocitos

Por otra parte, se llevó a cabo la determinación de la expansión clonal de células reactivas a los HABPs tanto conservados como modificados en sus formas (monómero y polímero), usando PBMCs completos de los donantes seleccionados, con la intención de determinar una respuesta basal para luego comparar con el tratamiento empleando las células dendríticas. En resumen, se pusieron en contacto los PBMCs con los antígenos (100 µg/mL) a los cuales presentaba unión cada donante y se cuantificó el índice de proliferación mediante el programa FCS Express V.7. Como control positivo de linfoproliferación se usó el mitógeno PHA a 10 µg/mL, estímulo al cual respondieron todos los participantes (**Figura 28**). Se determinó que el uso de PHA a 10 µg/ml para los ensayos de marcación con CFSE dio una proliferación significativa, ya que todos los donantes tuvieron un IP mínimo de 4 y un máximo de 12.4. Por otra parte, tomamos como control células sin contacto con antígeno y así establecer la proliferación basal, parámetro clave para considerar a partir de los resultados que un IP>1,75 es significativo para indicar que hubo una expansión clonal.

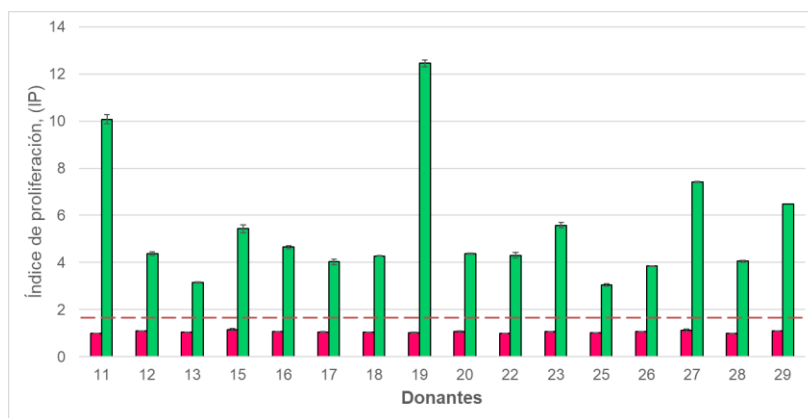


Figura 28. Índice de proliferación por acción del mitógeno PHA. La gráfica muestra linfocitos estimulados con PHA (96), comparados con aquellos que no estuvieron en contacto con algún antígeno (control negativo, color fucsia). La línea punteada que se extiende sobre el eje independiente es el valor $IP=1,75$, límite para la determinación de proliferación celular.

En el grupo de donantes conformado por 10 personas (superíndice) que no son reactivas a la prueba diagnóstico contra TB (PPD-), se observó respecto al índice de proliferación 4 péptidos nativos que superaron el umbral: Rv1911c (37765^{D20}); Rv1980c (36827^{D11}); Rv2004c (9111^{D18}); Rv2270 (37777^{D18}). Por el contrario, los péptidos modificados en el mismo grupo, mostró que 5 superaron el umbral: Rv0180c (40425^{D12}) Rv1411c (40399^{D19,20}; 40400^{D20}); Rv1911c (40435^{D20}, 40436^{D20}) **Figura 29**. Por otra parte, el grupo PPD+ conformado por 6 donantes, mostró en la respuesta basal que el péptido nativo identificado con el código **36827** supero el umbral en 4 de los 6 donantes quienes presentaban pronóstico de unión (alelos: 04:07, 08:02, 14:02) (**Figura 29**). Y respecto a los péptidos modificados, no se evidencia proliferación en ninguno de los donantes PPD+ analizados.

Luego de haber realizado el control basal; células dendríticas obtenidas de cada uno de los donantes se pulsó con los péptidos según correspondía a su alelo MHC-II (**Tabla 2**), para luego colocar en una proporción 1:10 linfocitos marcados con CFSE, pasados 3 y 5 días se evaluó la proliferación debido a la disminución de la fluorescencia mediante el software FCS Express V.7. Cabe la pena mencionar que, para distinguir entre el péptido nativo o modificado, se consideró montar el homólogo, sin importar no presentara unión calculada por el servidor NetMHCII pan 4.0 (**Figura 29**).

Entre los dos grupos, las 13 proteínas evaluados en el análisis *in silico* con cada donante, muestra que péptidos de las proteínas Rv2004c y Rv2560 no presentaron unión a ningún alelo de los 6 donantes positivos y por consiguiente no se tienen resultados de proliferación para estos péptidos. Para el caso en particular en el grupo PPD- los donantes 11, 17, 20 y 23 presentaron una proliferación del 100 % a todos sus péptidos ya fuese al 3 o 5 día, en ese orden: el donante (D) 20 solo presentó IP al 5 día; el donante 22 un total de IP= 95,24 %, para el donante 18 un IP= 93,1 %, mientras que se presentó un 85 % para el donante 26 y un 37 % para los donantes 12 y 19. El donante 29 no presentó IP para ninguno de los péptidos de unión a sus alelos, el mayor dato de IP obtenido en este grupo corresponde al D12 (IP= 11.12) contra el péptido nativo **31028** evaluado al 3 día (**Figura 29**).

En el grupo PPD+ el donante 15 presentó un 100 % de IP para todos los péptidos que se unen a sus alelos no frecuentes en su mayoría al 5 día; seguido con un IP mayor fue para el donante 27 con un 76,7 %, el donante 13 mostró un IP=59 % para sus péptidos y el donante 16 mostro un 34,78 % de proliferación para los péptidos analizados. Por otro lado, el D25 solo mostró solo un 5% de IP para los péptido-alelo específico y finalmente el donante 28 no generó un IP para ninguno de los péptidos a los que presentaba unión (**Figura 30**).

Finalmente, a partir del ensayo de expansión clonal 162 resultados positivos definidos como: (**G1**) PPD+ 14 péptidos al 3 día (3 nativos y 11 modificados) junto con 60 péptidos al 5 día (27 nativos y 33 modificados); mientras para el (**G2**) PPD- 22 péptidos al 3 día (9 nativos y 13 modificados) y 66 péptidos al 5 día (25 nativos y 41 modificados), fueron dispuestos para el ensayo de *co-cultivo*.

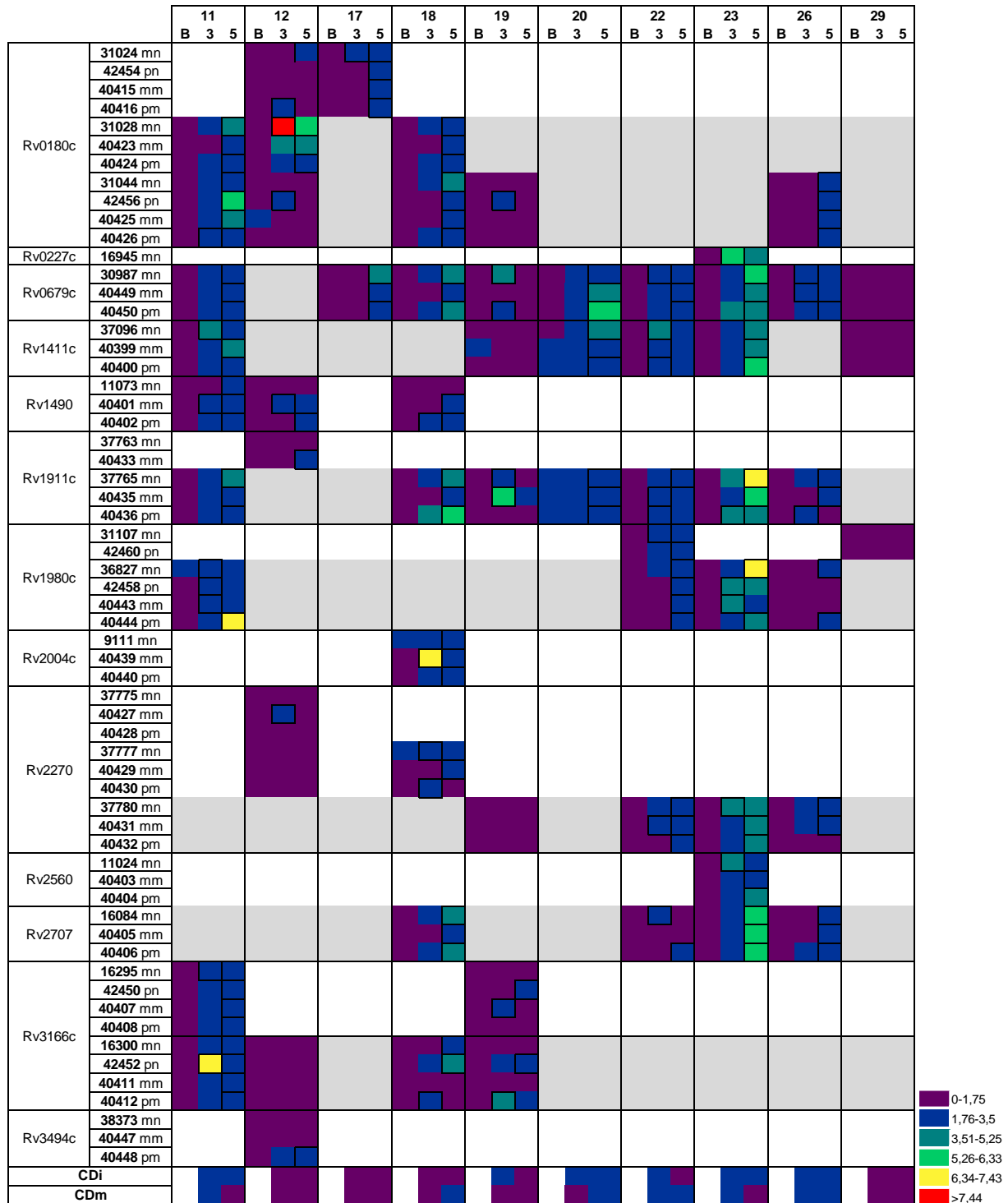


Figura 29. Índice de proliferación de linfocitos de donantes PPD- en respuesta a péptidos sintéticos nativos y modificados de *Mtb*. La gráfica muestra la respuesta inmune celular evaluada por la capacidad de expansión clonal por parte de los donantes contra HABPs. La escala de colores muestra el IP evaluado por cada donante al 3 o 5 día, la B señala el análisis basal obtenido por contacto del antígeno con PBMCs. En el recuadro negro se resalta el péptido con mayor IP, lo que se observa es el promedio de un triplicado.

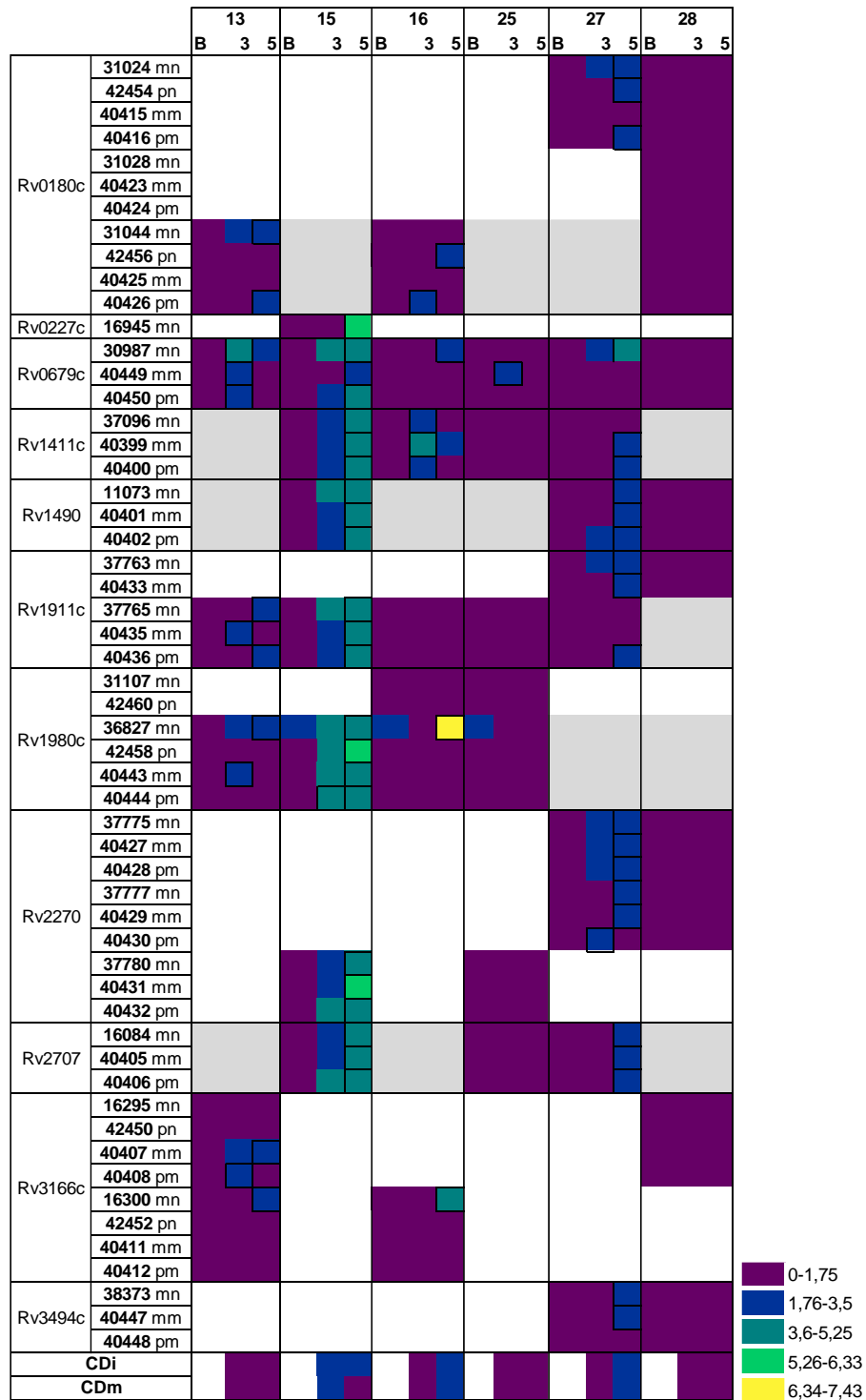


Figura 30. Índice de proliferación de linfocito de donantes PPD+ en respuesta a péptidos sintéticos nativos y modificados de *Mtb*. La gráfica muestra la respuesta inmune celular evaluada por la capacidad de expansión clonal por parte de los donantes contra HABPs. La escala de colores muestra el IP evaluado por cada donante al 3 o 5 día, la B señala el análisis basal obtenido por contacto del antígeno con PBMCs. En el recuadro negro se resalta el péptido con mayor IP, lo que se observa es el promedio de un triplicado.

6.12 Identificación del tipo de memoria inmunológica generada por la expansión clonal de linfocitos

En esta fase fue de interés en particular evaluar qué tipo de población celular se generó a causa del estímulo de las dendríticas pulsadas con los péptidos alelo-específico de cada donante, se escogieron aquellos que superaron un valor de proliferación superior al umbral ($IP > 1,75$) determinado al 3 o al día 5 (**Figura 29, 30**). Se representan los resultados teniendo en cuenta el porcentaje positivo para la marcación de cada una de las poblaciones mencionadas, en esta aproximación primero se evaluó que tipo de linfocitos se generaron respecto a CD4, CD8 y CD19; para luego medir el tipo de células de memoria con CD62L, CD45RA y CD45RO. Los PBMCs completos (linfocitos sin ningún estímulo) de los donantes seleccionados, se les determinó una respuesta basal para luego comparar con el tratamiento empleando las células dendríticas (**Figura 31**).

Respecto, al tipo de población generada a causa del estímulo peptídico, el D26 tuvo una mayor población de CD4 respecto a CD8 y CD19 en los dos grupos de péptidos evaluados (nativos y modificados), en este mismo sentido las secuencias nativas del D15 y las modificadas del D23 y D25 presentaron este comportamiento. Por otro lado, se observó no solo un incremento en la población CD4 sino que conjuntamente se elevó la población de CD19, tal fue el caso para: D13 y D18 en ambos grupos de secuencias peptídicas analizadas; este mismo comportamiento lo presentaron los péptidos modificados del D15 y nativos del D20. Aunque no siempre el estímulo peptídico llevo a una respuesta CD4+, para el D23 las secuencias nativas mostraron una elevación en CD8. No obstante, para los D17, D19 y D27 mostraron conjuntamente una elevación en la población CD8 y CD19 en ambos grupos de péptidos analizados, este mismo fenómeno se observó en el D20 para las secuencias modificadas. Por último, se obtuvo un incremento en la población CD19 para el D16 en sus dos grupos de secuencias analizadas.

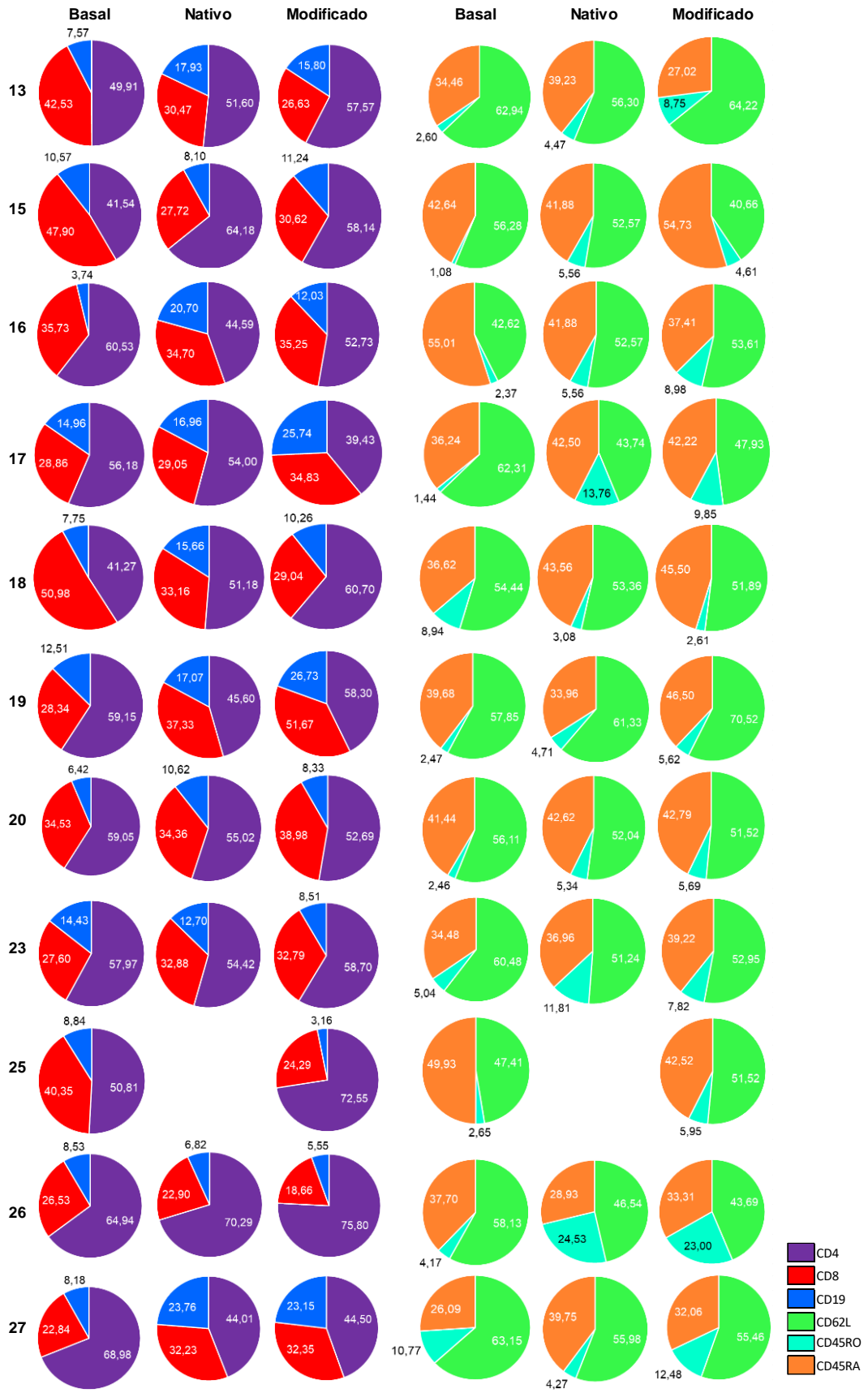


Figura 31. Inducción de células T multifuncionales específicas a péptidos después de la presentación *in vitro* mediada por células dendríticas. Linfocitos estimulados mediante la interacción TCR/pMHC-II específico para cada donante y evaluado al 3 o 5 día, permitió no solo definir porcentaje de células T mediante la selección positiva para CD4, CD8 o CD19, sino evaluar el tipo de memoria generada para estos linfocitos. Los gráficos circulares representan las medias de las células por donante que co-expresan para delimitar el tipo de población linfocitaria (CD4, CD8, CD19); además se evaluó el tipo de memoria causado por el estímulo demarcado por CD45RA, CD45RO y CD62L. Resultados analizados en FlowJov.10.

De manera más resumida, se presentó una alta población CD4+ por encima del control basal para los donantes D13 (40449), D15 (16084, 30987, 36827, 37096, 37765, 37780, 42458, 40399, 40400, 40402, 40405, 40406, 40431, 40435 y 40444), D17 (30987), D18 (9111, 16084, 42452, 42456, 40401, 40406, 40426, 40436, 40439, 40440 y 40450), D19 (30987, 42450 y 42452), D20 (40435 y 40436), D23 (40443), D25 (40449); por otra parte, se vio un incremento en la población de CD4+ junto con CD19 para los donantes: D13 (16300, 30987, 31044, 36827, 40408, 40435, 40443 y 40444), D15 (16945, 11073, 40401, 40432, 40436, 40443 y 40449), D16 (16300), D17 (31024, 40415 y 40449), D18 (16300, 30987, 31028, 31044, 37765, 37777, 40412, 40423, 40424, 40425, 40429, 40430, 40435 y 40449), D19 (40407, 40412, 40426 y 40435), D20 (30987, 37096, 37765, 40399 y 40449), D23 (11024, 36827 y 37765), D27 (16084 y 30987). Sin embargo, también se presentó una elevación de la población CD19 con respecto al control basal para: D13 (37765, 40407, 40426, 40436 y 40450), D16 (40400, 40426, 30987, 31107, 36827, 37096, 40399 y 42456), D17 (42454, 40416 y 40450), D19 (40436, 40450, 37765 y 42456), D20 (40400 y 40450), D23 (16084, 37780, 42458 y 40431), D26 (16084), D27 (31024, 37096, 37763, 37775, 37777, 38373, 42454, 11073, 40399, 40400, 40401, 40402, 40405, 40406, 40416, 40427, 40428, 40429, 40430, 40433, 40436, 40447, 40448 y 40449).

Respecto al refuerzo en memoria inmunológica que podría otorgar el péptido, se evaluaron tres tipos TSCM, TCM y TEM (99-101), siendo las TSCM y TEM las células con memoria a mediano y largo plazo respectivamente, lo que implica que exista una mayor función efectora en contra del antígeno. Para tal caso el D26 no generó una respuesta efectiva en la memoria, siendo para ambos grupos de péptidos analizados una población linfocitaria tipo TSCM, definidas por su alta señal en CD45RA y negativo para CD45RO y CD62L. Caso contrario sucedió con los D16, D18 y D19 que mostraron una población de tipo TCM en ambos grupos, este mismo comportamiento se observa en el D15 (secuencias nativas) y D13 y D25 (secuencias modificadas), esta apreciación debido a un porcentaje mayor en CD62L y CD45RO. Por último, linfocitos tipo TEM al expresar un alto nivel del isotipo CD45RO y negativo para CD45RA y CD62L, que fue

prominente en los D20, D23 y D27 para ambos grupos de péptidos; además este tipo de población fue determinada para D13 (secuencias nativas) y D15 (secuencias modificadas).

6.13 Inhibición intracelular de *Mtb* en macrófagos mediado por linfocitos activados por la interacción TCR/pMHC-II.

Para llevar a cabo el ensayo *in vitro* de *co-cultivo* (**Figura 32A**), fue necesario en principio realizar el cultivo de *Mtb* H37Rv-GFP en medio 7H9 incubándose a 37°C por 30 días. Una vez pasados 7, 15 y 30 días de incubación se realizó control del cultivo con tinción Gram y Zielh Neelsen para verificar la idoneidad, crecimiento y posible contaminación en el cultivo (**Figura 32B**). Luego de cosechar la bacteria *Mtb* H37RV-GFP pasados los 30 días, se calculó el MOI (*Multiplicity of infection*) usando macrófagos de cultivo primario (**Figura 32C**). Se analizaron de manera independiente tres MOIs (5,10 y 20), donde se obtuvo:1:5 (38,86%), 1:10 (49,71%) y por último en 1:20 (59,11%) (**Figura 32C**). Para esta aproximación en el control de crecimiento de la micobacteria por *co-cultivo* se usó el MOI 1:10, considerando que con este alcanza una infección más del 50% en todas las células, además, el aumento de *Mtb* en el MOI, puede repercutir en la viabilidad de la célula hospedera, por tal motivo no se manejó el MOI de 1:20 aunque haya arrojado un mayor porcentaje de invasión. Igualmente, entre el MOI 1:10 y 1:20 no dio una diferencia alta en el porcentaje de infección.

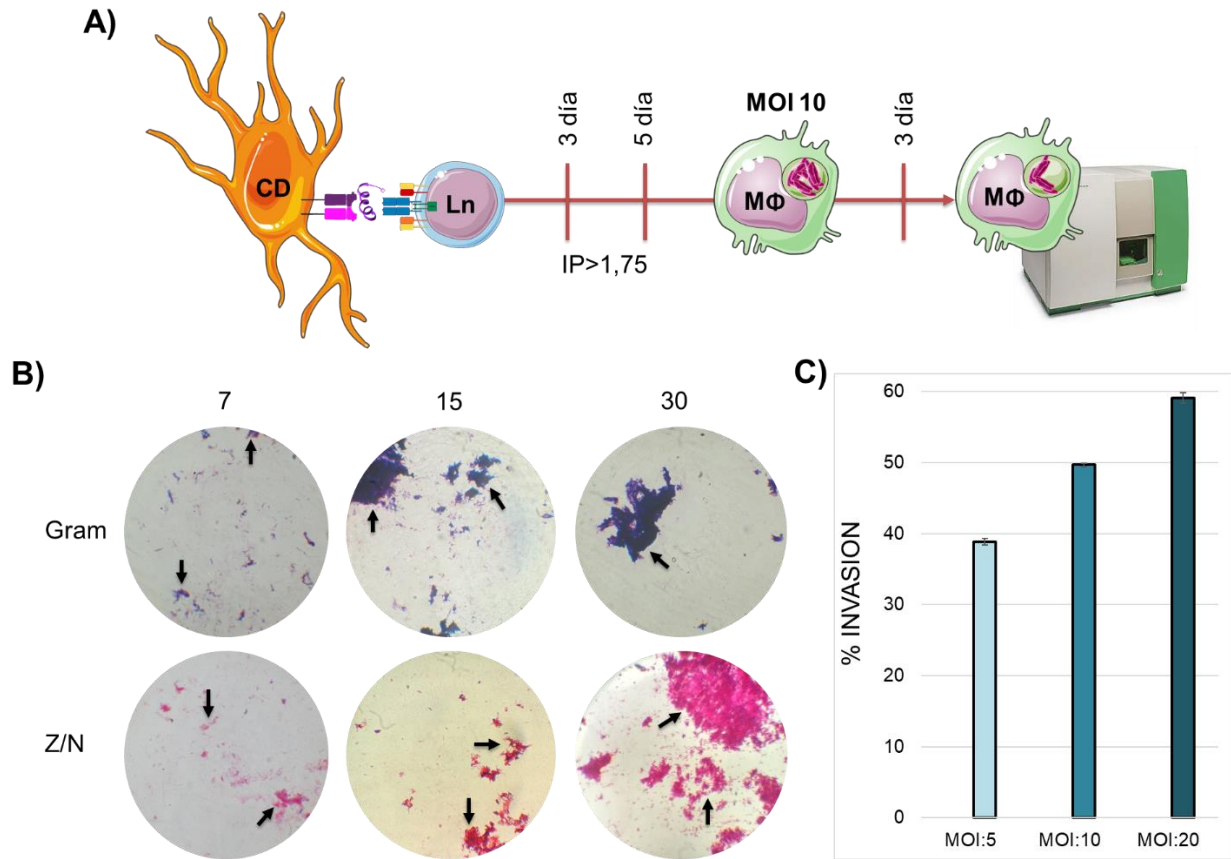


Figura 32. Control del crecimiento e infección por *Mtb* en macrófagos para emplear en el co-cultivo. **A)** Un diagrama esquemático del diseño experimental para el co-cultivo. **B)** Fotografías representativas del control del cultivo de *Mtb* H37Rv para las tinciones Gram y Zielh Neelsen evaluadas desde 7-30 días; las flechas indican la cantidad de carga bacteriana con el tiempo. **C)** Muestra el MOI de infección con respecto a la infección en macrófagos de cultivo primario.

A macrófagos infectados por *Mtb* H37Rv, se les puso en contacto linfocitos con un IP>1,75 denotados al día 3 o día 5, que provenían de la interacción con células dendríticas pulsadas en el MHC-II con péptidos alelo específicos (**Figura 32A**). El co-cultivo permitió evaluar la inhibición del crecimiento intracelular de la micobacteria en macrófagos infectados, mediante la lectura por citometría de flujo (FACS Diva Canto II). Las células incubadas con *Mtb* y linfocitos sin estímulo fueron usadas como control de infección y su valor se tomó como el 100% de la infección para calcular el porcentaje de inhibición en la presencia de los diferentes tratamientos.

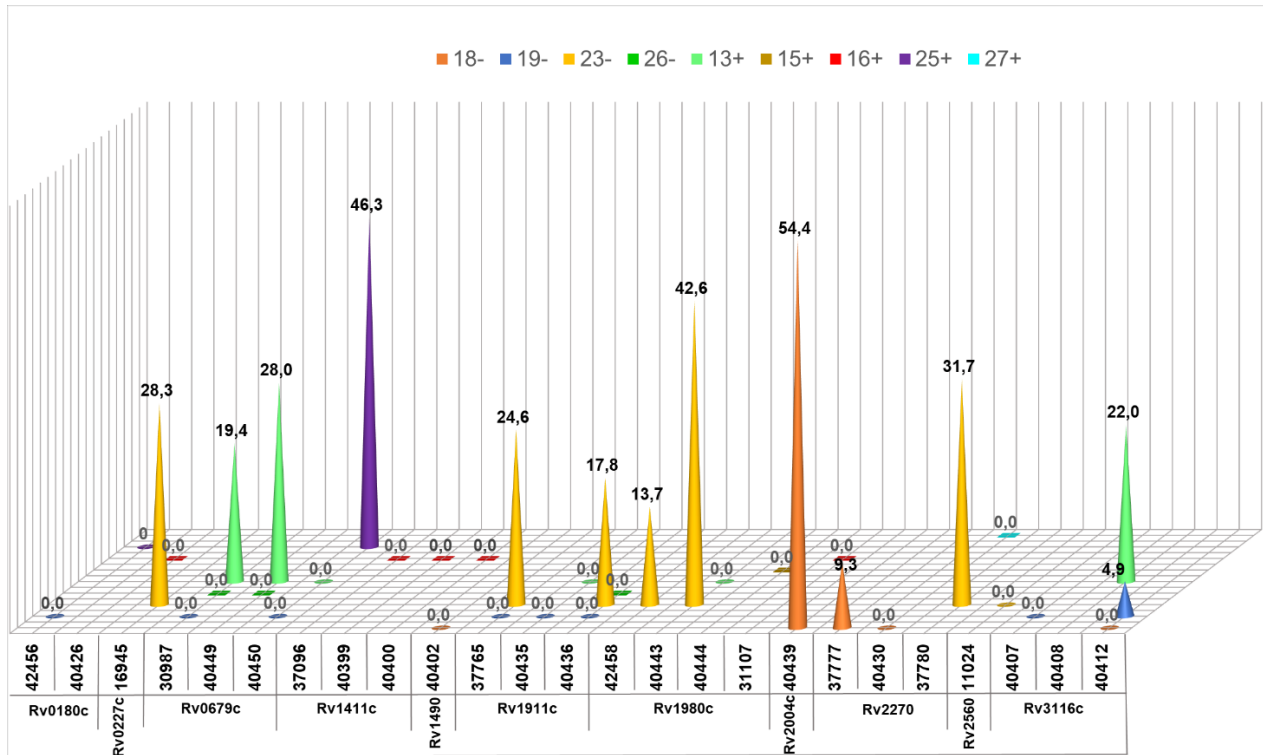
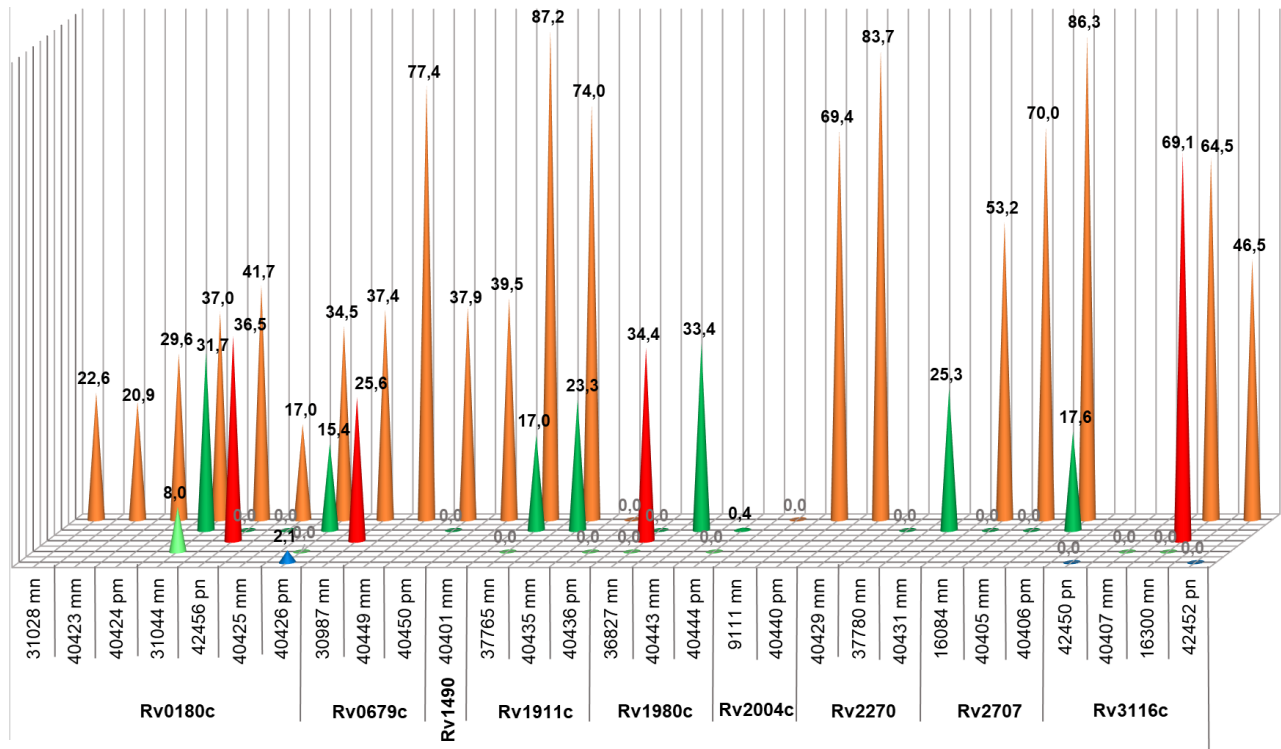


Figura 33. Inhibición intracelular de *Mtb* mediada por linfocitos estimulados al 3 día en el *co-cultivo*. Se propició la inhibición intracelular de *Mtb* H37Rv-GFP en 9 donantes clasificados con diferente color y su porcentaje de inhibición (eje Y) dependiente del péptido alelo específico de cada participante (eje X).

Se propició la inhibición intracelular de *Mtb* H37Rv al 3 día en macrófagos infectados con porcentajes entre 9%-55% en el *co-cultivo* con linfocitos T para los donantes (D) 13, 18, 19, 23 y 25. El péptido modificado monómero **40439** en *co-cultivo* con LT del D18 presentó la mayor inhibición, seguido del péptido **40449** (modificado monómero) con LT del D25; por otra parte, Los LT del D23 presentaron un porcentaje de inhibición de 42,61 % cuando se ha presentado el péptido **40443**. Sin embargo, en esta aproximación para evaluar la inhibición del crecimiento intracelular de *Mtb* en macrófagos, muchos de los linfocitos estimulados por el péptido no lograron inducir el efecto esperado, entre estos, se resaltan: 42456, 40426, 37096, 40399, 40400, 40402, 40435, 40444, 40430, 11024 y 40407 (**Figura 33**).

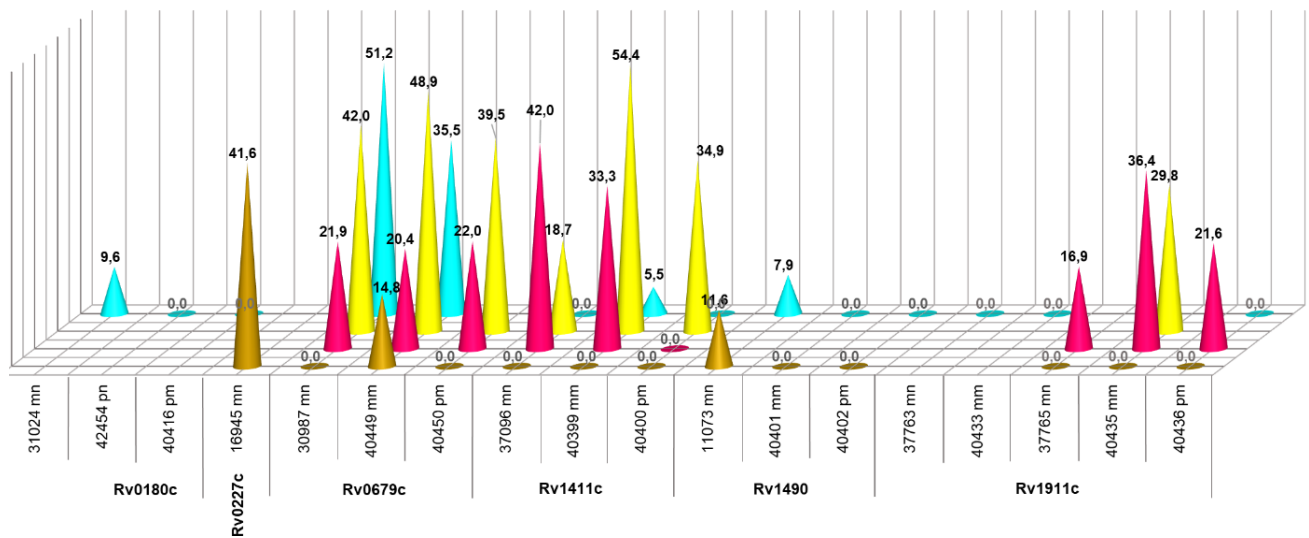
A)

■ 19- ■ 13+ ■ 16+ ■ 26- ■ 18-



B)

■ 15+ ■ 20- ■ 23- ■ 27+



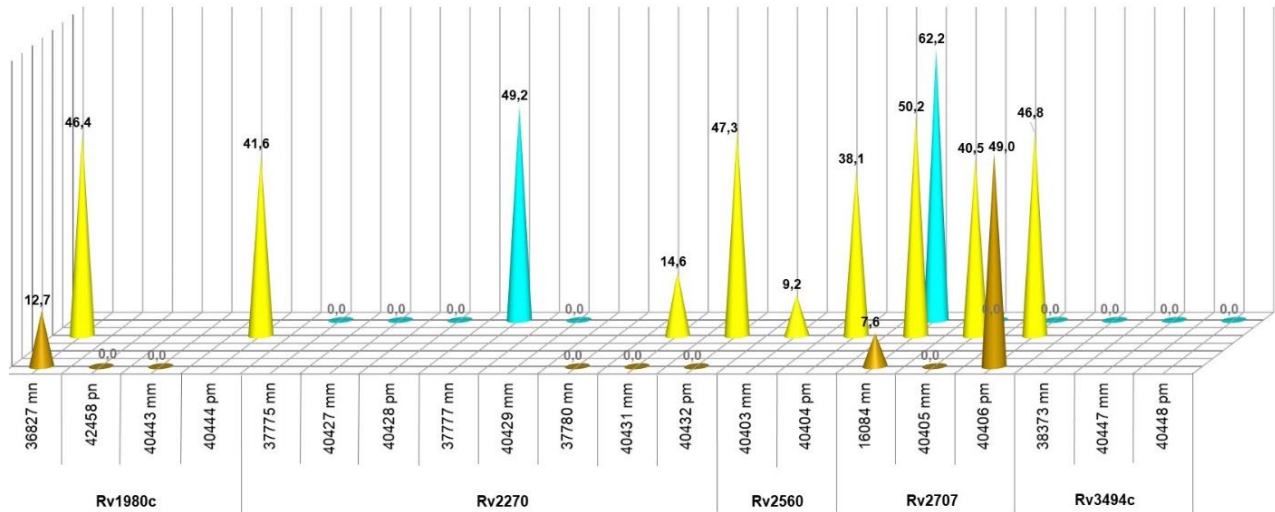


Figura 34. Inhibición intracelular de *Mtb* mediada por linfocitos estimulados al 5 día en el *co-cultivo*. Se propició la inhibición intracelular de *Mtb* H37Rv-GFP en 9 donantes clasificados con diferente color y su porcentaje de inhibición (eje Y) dependiente del péptido alelo específico de cada participante (eje X).

En la **Figura 34 A**, se encuentra los donantes 13, 16, 18, 19 y 26, donde se evidencia la inhibición del crecimiento de *Mtb* H37Rv intracelular al 5 día en macrófagos infectados con porcentajes comprendidos entre el 2% - 88% en el *co-cultivo*. El donante 18 mostro un mayor porcentaje de inhibición entre el 17% - 88% cuando se *co-cultivan* LT que proliferan con varios péptidos. En la **Figura 34 B**, se presenta los donantes 15, 20, 23 y 27, de los cuales se presenta un porcentaje de inhibición entre 5% - 63%. El donante 23 fue el que presento más altas y mayores inhibiciones.

6.14 Evaluación de la producción de anticuerpos en el *co-cultivo* de CDs y linfocitos.

Linfocitos que presentaron expansión clonal por acción directa de la presentación antigénica por las células dendríticas en una relación 10:1, permitió evaluar el tipo de población celular, que identificó para los donantes 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 26 y 27 la presencia de linfocitos B mayor con respecto al control (**Figura 31**); lo cual nos interesó y llevó a la medición de la producción de IgG en ELISA empleando un sistema TMB (3,3',5,5' - tetrametilbenzidina Sustrato de la Peroxidasa). El ensayo de ELISA identificó señal para todas las muestras analizadas, mostró que tanto las personas que han estado en contacto con micobacterias, de las que no han

estado, reconocen a los péptidos pues la señal del ensayo leído a 450 nm está por encima del control negativo en ausencia del antígeno (PBS 1x) 0.0405.

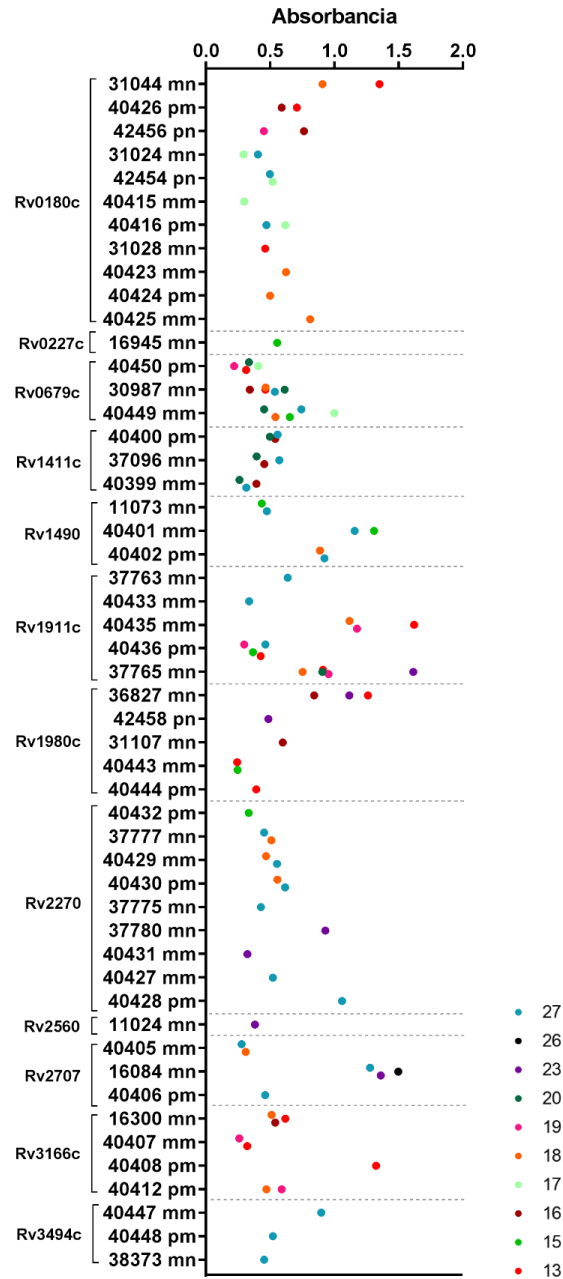


Figura 35. Determinación de anticuerpos IgG en los sobrenadantes del *co cultivo*. Linfocitos expuestos a células dendríticas previamente pulsadas con péptidos permitieron la proliferación de células CD19+ y la producción de Ac específicos a secuencias peptídicas. Se utilizó como control negativo PBS 1X. Las absorbancias están por encima del umbral (0,0405) calculado en ausencia de antígeno. En una escala de 0 a 2 absorbancia a 450 nm, lo que se observa es el promedio de un triplicado. Gráfica realizada en GraphPad Prism v.7.0.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La tuberculosis tiene impacto en la salud pública de todo el mundo y la ineficacia de la vacuna BCG (7-8), hace que la cifra de pacientes diagnosticados con el bacilo tuberculoso se acreciente aún más, por ello la búsqueda de nuevas alternativas vacunales es una necesidad urgente; la investigación llevada a cabo en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia –FIDIC, hace que diseñar una vacuna sintética sea una propuesta prometedora, esta se dirige a controlar la interacción patógeno-hospedero al bloquear receptores específicos mediante el empleo de péptidos sintéticos.

El presente estudio contribuye en la ardua labor de buscar nuevas alternativas de vacunación contra tuberculosis, en FIDIC se buscan secuencias de proteínas, de la envoltura bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis* que estén involucradas en la interacción hospedero-patógeno y puedan incluirse en el diseño de una vacuna multiepitópica sintética contra TB. En este estudio involucramos el estudio de las nuevas proteínas Rv3623 y Rv3632 como candidatas para bloquear interacciones específicas de sus péptidos de alta capacidad de unión (HABPs) con receptores celulares de células blanco de infección (células epiteliales alveolares y macrófagos) para la micobacteria. A pesar de no tener una función establecida, se encontró que los genes que codifican para estas proteínas *rv3623* y *rv3632* están presentes y se transcriben en cepas del complejo tuberculoso MTC (**Figura 11**), además mediante el análisis bio-informático se encuentran en la membrana celular bacteriana lo cual se corroboró mediante el análisis experimental por westerblot e inmunodetección (**Figura 12**). Por otra parte, las secuencias de los HABPs se encuentran conservados en diferentes cepas de referencia y aislados clínicos, que corresponden a diversos linajes reportados para TB (**Figura 10**) (3, 149) ; la homología con cepas del complejo tuberculosis MTC, sugiere que estas proteínas están involucradas en un rol virulento del agente etiológico (**Anexo 1**) (157, 158).

En el caso de la proteína Rv3632 con su peso molecular teórico de 13.1 kDa, mostró un peso de 25 kDa lo cual sugiere puede estar participando en un complejo proteico de alto peso molecular teniendo en cuenta que el análisis en STRING v10.5 muestra que interactúa con las proteínas Rv3629c, Rv3630, Rv3631 y Rv3633, de manera que se co-expresan juntas (**Figura 10, 12 y 13**). Aunque existe el reporte realizado por Skovierová en 2010, donde señala la interacción y un efecto sinérgico en la producción de arabinogalactano entre ppgS ó Rv3631 (26.2 kDa) y Rv3632 (13.1 kDa), conformando un complejo proteico de membrana que llegaría a pesar aproximadamente 39.3 kDa, dejando incierta la conformación del complejo proteico que a la fecha no se ha dilucidado por completo (159).

Al evaluar la capacidad de los HABPs para bloquear el ingreso de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, claramente se observa que los péptidos de las proteínas Rv3623 en la secuencia ²¹Ser-⁴⁰Tyr (16661) y Rv3632 en la secuencia comprendida entre ⁸¹Thr-¹¹⁴Tyr (39255 y 39256), inhiben de manera dependiente de la concentración el ingreso de la micobacteria a la línea celular U937 que corresponde a macrófagos, con una inhibición mayor al 40% a una concentración de 200 μ M, sin tener un efecto citotóxico en dicha interacción. Para el caso de las células epiteliales A549, el HABP 16661 no resultó inhibir, pero en el caso de Rv3632 los péptidos 39255 y 39256 mostraron inhibición no dependiente de la concentración con una inhibición mayor o igual al 30% a 200 μ M, posiblemente esta línea celular se vio afectada por el efecto tóxico de estos péptidos (**Figura 18 y 19**) (157, 158).

En el enfoque bioinformático se predijo la estructura secundaria y terciaria de las proteínas Rv3623 y Rv3632, las cuales tenían similitud según la evidencia experimental obtenida por dicroísmo circular (**Figura 13 y 14**). Al evaluar los elementos estructurales secundarios de los péptidos se observa que predomina una conformación alfa-helical, la cual puede verse modificada mediante el reemplazo específico de aminoácidos en la secuencia original del péptido, para llegar a una estructura tipo poli-prolina que tiene mayor acople al complejo mayor de histocompatibilidad clase II y por consiguiente aumentar características protectoras en la respuesta inmunológica (157, 158). Estudios de resonancia magnética nuclear RMN, darían claridad en la elucidación estructural de estos péptidos.

Se ha descrito la existencia de una respuesta humoral prominente que permite el control durante la infección por *Mycobacterium tuberculosis* durante la fase activa de la enfermedad (1, 160) ; mediante ensayos de ELISA se determinó que los HABPs 16661 (Rv3623), 39254 y 39256 (Rv3632) (que tienen alta capacidad de inhibición de entrada de *Mtb in vitro* > 40%) no presentaron alto reconocimiento por los anticuerpos provenientes de los pacientes con TB; nuestra hipótesis es que estas secuencias al ser conservadas dentro de las cepas de *Mtb* analizadas en este estudio (**Figura 10**), son inadecuadas para provocar un tipo de respuesta protectora de tipo humoral. Estos HABPs muestran un fenómeno al cual se ha denominado y descrito previamente por la FIDIC como silencio inmunológico de antígenos conservados (23), debido a que no existe una relación entre las características de unión de las células A549 y U937 con respecto a la inhibición de la entrada de *Mtb* y la antigenicidad de los péptidos. Por lo tanto, estas secuencias deben ser modificadas con el fin de aumentar su capacidad de presentación por parte del sistema inmunológico del individuo (23, 161). Los pacientes sanos (HD), valorados por la prueba PPD mostraron anticuerpos específicos contra los péptidos de las proteínas (Rv3623 y Rv3632) esto posiblemente se deba a que pudieron estar en contacto con micobacterias ambientales o el simple hecho de haber sido vacunados con BCG, la única vacuna validada y aceptada por la OMS contra *Mtb* que es obligatoria dentro del plan de salud de Colombia. De igual forma el análisis de inmunogenicidad obtenida por ELISA, permitió considerar al péptido 39252 (Rv3632) como candidato a ser incluido en una prueba serodiagnóstico para tuberculosis (TB), debido a que muestra diferencias significativas en poder diferenciar los individuos con tuberculosis latente (TBL) de los pacientes con tuberculosis activa (TBA) y los individuos sanos (**Figura 20**) (157, 158).

En consecuencia, teniendo en cuenta que se requiere evaluar la capacidad de los HABPs para ser reconocidos por el sistema inmune y debido a la existencia del silencio inmunológico por estas secuencias de importancia en el diseño de una vacuna contra TB propuesta por la FIDIC, se hizo necesario en el presente trabajo de tesis el desarrollo de una metodología *in vitro* que permitiera evaluar la antigenicidad e inmunogenicidad de secuencias nativas y modificadas provenientes de *Mtb*. Para esta aproximación, la antigenicidad se evaluó mediante el uso de células dendríticas obtenidas a partir de línea mieloide (monocitos) que lograran presentar los péptidos nativos o modificados a linfocitos; en respuesta al estímulo de la presentación, los linfocitos generados se clasificaron en tipo poblacional y se determinó la memoria inmunológica que se confirió por acción del estímulo, característica necesaria para el origen de una respuesta

protectiva contra *Mtb*. Como se discutirá más adelante, también se planteó evaluar la inhibición de *Mtb* en macrófagos infectados y co-cultivados con linfocitos previamente estimulados por las CDs (MHCp/TCR), para aportar al conocimiento en el desarrollo de una posible vacuna sintética contra TB (162).

Las personas participantes en este estudio presentaron alguno de los 57 alelos más frecuentes en la población mundial (REF alleles frequency). Lo que resulta ser significativo ya que permitió evaluar si los péptidos podrían proteger a la mayor cantidad de población mundial (**Figura 22, Tabla 2**) representada por estos 57 alelos. En los resultados de la predicción *in silico*, de unión entre los péptidos y los alelos de cada donante se observó que las secuencias de péptidos modificados presentaron mayor cantidad de uniones (**75 %**) respecto a los nativos (**25 %**), demostrando que los cambios de los aminoácidos en las secuencias para que se ajusten en los bolsillos 1, 4, 6 y 9 del HLA-II, resultaron en un mejor acople, como se había evidenciado para otros estudios (16-18), siendo estas modificaciones importantes para inducir una respuesta inmunitaria eficaz frente a la micobacteria.

Ahora bien, para las 61 secuencias cotejadas en los donantes por la predicción *in silico* de unión al alelo DR β 1, se les realizó un ensayo de antigenicidad con el fin de identificar si eran reconocidas las secuencias nativas o modificadas por sueros de los donantes clasificados como tuberculosis activa (TBA), en estado de latencia (PPD+) o donantes sanos (PPD-), por ensayo de ELISA. Como resultado se obtuvo que todos los grupos reconocen estas secuencias; donde péptidos modificados como 40401, 40402, 40406, 40428, 40435, 40449 y 40450, presentan absorbancias superiores a 1 unidad, es decir que los donantes que padecen la enfermedad tienen un alto reconocimiento por estas secuencias peptídicas.

Por lo tanto, se hizo necesario incrementar el reconocimiento y consigo la capacidad inmunogénica de las secuencias peptídicas a través del uso de células dendríticas, las cuales se derivaron de manera *in vivo* a partir de precursores mieloides; para ello fue necesario estandarizar las concentraciones de IL-4 (1.25 ng/mL) y GM-CSF (2,5 ng/mL), citoquinas que se usan ampliamente para obtener este tipo de cultivo, esto se realizó en 3 pulsos/ semana (**Figura 26**). No obstante, estas concentraciones se emplearon manteniendo siempre la proporción 1:2 respectivamente de IL-4 y GM-CSF, aunque mucho menor la cantidad usada con respecto a lo que reportan diferentes autores (156, 164-169). En el mismo orden, las células dendríticas

pulsadas con los péptidos mostraron un perfil maduro por la inducción de LPS (10 ng/mL) (156, 165, 169) esto se observó no solo por la observación microscópica (**Figura 26 B**) sino también por la elevación de la expresión de CD80, CD86, HLA-II, CD11c y CD1c, como también la disminución de CD14 con respecto a los fenotipos anteriores (monocitos y macrófagos) (**Figura 26 E y 27**) (167). Por otra parte, se ha descrito que CDm liberan proteasas al medio con la intención de un proceso previo a la fagocitosis para que exista la presentación antigénica, esta capacidad de liberación de proteasas se evaluó en este estudio mediante la zimografía (**Figura 26 D**), lo cual reveló una gama de proteasas a diferentes pesos (kDa) con capacidad de procesar el antígeno (171-173); de igual manera en la caracterización de las CD, se optó por evaluar mediante PCR la presencia o ausencia de IL-10 e IL-12 en donantes PPD+ (13, 15, 16, 25, 27) y PPD- (18, 19, 20, 23, 26), ya que se ha descrito la expresión de la IL-12 permite la activación de la APC en la presentación antigénica al activar la sobre-exposición de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD83, CD86 y CD40; al contrario, una mayor expresión de IL-10, regula la expresión de moléculas de superficie como ICOSL y PDL, lo que conlleva a la supresión de la activación de la célula presentadora, cabe la pena mencionar que las CD provenientes de los participantes mostraron presencia de ambas citoquinas (IL-10 e IL-12) (**Anexo 3**).

Teniendo en cuenta lo anterior, con el fin de determinar si las secuencias peptídicas eran capaces de generar una respuesta inmune celular en los dos grupos de participantes (PPD+ y PPD-), se estableció que a partir de la predicción *in silico* de la unión péptido alelo específica a los donantes (n=16), realizar el ensayo de linfoproliferación empleando todos los péptidos encontrándose que hubo proliferación para todas las secuencias analizadas sin importar el tipo de unión; este comportamiento ya se había presentado en anteriores reportes para péptidos sintéticos derivados de proteínas de *Plasmodium vivax*, donde se observó que de las uniones predichas *in silico* por la plataforma NetMHCII pan v 3.0 se confirmaron el 75 % *in vitro* realizando ensayos de unión con moléculas HLA purificadas con péptidos, mientras que el 25% restante de las uniones quedaron por fuera de la comprobación (170).

Para nuestro caso en particular, esperábamos que hubiese proliferación para las 352 predicciones calculadas comprendidas en los 16 donantes alelo específica; sin embargo, el 63,1 % de estas predicciones fueron las que mostraran expansión clonal (IP> 1,75), definidas como **16,2 %** para 3 día y **46,9 %** 5 día (**Figura 29 y 30**). Lo cual demuestra que la plataforma NetMHCIIpan v4.0 puede ser empleada para predecir eficazmente uniones al MHC-II, una

herramienta válida para su empleo en el diseño de vacunas multi alélicas que abarquen diferentes grupos poblaciones a nivel mundial.

Se encuentra ampliamente reportado, en los ensayos de expansión clonal con péptidos, que al 5 día de contacto con el estímulo resulta ser donde los linfocitos presentan mayor división celular; y es así como se observó en los resultados del presente estudio (**Figura 30**) donde para el grupo PPD+ se encuentra un **36,4 %** de proliferación que correspondieron a 55 ensayos y para los donantes no reactivos (PPD-) el **54,7 %** resultaron estar comprendidos en 110 ensayos. No obstante, en algunos casos una presentación sostenida del estímulo puede producir el agotamiento de los linfocitos, de ahí que se pudiera observar que para algunos péptidos el mayor IP se produjera al tercer día, fenómenos que también se han documentado con antígenos de la micobacteria (174, 175); dentro de este corto tiempo se llevan a cabo suficientes ciclos de mitosis para ser calculados o evidenciar la proliferación producida frente al péptido (**Figura 29**) (174) para el grupo PPD+ un **8,6 %** de proliferación que correspondieron a 13 ensayos, y para los donantes no reactivos (PPD-) **21,9 %** que resultan ser 44 ensayos. El IP determinado para cada ensayo representa una relación directamente proporcional con la mayor estimulación hacia los linfocitos lo cual podría relacionarse con células efectoras capaces de influir en la respuesta inmune frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

De manera resumida en el presente trabajo, se evaluaron 352 proliferaciones, de las cuales aquellas que presentaron valores por encima del máximo índice de proliferación ($IP > 1,75$) determinadas al 3 día (57 = 16,2 %) o 5 día (165 = 46,9 %), fueron escogidas para poder llevar a cabo el ensayo de *co-cultivo*, donde se emplearon macrófagos de línea primaria infectados con *Mtb* en un MOI 1:10, con el fin de evaluar el efecto micobactericida que podrían presentar los linfocitos previamente estimulados por las células dendríticas.

Finalmente, para el ensayo de expansión clonal, se observó que las secuencias nativas indujeron proliferación del **55,1 %** (monómeros 46,5 % y polímeros 8,6 %), en contraste las secuencias modificadas con un **79,3 %** (monómeros 41,3 % y polímeros 37,9 %). En principio, las modificaciones fueron realizadas con la intención de mejorar los epítopes T, obteniendo así complejos péptido-HLAII altamente estables para llevar a cabo una comunicación entre el TCR/MHC-II. Lo anterior, es uno de los puntos más importantes del enfoque de la FIDIC y dicha propuesta ha sido probada con respecto al desarrollo de una vacuna contra la malaria (16-18,

22, 23). Así, se está mostrando el potencial que tiene el modificar algunas posiciones de las secuencias para diseñar candidatos a antígenos vacunales antituberculosos partiendo de péptidos sintéticos (17, 22-23, 162). Al analizar de manera individual los resultados por cada uno de los péptidos de las proteínas estudiadas (n=16), se encontró que en el grupo PPD- (n=10): Rv0180c (31044mn, 42456pn, 40425mm y 40426pm); Rv0679c (30987mn, 40449mm y 40450pm); Rv1411c (37096mn, 40399mm y 40400pm); Rv1911c (37765mn, 40435mm y 40436pm); Rv1980c (36827mn, 42458pn, 40443mm y 40444pm); Rv2270 (37780mn, 40431mm y 40432pm); Rv2707 (16084mn, 40405mm y 40406pm); Rv3166c (16300mn, 42452pn, 40411mm y 40412pm), y para el grupo PPD+ (n=6): Rv0180c (31044mn, 42456pn, 40425mm y 40426pm); Rv0679c (30987mn, 40449mm y 40450pm); Rv1411c (37096mn, 40399mm y 40400pm); Rv1490 (11073mn, 40401mm y 40402pm); Rv1980c (36827mn, 42458pn, 40443mm y 40444pm); Rv2707 (16084mn, 40405mm y 40406pm), tuvieron una proliferación significativa a los días 3 y 5. Se presentaron excepciones de los donante 29 PPD- y 28 PPD+ que no tuvieron proliferaciones significativas, esto posiblemente pudiese llegar a ser explicado en la caracterización de las células dendríticas de los donantes (28 y 29), respecto a la expresión de citoquinas IL-10 e IL-12 (**Anexo 3**), donde pudieron optar las células dendríticas generadas a un perfil más tolerogénico, aumentando así la expresión de moléculas inhibitorias en la presentación antigénica, un fenómeno que estuvo presente en los dos tipos de población estudiada (PPD+/PPD-).

Se conoce que la inmunidad entrenada es un arma poderosa para afrontar la infección por TB, ya que ayuda a combatir el desarrollo de la enfermedad, que incluye como parámetro clave el reconocimiento previo de antígenos que permiten el desarrollo de diferentes perfiles celulares efectores en contra de la enfermedad. En términos de la respuesta inmune celular frente a TB es bien conocido que intervengan diferentes poblaciones celulares, los cuales ayudan en el control de la infección (89, 90-94). Por lo tanto, después de evidenciar la proliferación inducida por las secuencias evaluadas, el siguiente paso fue establecer qué tipo de linfocitos conformaban la población que se expandió por el estímulo peptídico, en donde se encontraron células positivas para CD4, CD8 y CD19. Los linfocitos T ayudadores son los principales coordinadores de la respuesta inmune, pues se encargan de mantener comunicación directa con células presentadoras de antígeno, que puedan estar infectadas con patógenos, como en el caso de los macrófagos a los cuales pueden estimular para eliminar al microbio. También se ha descrito que los linfocitos citotóxicos pueden actuar directamente sobre células infectadas, evitando así la

propagación descontrolada del microorganismo. Por último, entre la población evaluada se observaron Linfocitos B, de quienes hay una creciente evidencia en su papel para evitar el desarrollo de la TB (163); en los sobrenadantes recuperados de la interacción entre la célula dendrítica y los linfocitos de los donantes (13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 26 y 27) que mostraron un elevado nivel de CD19+ y que inhibieron el crecimiento intracelular de *Mtb*, mostraron en el ensayo de ELISA un alto reconocimiento por anticuerpos específicos a péptidos generados en el cultivo (**Figura 31**), llegando a considerar que estos Ac generados son adecuados para provocar un tipo de respuesta protectora de tipo humoral, un hecho que se evidenció en el ensayo de *co-cultivo* pues inhibieron el crecimiento intracelular de *Mtb*.

En los resultados, se evidenció que poblaciones linfocitarias comprendidas como CD4, CD8 y CD19, variaron con respecto al tipo de péptidos (nativos y modificados) y a los PMBCs (control basal) de cada donante. En este punto, es importante considerar el acervo genético y la exposición que haya tenido cada persona a diferentes agentes que puede resultar en una respuesta diferente, no obstante, el principal punto en las poblaciones observadas por la inducción de los péptidos evaluados es que se encontraron elementos de la respuesta inmune que se han reportado como mediadores de protección frente a la TB y que fueron hallados para la mayoría de las secuencias evaluadas. Sin embargo, desde otra perspectiva en la definición de los términos de una respuesta inmune adaptativa, se hace necesario caracterizar las células de memoria inmune existentes luego de proliferar respecto al estímulo peptídico, cuyo rol es crucial durante el tiempo de una respuesta efectora en la defensa contra el patógeno. Mediante la marcación celular por CD45RA, CD45RO y CD62L, se encontraron células de memoria central (TCM) y efectoras de memoria (TEM) que luego pasan a adquirir un perfil de células efectoras totalmente diferenciadas (TEF o también denominadas TEMRA), indicando que la estimulación con los péptidos a través de la presentación por MHC-II evaluado en este estudio es relevante en el posible uso en el desarrollo de una vacuna sintética contra TB.

Ahora bien, respecto al ensayo de inhibición del crecimiento intracelular de *Mtb* en macrófagos de cultivo primario como parte de la evaluación de la respuesta inmune celular, se recalca la capacidad de 161 ensayos independientes de linfocitos que respondieron al estímulo tanto con las secuencias nativas como con secuencias modificadas provenientes de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el complejo pMHC-II/TCR, que fueron capaces de inducir una actividad anti-microbacteriana en células hospederas, lo que podría ser traducida como una respuesta

inmune con capacidad de generar protección contra la infección *in vivo* por *Mycobacterium tuberculosis* (**Anexo 4**).

Es así como en el *co-cultivo* se analizaron 161 datos obtenidos de proliferación 3 y 5 día que superaron el límite establecido (IP>1,75) de 10 participantes (5 por cada grupo). Como resultado se obtuvo que 84/161 (52,2 %) linfocitos previamente estimulados por las APCs, ayudaron en la inhibición intracelular del crecimiento de *Mtb* en el macrófago infectado (MOI 1:10); se observó de manera general en los dos grupos analizados que el **60,0 %** de las secuencias peptídicas modificadas presentaron inhibición definidas como: monómeros **30,0 %** (40399, 40401, 40403, 40405, 40423, 40425, 40429, 40431, 40435, 40439, 40443 y 40449) y polímeros **30,0 %** (40400, 40404, 40408, 40406, 40412, 40424, 40426, 40432, 40436, 40440, 40444 y 40450). Lo cual fue mayor en comparación con las secuencias nativas en donde el **40,0 %** presentó inhibición, comprendidas entre: monómeros **32,5 %** (11073, 16084, 16300, 16945, 30987, 31024, 31028, 31044, 36827, 37096, 37765, 37777 y 37780) y para las secuencias poliméricas **7,5 %** (42452, 42456 y 42458). Sin embargo, los resultados de inhibición desde la perspectiva de donantes, mostró: los PPD- tuvieron 62 inhibiciones y que respondieron con mayor respuesta micobactericida que los PPD+ con 22 inhibiciones; los cuales se precisaron como: secuencias monoméricas nativas (18 PPD- y 14 PPD+), polímeros nativos (3 PPD- y 1 PPD+), monómeros modificados (22 PPD- y 5 PPD+) y polímeros modificados (19 PPD- y 2 PPD+), indicando así que los PPD- presentaron mayor respuesta en la inhibición del crecimiento intracelular de *Mtb* (**Anexo 4**).

Finalmente, considerando la aproximación metodológica realizada para el presente trabajo, cuyo propósito fue contribuir a la evaluación inmunogénica de péptidos que pueden ser candidatos para el diseño de una vacuna sintética antituberculosa, se encontró que entre los péptidos evaluados hubo 23 que presentaron la capacidad de inducir proliferación de linfocitos CD4+, conocidos como los mayores efectores de la respuesta inmune frente a TB, además de generar memoria a mediano o largo plazo, indispensable para una vacuna efectiva; y por último propiciar una inhibición mayor al 30% del crecimiento intracelular de la micobacteria en los macrófagos. Los péptidos con las características anteriormente mencionadas pertenecen a las proteínas: Rv0180c (31044_{mn}, 42456_{pn}, 40424_{pm} y 40426_{pm}), Rv0227c (16945_{mn}), Rv0679c (40450_{pm}, 30987_{mn} y 40449_{mm}), Rv1411c (37096_{mn} y 40399_{mm}), Rv1490 (40401_{mm}), Rv1911c (37765_{mn} y 40435_{mm}), Rv1980c (36827_{mn} y 40443_{mm}), Rv2004c (40399_{mm} y 40440_{pm}), Rv2270

(40429_{mm}), Rv2707 (16084_{mn}, 40405_{mm} y 40406_{pm}) y Rv3166c (16300_{mn} y 42452_{pn}). En el **Anexo 4** se consignan los resultados.

Adicionalmente, cabe destacar que los péptidos modificados monómero **40449** y **40435** de las proteína Rv0679c y Rv1911 respectivamente, mostraron en los donantes PPD+ 13 y 25, para 40449 y PPD- en los donantes 18 y 20 para el péptido 40435, presentan mayor cantidad de uniones péptido alelo específica, proliferación celular y una inhibición mayor al 30% del crecimiento intracelular de la micobacteria en los macrófagos que pueden ser candidatos para el diseño de una vacuna sintética antituberculosa, por su elevada respuesta antigénica e inmunogénica desarrollada a partir de la presentación antigénica por las células dendríticas.

CONCLUSIONES

En conclusión, teniendo en cuenta que el interés para el diseño de una vacuna sintética contra TB propuesta por la FIDIC que radica en bloquear la interacción hospedero-patógeno, se encontró que las proteínas Rv3623 y Rv3632 se encuentran expuestas sobre la superficie bacteriana; por lo tanto, es factible que pueda estar involucradas en el contacto con las células blanco de infección por el patógeno *Mtb*. Se descubrió que para la línea celular de macrófagos dos péptidos 39255 y 39256, comprendidos entre la región ⁸¹TLSTYMRFKDLELRARIARALALEGAQAPEQCRY¹¹⁴ derivada de la proteína Rv3632 que fueron capaces de inhibir el ingreso de la micobacteria dependiente de la concentración, ya que se unían específicamente a esta línea celular, para el caso de Rv3623 se encontró que a región comprendida entre ²¹SGCDSHNSGSLGADPRQVTY⁴⁰ fue capaz de inhibir de manera dependiente de la concentración a la misma línea celular (U937). Se propone así modificar estos péptidos para aumentar su inmunogenicidad y puedan ser reconocidos por el sistema inmunológico del huésped, debido a que en el ensayo de antigenicidad estos dos péptidos presentaron bajo reconocimiento por anticuerpos de pacientes con TB activa y latente.

El análisis de unión *in silico* a través de la plataforma NetMHCIIpan v4.0, reveló que algunas secuencias peptídicas presentaron una alta unión aleatoria a varios alelos DR β , donde se resalta: 40449 (52,6 %), 40425 (45,6 %). Lo que demuestra que las secuencias modificadas son más prominentes a ser presentadas por el MHC clase II con respecto a las secuencias nativas.

Las CD obtenidas a partir de precursores mieloides se sometieron con 1,25 ng/mL de IL-4 y 2,5 ng/mL de GM-CSF seguido de la maduración con 10 ng/mL de LPS, lo cual aumentó la expresión de los marcadores de diferenciación CD80, CD86, CD83, HLA-II, CD11c y CD1c, como también estimulo la producción de IL-12p35 y IL-10. **Lo que significó que estas concentraciones pueden optimizar la obtención de células dendríticas dentro del cultivo *in vitro*, además estas APC**

obtenidas de esta manera generaron una homeostasis en las respuestas inmunitarias dependientes de células T.

Las células dendríticas obtenidas de cada uno de los donantes se pulsaron con péptidos según correspondía a su alelo MHC-II, luego al colocarles en una proporción 1:10 linfocitos para evaluar al 3 ó 5 días la proliferación, mostró una mayor expansión clonal conferida por las secuencias modificadas con respecto a las secuencias nativas (IP>1,75); en total se presentaron 162 resultados de expansión clonal, definidos como: PPD+ 14 péptidos al 3 día (3 nativos y 11 modificados) junto con 60 péptidos al 5 día (27 nativos y 33 modificados); mientras para los PPD- 22 péptidos al 3 día (9 nativos y 13 modificados) y 66 péptidos al 5 día (25 nativos y 41 modificados).

El tipo de población linfocitaria generada por el estímulo peptídico mostró una mayor población de CD4 respecto a CD8 y CD19 en los dos grupos de péptidos evaluados (nativos y modificados), y respecto al refuerzo de la memoria inmunológica se observó los tipos TSCM y TEM, células con memoria a mediano y largo plazo respectivamente, lo que implica que exista una mayor función efectora en contra del antígeno.

Los resultados de este trabajo llevan a afirmar que las secuencias nativas y modificadas a partir de proteínas presentes en la superficie de *Mtb* H37Rv pueden inducir la estimulación de Linfocitos T para que estos actúen sobre macrófagos infectados y pueda controlar el crecimiento intracelular de la micobacteria, por lo tanto, representan 23 candidatos prometedores para el diseño de una vacuna sintética antituberculosa, siendo esto una prueba de la validez de la metodología propuesta por la FIDIC con respecto al papel de los péptidos sintéticos en la inmunidad contra TB.

RECOMENDACIONES

Respecto a la obtención y caracterización de células dendríticas en la correcta presentación antigénica de secuencias peptídicas con alto carácter de inhibición del crecimiento intracelular, podrían llegar a ser usadas estas células presentadoras de antígeno para el diseño de centros germinales *in vitro* para poder estudiar a fondo el rol de los anticuerpos IgG específicos contra los péptidos generados en el cultivo de la célula dendrítica y linfocitos, evaluando el tipo de respuesta protectora de tipo humoral que generan, a ver si resultan ser Ac neutralizantes o opsonizantes para el control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Por otra parte, se podrían llegar a usar estas células dendríticas para evaluar la formación de granulomas *in vitro* y establecer así su capacidad de integrar células de la respuesta innata y adaptativa que conlleve a incrementar la posibilidad de la contención de bacilos tuberculosos en una infección.

Se recomienda evaluar en el sobrenadante del *co-cultivo*, las citoquinas que permiten definir la polarización a diferentes perfiles linfocitarios descritos en el control de la infección por *Mtb*, tal medición puede ser evaluada con el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17.

Se podría extrapolar estos resultados, donde se evidenció que 23 secuencias peptídicas presentadas correctamente por la relación pMHC-II/TCR generan una respuesta protectora en la infección *in vitro*, llevada a un modelo animal como el ratón con la finalidad de evaluar si cumple con las condiciones de inhibición del crecimiento intracelular en macrófagos infectados y así ser incluidos en un modelo de vacuna contra TB.

ANEXOS

ANEXO 1. Homología de las proteínas entre diferentes cepas del complejo tuberculosis MTC y en aislados clínicos.

Rv2004c		Rv2560		Rv2707		Rv3494c		Origen	Cepa	% Homología			
Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia			Rv2004c	Rv2560	Rv2707	Rv3494c
9111	AGYAVRSGDTAPASLRDFYI	11024	VVALSDRATTAYTNTSGVSS	16084	RIGVGTTTYSSSTAGHSVAAA	38373	HMLNSGTAIPSNVTVTRSY			Linaje1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	100	100
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	100	100	100	95
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	100	100	100	95
								Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	100	100	100	95
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	100	100	100	95
								Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503	100	100	100	95
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801	100	100	100	95
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	100	100	100	95
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	100	100	100	95
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	100	100	100	95
								CMT	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	0	100	0	95
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	100	100	100	95
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	100	100	100	95
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	100	100	100	95
									<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	100	100	100	95
40439	AGFOAFSSPTSPASLRDFYI	40403	ALSDRATTFTPTSGVSSK	40405	RIGVGTPDFSASDLSLVAAA	40447	AHMLNSGPSLOADQKGTQR	Linaje1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	70	84,2	50	45
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	70	84,2	50	45
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	70	84,2	50	45
								Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	70	84,2	50	45
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	70	84,2	50	45
								Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503	70	84,2	50	45
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801	70	84,2	50	45
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	70	84,2	50	45
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	70	84,2	50	45
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	70	84,2	50	45
								CMT	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	0	84,2	0	45
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	70	84,2	50	45
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	70	84,2	50	45
									<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	70	84,2	50	45
									<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	70	84,2	50	45

Rv1980c		Rv3166c		Origen	Cepa	% Homologia	
Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia			Rv1980c	Rv3166c
36827	TQIQMSDPAYNINIISLPYY	16295	LITRRORRKSAPARISGDRIY			Linaje1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	95	100
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	95	100
				Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	95	100
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	95	100
				Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503	95	100
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801	95	100
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	95	100
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	95	100
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	95	100
					<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	95	100
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	95	100
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	95	100
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	95	100
					<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	95	100
40443	SDPAYNINISLPSYYPDQKS	40407	SELTALRLKSPASLRSGDR	Linaje1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	90	45
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	90	45
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	90	45
				Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	90	45
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	90	45
				Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503	90	45
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801	90	45
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	90	45
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	90	45
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	90	45
					<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	90	45
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	90	45
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	90	45
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	90	45
					<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	90	45
31107	IVQGELSKQTGGQVSIAPNAY	16300	VSLFAEARFSPHVWNEEHREY	Linaje1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	95	95,2
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	95	95,2
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	95	95,2
				Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	95	95,2
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	95	95,2
				Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503	95	95,2
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801	95	95,2
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	95	95,2
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	95	95,2
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	95	95,2
					<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	95	95,2
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	95	95,2
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	95	95,2
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	95	95,2
					<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	95	95,2
40445	VQGLSMNTSVQVSIAPNAY	40411	LOSLRAMKRLPQHVMNEEHR	Linaje1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	57	55
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	57	55
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	57	55
				Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	57	55
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	57	55
				Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503	57	55
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801	57	55
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	57	55
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	57	55
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	57	55
					<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	57	55
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	57	55
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	57	55
					<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	57	55
					<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	57	55

Rv0180c		Rv1911c		Rv2270		Origen	Cepa	% Homología			
Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia			Rv0180c	Rv1911c	Rv2270c	
31024	AALYLGILNPMTNLRHFPI	37763	MESPMTSLHRTPLATAGLAY	37775	TSSNGARGGIASTNMNPTNPY			Linaje1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	100	76
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	100	76	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	100	76	90	
						Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	100	76	90	
						Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	100	76	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503	100	76	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801	100	76	90	
						CMT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	100	76	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	100	0	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	100	76	90	
							<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	0	0	0	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	100	76	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	100	76	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	100	0	90	
							<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	100	76	90	
40415	AALYLDPKLNPKTNLRHFPI	40433	LHRTPLTTDGLKAYQVAL	40427	ARGGLSADPKPNRGPATAE	Linaje1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	80	47	47	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	80	47	47	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	80	47	47	
						Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	80	47	47	
						Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	80	47	47	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503	80	47	47	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801	80	47	47	
						CMT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	80	47	47	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	80	0	47	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	80	47	47	
							<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	0	0	0	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	80	47	47	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	80	47	47	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	80	0	47	
							<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	80	47	47	
31028	RDFGASAVPTRDRPAITY	37765	YVPKATTVDTTPAPAAEPL	37777	ETWINLQVGDTLADLPPADLY	Linaje1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	90	100	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	90	100	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	90	100	90	
						Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	90	100	90	
						Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	90	100	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503	90	100	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801	90	100	90	
						CMT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	90	100	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	90	0	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	90	100	90	
							<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	0	0	0	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	90	100	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	90	100	90	
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	90	90	90	
						<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	90	100	90		

40423	SSQLRPFSGAQRPRTRDRP	40435	PKATSFDASTPAPAAEPL	40429	WIPQLQGDTRAPRPADLSR	Linaje 1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	70	83	60
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	70	83	60
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	70	83	60
						Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	70	83	60
							Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	70	83
						<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503		70	83	60
						<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801		70	83	60
						CMT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	70	83	60
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	70	0	60
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	70	83	60
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	0	0	0							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	70	83	60							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	70	83	60							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	70	83	60							
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	70	83	60							
31044	EHQAQYQARQSARESSSEQP	37767	GANVAPPLTWSSPAGAAELAY	37780	GFAPYTGQSVDTSPYSVAYL	Linaje 1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	100	95	100
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	100	95	100
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	100	95	100
						Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	100	95	100
							Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	100	95
						<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503		100	95	100
						<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801		100	95	100
						CMT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	100	95	100
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	100	95	100
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	100	95	100
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	0	0	0							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	100	95	100							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	100	95	100							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	100	95	100							
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	100	95	100							
40425	EHQAQLRAFQSARRSSEQP	40437	GANVAPPLTWSSPASAAQLAY	40431	GFAPFTASSPVTVPYSVAYL	Linaje 1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17	80	85	70
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T67	80	85	70
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92	80	85	70
						Linaje 2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85	80	85	70
							Linaje 4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	80	85
						<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM_1503		80	85	70
						<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Erdman=ATCC 35801		80	85	70
						CMT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	80	85	70
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Haarlem	80	85	70
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	80	85	70
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172	0	0	0							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020193	80	85	70							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant africanum MAL020136	80	85	70							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono	80	85	70							
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	80	85	70							

ANEXO 2. Predicción *in silico* de la unión de 114 péptidos a 57 alelos más frecuentes a nivel mundial del MHC-II, a través del servidor NetMHCII pan v4.0.

Proteína	Péptido	DRβ1																
		01:01	01:02	03:01	03:02	03:05	04:01	04:02	04:03	04:04	04:05	04:06	04:07	04:08	07:01	07:04	08:01	08:02
Rv0180c	31024 _{mn}	58,4	36,9	44,9	53,6	55,9	13,4	4,1	9,2	3,5	12,2	9,2	15,5	8,8	68,5	63,4	40,1	28,1
	40415 _{mm}	77,3	67,2	5,4	30,0	10,7	52,2	6,4	64,8	43,1	57,3	64,8	70,0	56,4	80,4	54,9	17,8	16,6
	31025 _{mn}	55,1	48,3	52,6	43,4	54,8	50,0	48,4	18,1	38,5	11,8	18,1	28,9	40,3	67,8	65,7	37,1	61,2
	40417 _{mm}	54,2	43,0	45,2	57,8	56,5	84,7	77,6	72,7	73,7	74,5	72,7	67,9	77,4	86,5	71,1	85,3	84,0
	31032 _{mn}	15,1	40,0	85,8	63,8	62,0	8,0	23,3	15,1	15,7	11,7	15,1	15,1	4,8	70,9	58,9	31,3	20,2
	40419 _{mm}	10,6	23,4	86,7	56,1	57,0	6,3	26,7	15,1	13,5	10,7	15,1	14,7	3,7	55,6	43,0	38,3	20,0
	31039 _{mn}	29,5	24,1	56,9	79,0	73,1	77,3	72,8	68,2	66,0	75,3	68,2	74,9	67,6	54,6	65,7	84,9	78,6
	40421 _{mm}	57,7	52,9	67,3	84,2	83,5	77,7	72,3	75,6	60,7	78,0	75,6	80,1	67,5	85,7	74,0	87,2	77,2
	31028 _{mn}	77,8	83,5	60,1	70,5	65,5	58,9	67,4	56,1	72,8	71,8	56,1	60,3	64,2	69,1	68,9	82,6	75,1
	40423 _{mm}	36,8	25,1	10,8	6,4	8,9	41,8	8,6	36,6	25,9	45,8	36,6	53,8	44,2	33,4	38,0	24,9	26,4
	31044 _{mn}	41,7	70,6	68,0	34,2	62,2	28,1	26,2	27,4	60,6	14,4	27,4	25,4	29,8	29,0	29,8	1,1	4,4
40425 _{mm}	29,6	18,8	18,7	17,6	22,5	34,5	6,7	35,4	23,5	35,7	35,4	45,2	35,3	31,3	36,1	7,0	4,0	
Rv0227c	16945 _{mn}	43,5	71,0	71,7	61,0	54,4	13,1	58,3	30,8	47,6	16,5	30,8	13,0	12,7	11,8	21,8	50,6	44,4
	40391 _{mm}	31,3	69,5	65,7	42,5	37,3	39,1	82,2	59,9	70,3	33,3	59,9	33,5	33,0	2,3	3,6	74,8	75,0
	16951 _{mn}	93,7	95,0	95,0	95,0	95,0	94,7	95,0	94,0	95,0	93,2	94,0	94,4	90,5	95,0	95,0	95,0	95,0
	40393 _{mm}	68,6	94,1	89,1	45,9	69,6	48,7	87,6	85,1	88,6	69,6	85,1	69,1	54,5	77,3	67,8	82,4	68,4
	40395 _{mm}	91,7	95,0	83,4	69,6	84,6	61,2	89,2	81,7	90,0	77,9	81,7	74,9	71,5	85,2	89,1	94,1	82,2
Rv0679c	30987 _{mn}	38,7	29,7	27,9	64,4	35,7	60,4	39,4	65,5	43,4	74,4	65,5	70,5	69,0	70,4	53,7	73,9	64,1
	40449 _{mm}	3,9	4,9	53,3	11,5	23,8	0,6	2,3	2,5	1,5	2,3	2,5	1,8	0,4	25,9	20,4	6,6	2,3
Rv1268c	37964 _{mn}	57,1	51,7	89,7	81,6	90,9	66,5	73,6	77,8	72,8	78,3	77,8	71,1	69,7	83,9	88,6	93,9	77,9
	40397 _{mm}	77,9	71,0	91,9	90,7	91,7	66,2	81,1	75,9	74,2	76,1	75,9	63,6	72,3	84,1	87,3	93,1	76,0
Rv1411c	37096 _{mn}	6,7	18,6	69,6	35,1	37,7	13,1	63,4	42,3	43,0	25,6	42,3	18,1	16,1	2,7	3,7	29,9	19,1
	40399 _{mm}	1,2	3,8	46,7	44,0	43,3	10,5	32,8	25,0	24,2	19,3	25,0	16,6	9,3	18,5	20,2	22,7	9,6
Rv1490	11073 _{mn}	46,5	73,3	70,6	82,7	76,4	76,2	58,1	71,6	69,6	53,2	71,6	69,4	71,1	41,5	49,9	70,6	79,4
	40401 _{mm}	17,4	23,3	28,1	11,2	19,9	24,5	10,0	38,2	25,3	23,9	38,2	35,8	24,2	10,8	8,0	19,9	25,8
Rv1911c	37763 _{mn}	94,0	89,3	79,5	90,9	90,0	70,1	59,1	69,7	70,4	84,7	69,7	60,5	70,1	65,1	76,6	70,3	63,7
	40433 _{mm}	73,4	78,5	5,3	16,9	8,1	84,9	84,7	67,1	82,1	88,7	67,1	82,2	89,3	83,1	73,8	89,7	88,7
	37765 _{mn}	25,5	21,9	21,2	50,4	37,0	18,5	46,8	36,7	27,6	38,1	36,7	24,1	24,7	11,9	19,6	59,9	32,5
	40435 _{mm}	3,1	10,1	40,9	18,2	14,2	2,5	35,9	17,9	20,7	13,3	17,9	5,7	4,2	2,0	2,7	13,5	5,3
	37767 _{mn}	59,4	55,7	80,9	65,6	45,1	51,3	65,3	66,3	62,5	71,5	66,3	52,5	57,8	43,2	59,5	80,1	59,0
	40437 _{mm}	64,3	52,7	83,6	75,9	57,1	49,4	65,4	66,4	56,2	70,0	66,4	52,4	54,7	42,9	48,8	74,5	53,7
Rv1980c	36827 _{mn}	18,3	40,3	42,5	6,0	10,2	4,0	23,1	19,7	23,6	12,1	19,7	7,3	5,1	14,9	8,2	19,6	8,8
	40443 _{mm}	22,3	43,7	54,1	9,4	17,6	7,7	32,3	36,6	37,8	22,2	36,6	13,5	10,1	21,8	12,9	33,0	18,0
	31107 _{mn}	12,3	8,5	74,4	84,6	81,8	58,4	49,8	60,1	55,1	67,7	60,1	58,7	62,9	51,7	36,2	83,8	80,5
	40445 _{mm}	48,2	37,1	36,3	13,5	18,9	43,9	51,4	56,8	49,4	50,9	56,8	42,0	49,2	20,0	9,5	78,3	55,3
Rv2004c	9111 _{mn}	48,6	38,6	66,2	53,3	67,1	20,0	29,4	29,0	18,5	46,0	29,0	34,0	27,5	79,8	75,5	64,5	36,0
	40439 _{mm}	33,5	54,8	90,3	71,7	76,7	17,9	27,1	34,5	28,1	13,5	34,5	24,9	11,0	41,3	53,1	48,7	41,7
Rv2270	37775 _{mn}	77,8	73,6	71,0	61,8	61,0	43,9	47,0	51,1	48,9	63,9	51,1	54,2	57,0	34,8	37,3	69,8	58,7
	40427 _{mm}	87,7	70,5	0,3	1,0	0,7	56,8	61,8	72,6	58,7	64,2	72,6	76,2	82,2	80,9	82,9	57,1	59,9
	37777 _{mn}	76,3	57,9	69,6	59,0	66,6	55,9	77,6	30,6	60,3	26,0	30,6	33,2	54,8	91,0	76,9	78,2	77,3
	40429 _{mm}	79,1	69,0	0,1	0,6	0,7	54,9	59,6	71,4	59,5	86,0	71,4	62,8	67,7	89,0	83,8	44,4	44,8

Proteína	Péptido	DRβ1																
		01:01	01:02	03:01	03:02	03:05	04:01	04:02	04:03	04:04	04:05	04:06	04:07	04:08	07:01	07:04	08:01	08:02
	37780 _{mn}	31,6	58,5	48,0	44,5	51,1	8,6	46,4	9,5	27,7	18,9	9,5	6,2	11,9	44,7	54,5	57,8	50,9
	40431 _{mn}	8,3	24,5	79,1	28,2	27,9	31,8	84,8	76,4	80,0	42,7	76,4	33,8	35,6	2,5	3,0	54,7	55,4
Rv2301c	30960 _{mn}	54,2	83,3	95,0	83,3	86,8	61,8	80,9	72,7	73,4	39,5	72,7	37,2	54,6	58,7	68,2	79,7	87,3
	40441 _{mn}	75,1	61,8	87,2	82,2	88,9	50,3	21,5	43,4	22,4	39,1	43,4	59,7	35,6	53,0	68,1	71,7	72,4
Rv2560	11024 _{mn}	84,2	88,3	84,6	79,6	82,1	61,3	57,8	74,1	63,7	71,6	74,1	68,7	56,8	50,0	58,0	82,9	83,7
	40403 _{mn}	36,3	69,7	90,0	69,6	70,9	34,5	67,3	62,0	65,2	46,8	62,0	43,0	38,5	6,8	13,5	60,1	49,6
Rv2707	16084 _{mn}	60,0	80,0	95,0	95,0	95,0	60,0	85,0	70,0	80,0	75,0	70,0	60,0	60,0	55,0	85,0	85,0	65,0
	40405 _{mn}	25,0	75,0	70,0	25,0	26,0	11,0	80,0	47,0	65,0	24,0	47,0	8,0	12,0	4,5	5,0	90,0	80,0
Rv3166c	16295 _{mn}	62,1	59,5	87,2	64,3	78,5	81,6	66,0	81,7	82,7	83,6	81,7	80,4	85,0	23,4	45,3	71,8	70,9
	40407 _{mn}	18,7	13,5	56,9	53,9	54,8	16,7	7,0	24,9	10,4	24,0	24,9	23,1	13,8	54,6	42,5	27,9	14,0
	16298 _{mn}	91,5	93,8	90,5	92,2	92,7	85,1	92,8	86,0	91,5	82,5	86,0	73,5	85,9	81,1	79,9	93,2	90,3
	40409 _{mn}	90,8	88,3	91,1	86,4	87,2	78,2	87,5	73,5	77,6	72,4	73,5	60,9	68,5	90,7	81,7	74,4	84,5
	16300 _{mn}	85,6	82,8	72,4	60,6	61,7	68,3	71,5	77,0	92,3	62,4	77,0	67,0	74,8	56,1	70,0	26,2	49,4
40411 _{mn}	17,7	12,6	33,4	30,7	46,4	40,3	16,3	39,6	27,9	39,7	39,6	43,6	35,7	26,5	17,3	11,2	4,5	
Rv3494c	38373 _{mn}	56,1	57,1	77,5	76,6	73,9	76,2	85,8	80,8	77,4	88,4	80,8	76,5	79,5	80,8	65,4	94,9	92,6
	40447 _{mn}	41,3	30,4	0,6	3,8	2,1	23,6	30,0	34,8	26,2	46,5	34,8	35,9	30,1	61,6	34,8	82,4	60,6
Rv3587c	39265 _{mn}	23,9	13,6	13,3	7,4	6,5	40,2	37,2	49,0	36,5	50,4	49,0	42,9	42,0	48,6	31,9	47,1	61,3
	39266 _{mn}	78,2	76,2	80,9	54,9	72,2	50,0	38,1	36,2	38,6	19,9	36,2	35,6	46,5	27,5	41,4	45,4	48,7
Rv3623	16661 _{mn}	95,0	95,0	7,1	7,7	8,7	95,0	95,0	95,0	95,0	93,2	95,0	95,0	95,0	95,0	93,1	93,4	91,4
	16664 _{mn}	93,4	93,2	20,0	73,9	60,6	89,2	72,0	73,8	84,1	88,1	73,8	85,4	91,4	95,0	95,0	81,2	76,7
Rv3629	16645 _{mn}	44,0	64,5	64,5	40,5	36,8	39,5	41,1	19,8	28,8	11,5	19,8	19,5	29,4	10,6	16,5	16,4	31,0
	16646 _{mn}	76,4	67,7	92,3	85,6	85,0	61,0	83,6	74,1	77,3	71,1	74,1	68,0	71,1	84,2	74,9	88,6	89,7
	40413 _{mn}	46,7	28,8	27,7	44,7	31,2	56,3	43,0	44,1	42,7	65,5	44,1	65,9	56,5	21,5	24,9	42,0	31,2
Rv3632	39255 _{mn}	49,7	58,6	55,9	61,8	56,9	55,8	34,7	59,8	53,5	24,6	59,8	48,7	42,0	39,4	40,0	45,1	37,9
	39256 _{mn}	27,9	19,4	69,6	57,1	67,6	26,9	49,7	37,7	31,1	42,0	37,7	31,5	26,6	64,8	52,1	70,5	37,7

Proteína	Péptido	DRβ1																
		08:04	09:01	09:02	10:01	11:01	11:02	11:04	11:06	11:11	12:01	12:16	13:01	13:02	13:03	13:05	13:07	13:30
Rv0180c	31024 _{mn}	17,3	66,0	57,9	36,0	34,3	41,4	20,3	18,9	35,1	22,7	28,2	41,4	48,6	57,9	34,3	35,6	38,8
	40415 _{mn}	10,6	91,9	75,9	70,1	25,6	16,0	20,3	22,2	16,2	62,4	55,1	16,0	23,5	24,7	25,6	27,9	44,3
	31025 _{mn}	65,0	44,7	45,0	42,4	75,6	77,3	69,6	67,5	80,5	51,1	53,5	77,3	73,6	45,6	75,6	52,8	48,9
	40417 _{mn}	80,2	60,8	74,7	61,4	90,1	87,4	81,9	82,0	88,6	67,0	76,4	87,4	79,9	84,7	90,1	81,5	81,0
	31032 _{mn}	38,8	71,4	59,8	14,7	12,6	72,4	38,6	36,6	43,4	71,4	26,9	72,4	75,1	37,1	12,6	12,9	27,6
	40419 _{mn}	38,6	35,6	37,2	10,5	15,5	74,4	44,4	38,9	47,5	73,2	29,8	74,4	77,2	48,8	15,5	15,4	34,7
	31039 _{mn}	68,8	70,2	69,5	41,7	83,1	63,3	72,9	67,9	85,1	43,3	52,0	63,3	78,7	86,3	83,1	75,3	84,1
	40421 _{mn}	63,7	88,4	78,6	51,2	83,3	68,2	77,1	66,1	85,6	40,8	56,6	68,2	90,4	92,0	83,3	78,1	87,6
	31028 _{mn}	74,2	46,9	48,9	74,9	84,9	89,8	81,0	80,9	84,9	92,2	90,2	89,8	81,6	74,7	84,9	77,8	84,3
	40423 _{mn}	20,7	48,5	35,8	61,9	12,1	3,2	14,9	13,9	9,6	20,0	29,6	3,2	11,4	14,5	12,1	10,5	18,7
	31044 _{mn}	23,9	47,7	28,7	22,0	10,3	38,2	35,1	34,1	15,6	82,8	30,3	38,2	34,0	8,1	10,3	10,9	7,5
40425 _{mn}	10,0	42,7	18,7	39,1	1,4	2,9	8,4	6,9	3,9	20,9	20,0	2,9	16,9	5,0	1,4	1,2	8,8	
Rv0227c	16945 _{mn}	70,1	14,8	21,6	20,8	50,7	78,6	78,2	73,4	66,8	77,4	65,8	78,6	63,8	50,1	50,7	52,1	39,9
	40391 _{mn}	83,5	6,0	16,8	48,5	76,1	87,9	91,5	90,6	83,8	81,7	54,0	87,9	51,8	52,7	76,1	74,9	37,0

Proteína	Péptido	DRβ1																
		08:04	09:01	09:02	10:01	11:01	11:02	11:04	11:06	11:11	12:01	12:16	13:01	13:02	13:03	13:05	13:07	13:30
	16951 _{mn}	95,0	90,4	88,2	94,9	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0
	40393 _{mm}	87,9	58,4	47,9	42,1	79,0	95,0	92,8	95,0	85,3	95,0	86,5	95,0	93,3	87,0	79,0	87,5	78,2
	40395 _{mm}	93,0	76,6	69,2	75,0	93,5	95,0	91,7	95,0	91,6	95,0	90,4	95,0	95,0	92,3	93,5	94,4	90,7
Rv0679c	30987 _{mn}	47,0	62,4	56,6	82,8	55,7	29,9	33,9	30,5	40,6	29,4	39,5	29,9	58,4	71,7	55,7	47,2	69,0
	40449 _{mm}	7,0	27,2	13,0	2,2	1,7	28,8	7,3	7,0	7,4	22,2	2,1	28,8	31,3	12,8	1,7	1,9	8,9
Rv1268c	37964 _{mn}	85,5	59,2	62,1	47,1	86,4	95,0	90,5	88,6	87,4	95,0	93,6	95,0	92,1	95,0	86,4	88,2	91,1
	40397 _{mm}	83,3	69,7	66,2	58,3	91,1	95,0	92,4	87,4	84,1	95,0	86,6	95,0	75,4	93,2	91,1	88,5	91,4
Rv1411c	37096 _{mn}	52,0	1,5	0,9	4,5	23,6	69,8	65,9	56,1	34,5	77,1	50,8	69,8	36,9	28,3	23,6	21,3	27,3
	40399 _{mm}	31,7	7,2	3,8	0,4	8,09	48,9	31,1	22,8	24,1	18,4	10,4	48,9	43,1	32,3	8,1	9,5	27,9
Rv1490	11073 _{mn}	87,5	33,2	36,9	50,1	88,9	81,4	91,6	89,7	90,0	88,9	78,0	81,4	84,2	81,0	88,9	86,4	87,3
	40401 _{mm}	25,0	23,0	15,8	39,4	19,5	6,5	20,3	20,0	9,5	25,8	16,4	6,5	11,1	21,0	19,5	17,6	19,1
Rv1911c	37763 _{mn}	67,9	87,7	78,3	74,5	64,7	73,7	67,4	62,8	67,4	75,9	74,4	73,7	71,5	79,6	64,7	68,1	61,7
	40433 _{mm}	83,5	86,4	92,6	88,3	91,0	56,9	82,0	70,9	73,4	39,9	74,6	56,9	48,6	41,1	91,0	87,7	64,2
	37765 _{mn}	43,4	11,4	10,9	16,6	55,6	67,9	51,5	48,4	41,2	76,8	63,4	67,9	41,8	59,2	55,6	46,3	53,2
	40435 _{mm}	28,0	0,5	0,2	0,9	9,4	53,5	36,4	34,2	16,4	82,6	30,5	53,5	21,8	11,7	9,4	7,9	13,8
	37767 _{mn}	71,3	34,8	26,9	39,9	80,8	86,9	84,7	74,8	66,0	94,5	90,9	86,9	59,0	81,6	80,8	77,9	76,3
	40437 _{mm}	69,3	37,0	24,5	40,2	80,0	86,8	84,9	77,0	63,1	92,8	92,1	86,8	50,3	83,2	80,0	77,4	77,1
Rv1980c	36827 _{mn}	38,5	17,9	6,9	13,5	9,4	38,2	41,5	32,7	13,9	70,2	33,1	38,2	4,8	11,1	9,4	7,0	8,7
	40443 _{mm}	52,6	24,5	9,1	16,1	16,4	47,8	58,1	46,1	21,9	50,8	46,9	47,8	10,9	20,5	16,4	12,5	17,5
	31107 _{mn}	83,6	51,1	61,0	55,1	84,2	64,9	85,7	78,2	75,8	57,9	68,5	64,9	45,0	80,0	84,2	81,5	81,1
Rv2004c	40445 _{mm}	71,2	28,2	30,0	58,8	67,9	44,4	75,1	66,9	36,7	38,7	48,3	44,4	5,9	47,8	67,9	69,3	39,7
	9111 _{mn}	56,5	47,7	34,5	31,2	63,7	70,8	61,3	56,8	62,0	74,1	81,1	70,8	72,4	75,5	63,7	65,8	81,3
Rv2270	40439 _{mm}	67,6	42,6	28,5	29,9	50,8	81,6	78,1	74,6	67,9	89,7	64,2	81,6	79,3	81,1	50,8	52,2	66,2
	37775 _{mn}	59,4	54,0	53,8	68,9	79,0	68,6	77,4	73,0	70,4	63,3	75,8	68,6	46,9	72,7	79,0	78,5	69,3
	40427 _{mm}	40,8	92,2	89,5	87,2	37,4	12,8	26,4	31,7	23,6	60,0	49,8	12,8	18,6	15,4	37,4	28,8	34,8
	37777 _{mn}	84,2	75,9	91,0	70,7	88,8	93,2	86,5	90,9	88,4	80,6	77,9	93,2	89,4	57,2	88,8	81,1	82,6
	40429 _{mm}	35,4	93,4	79,3	89,7	26,9	8,3	20,1	20,1	16,2	56,7	78,2	8,3	14,3	10,7	26,9	22,6	29,0
	37780 _{mn}	71,6	57,1	53,8	14,2	59,8	78,5	78,9	80,6	76,3	66,6	77,3	78,5	66,5	56,0	59,8	47,7	66,8
Rv2301c	40431 _{mm}	80,3	1,2	1,6	15,4	55,4	74,7	89,0	81,8	56,9	84,6	56,9	74,7	30,8	36,4	55,4	48,4	37,5
	30960 _{mn}	89,5	27,5	47,2	50,2	88,0	89,5	92,2	92,0	80,8	94,9	79,6	89,5	88,7	79,2	88,0	82,4	86,3
Rv2560	40441 _{mm}	60,2	67,9	69,0	73,6	78,0	77,7	70,2	64,8	67,1	79,1	65,6	77,7	80,5	93,8	78,0	78,2	89,3
	11024 _{mn}	81,4	62,9	60,2	66,2	84,7	79,8	81,3	81,8	86,6	88,0	90,5	79,8	81,9	86,6	84,7	79,5	86,2
Rv2707	40403 _{mm}	76,1	14,5	14,8	32,1	50,4	79,7	82,5	81,2	61,0	87,4	59,9	79,7	68,1	62,6	50,4	40,3	54,4
	16084 _{mn}	80,0	38,0	24,0	55,0	80,0	95,0	85,0	85,0	85,0	95,0	90,0	95,0	95,0	95,0	80,0	75,0	95,0
Rv3166c	40405 _{mm}	95,0	8,5	13,0	28,0	85,0	90,0	95,0	95,0	85,0	90,0	85,0	90,0	27,0	43,0	85,0	80,0	60,0
	16295 _{mn}	70,6	36,3	35,4	62,9	61,1	70,5	66,5	65,3	56,8	88,4	77,6	70,5	57,9	71,1	61,1	62,3	79,5
	40407 _{mm}	8,1	51,5	29,6	20,1	5,1	23,1	3,4	3,2	10,0	20,0	13,0	23,1	41,8	34,4	5,1	9,2	28,3
	16298 _{mn}	93,1	88,6	85,0	87,6	94,6	89,5	95,0	94,8	93,1	89,1	87,2	89,5	89,9	90,2	94,6	93,2	92,4
	40409 _{mm}	84,1	88,8	90,3	76,3	85,3	86,9	83,7	86,5	81,6	88,8	86,6	86,9	89,0	47,7	85,3	81,0	63,9
	16300 _{mn}	73,9	83,0	73,7	65,6	52,7	67,7	78,4	71,4	60,2	76,7	77,2	67,7	57,7	32,9	52,7	44,4	41,8
Rv3494c	40411 _{mm}	1,5	48,7	36,9	32,8	1,5	6,8	0,7	0,7	2,1	3,2	5,8	6,8	16,7	12,0	1,5	1,9	9,7
	38373 _{mn}	91,4	54,7	46,3	62,4	94,8	81,8	93,2	91,9	85,1	91,6	88,6	81,8	55,3	85,8	94,8	94,1	90,0
Rv3587c	40447 _{mm}	55,0	46,0	40,1	50,0	57,2	24,2	45,1	44,1	35,0	70,7	74,3	24,2	19,4	25,1	57,2	54,1	46,6
	39265 _{mn}	54,9	60,6	52,2	62,6	46,1	45,7	58,7	47,2	43,8	16,3	29,5	45,7	33,6	17,9	46,1	46,7	30,2
	39266 _{mn}	47,0	56,8	56,4	53,9	61,2	65,9	58,1	49,9	70,6	70,4	60,8	65,9	63,9	37,6	61,2	60,7	43,9

Proteína	Péptido	DRβ1																
		08:04	09:01	09:02	10:01	11:01	11:02	11:04	11:06	11:11	12:01	12:16	13:01	13:02	13:03	13:05	13:07	13:30
Rv3623	16661 _{mn}	79,6	93,4	95,0	95,0	84,2	82,8	67,6	63,8	64,3	93,3	95,0	82,8	63,0	36,7	84,2	86,6	82,1
	16664 _{mn}	68,6	95,0	91,6	95,0	72,0	69,0	76,6	67,7	71,6	89,4	88,9	69,0	83,9	88,8	72,0	79,2	90,2
Rv3629	16645 _{mn}	42,1	20,6	25,7	28,3	44,0	62,2	61,6	57,1	61,5	47,7	47,3	62,2	33,8	18,3	44,0	40,6	13,4
	16646 _{mn}	85,6	62,7	61,2	64,9	90,7	92,4	88,9	91,5	88,9	92,6	86,2	92,4	91,3	87,6	90,7	88,0	93,6
	40413 _{mn}	20,6	47,5	36,4	44,0	16,6	23,4	16,0	12,1	23,7	15,9	24,7	23,4	45,3	40,2	16,6	18,5	39,6
Rv3632	39255 _{mn}	42,5	50,4	58,1	35,4	34,2	28,6	43,5	39,6	47,3	53,8	41,6	28,6	60,1	64,5	34,2	43,1	61,0
	39256 _{mn}	40,5	42,4	27,9	19,5	59,6	77,8	58,2	54,3	61,4	65,7	64,3	77,8	73,1	76,1	59,6	54,7	67,0

Proteína	Péptido	DRβ1														
		14:01	14:03	14:04	14:05	14:06	14:08	14:14	14:25	14:32	15:01	15:02	15:03	16:01	16:04	16:15
Rv0180c	31024 _{mn}	54,6	43,8	53,4	46,7	25,9	46,7	45,0	37,1	44,9	27,6	29,3	31,9	29,5	32,4	19,2
	40415 _{mn}	43,3	30,3	50,6	41,8	31,8	41,8	49,8	36,1	48,8	31,2	51,1	38,9	54,3	49,0	39,0
	31025 _{mn}	53,5	65,8	53,5	61,1	68,5	61,1	68,1	51,2	51,1	72,3	52,6	69,4	64,2	65,4	52,5
	40417 _{mn}	74,5	84,2	75,6	74,5	74,2	74,5	76,0	70,1	66,6	92,3	87,7	86,9	83,3	78,4	86,0
	31032 _{mn}	80,2	40,0	78,0	68,1	61,0	68,1	48,0	18,9	79,2	61,2	36,3	74,3	13,6	24,9	34,8
	40419 _{mn}	76,6	34,4	73,0	64,3	56,0	64,3	45,9	21,8	66,2	49,0	22,0	59,5	9,4	19,2	23,2
	31039 _{mn}	70,2	82,0	76,1	63,6	50,4	63,6	86,8	74,9	55,9	52,8	52,3	56,6	39,2	41,6	42,1
	40421 _{mn}	85,3	86,4	84,1	81,9	59,1	81,9	91,4	78,9	68,0	36,9	49,7	52,7	31,7	49,7	36,4
	31028 _{mn}	75,6	78,6	80,7	74,7	81,2	74,7	71,4	88,6	87,3	94,3	91,9	93,5	93,0	84,5	88,7
	40423 _{mn}	29,1	12,3	35,1	18,8	9,2	18,8	18,1	17,7	21,7	3,9	6,0	4,0	2,1	2,9	1,2
	31044 _{mn}	65,0	11,0	71,6	50,9	55,8	50,9	32,4	9,1	69,8	62,1	33,8	62,6	23,5	21,1	46,1
40425 _{mn}	33,8	3,4	30,3	17,1	7,6	17,1	7,5	3,6	20,5	3,2	3,9	2,3	1,1	1,2	0,4	
Rv0227c	16945 _{mn}	68,9	49,0	66,0	63,9	70,3	63,9	25,2	37,0	72,6	37,7	26,4	40,3	42,4	34,5	53,0
	40391 _{mn}	50,1	39,8	47,8	58,1	71,6	58,1	26,7	51,7	42,3	70,0	30,7	81,0	26,3	19,7	54,2
	16951 _{mn}	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0
	40393 _{mn}	94,6	58,2	94,6	88,1	95,0	88,1	70,6	87,1	95,0	95,0	90,0	95,0	89,7	79,8	95,0
	40395 _{mn}	95,0	85,1	95,0	93,4	93,7	93,4	74,7	94,8	95,0	95,0	95,0	95,0	93,9	92,9	95,0
Rv0679c	30987 _{mn}	58,7	64,6	60,7	57,9	24,0	57,9	77,5	63,3	50,3	45,2	53,7	50,6	22,0	34,4	17,9
	40449 _{mn}	46,6	5,7	42,7	33,3	16,0	33,3	12,8	3,4	38,1	11,5	7,5	14,5	1,8	3,6	4,7
Rv1268c	37964 _{mn}	95,0	83,7	94,6	91,3	84,4	91,3	91,1	84,5	93,1	95,0	94,8	94,8	92,1	82,6	79,9
	40397 _{mn}	90,9	73,5	90,2	76,9	84,0	76,9	81,1	88,5	89,4	95,0	93,7	95,0	95,0	86,9	91,2
Rv1411c	37096 _{mn}	57,2	13,7	59,0	48,0	56,0	48,0	9,1	21,1	69,2	78,8	32,4	78,9	20,1	18,0	57,9
	40399 _{mn}	27,5	16,0	23,7	39,9	37,0	39,9	24,5	14,5	27,1	29,3	27,1	32,3	9,8	11,6	26,0
Rv1490	11073 _{mn}	89,1	81,9	86,0	90,9	86,1	90,85	84,6	77,0	92,4	49,9	39,7	53,2	41,5	38,2	76,3
	40401 _{mn}	41,9	21,4	36,7	34,0	19,0	34,0	37,0	21,8	33,4	4,9	2,6	4,2	1,1	1,4	1,4
Rv1911c	37763 _{mn}	82,0	60,9	77,9	72,8	72,4	72,8	74,2	65,8	82,0	86,1	80,7	76,1	81,8	83,0	80,7
	40433 _{mn}	50,4	81,2	49,5	51,3	57,3	51,3	53,6	84,3	54,1	52,2	67,3	60,5	86,9	84,4	78,2
	37765 _{mn}	48,6	31,9	45,5	40,9	42,0	40,9	34,2	59,1	50,7	75,1	55,4	60,4	54,7	37,8	41,3
	40435 _{mn}	33,6	4,3	39,4	22,6	35,3	22,6	3,4	9,9	46,0	56,1	18,8	48,6	9,0	7,9	30,0
	37767 _{mn}	74,7	57,0	76,7	66,0	71,8	66,0	56,5	78,3	72,6	82,5	80,7	77,2	74,5	67,8	70,3
40437 _{mn}	74,1	52,2	76,7	65,4	70,9	65,4	51,3	79,9	73,6	80,0	77,9	80,6	73,6	67,1	75,8	
Rv1980c	36827 _{mn}	28,4	2,8	38,5	23,4	26,8	23,4	2,2	11,0	41,7	56,4	20,4	55,1	12,1	14,7	39,4

Proteína	Péptido	DRβ1														
		14:01	14:03	14:04	14:05	14:06	14:08	14:14	14:25	14:32	15:01	15:02	15:03	16:01	16:04	16:15
	40443 _{mm}	40,9	7,1	42,5	39,9	46,4	39,9	7,8	19,1	43,6	65,5	31,4	64,7	19,5	22,9	45,2
	31107 _{mn}	72,6	74,9	71,5	70,5	73,0	70,5	76,7	83,8	66,8	31,0	26,9	39,5	32,7	35,0	34,5
	40445 _{mm}	23,9	27,1	23,9	31,3	40,8	31,3	12,6	64,0	29,4	43,0	21,9	51,8	44,5	39,8	45,7
Rv2004c	9111 _{mn}	72,3	44,3	77,5	69,3	63,5	69,3	68,1	64,3	75,7	74,8	63,4	60,6	69,1	57,3	52,8
	40439 _{mm}	88,0	59,4	87,4	83,3	82,2	83,3	69,1	53,2	89,2	23,1	10,2	26,5	7,7	8,4	18,3
Rv2270	37775 _{mn}	49,1	47,9	40,7	44,6	61,3	44,6	46,8	72,9	58,1	70,7	58,6	69,1	72,2	73,9	65,3
	40427 _{mm}	25,3	32,7	42,0	15,3	12,1	15,3	22,8	40,4	31,4	40,4	48,5	49,6	67,3	76,3	57,5
	37777 _{mn}	75,9	90,0	77,9	78,9	85,0	78,9	73,4	84,7	74,7	85,6	85,2	88,9	95,0	89,2	89,0
	40429 _{mm}	18,0	26,3	29,1	8,0	7,2	8,0	16,0	30,8	19,7	55,6	71,8	49,4	65,6	70,0	76,7
	37780 _{mn}	81,6	63,4	79,4	73,2	67,3	73,2	53,3	64,7	85,8	28,6	16,3	34,8	39,8	32,4	49,7
	40431 _{mm}	47,8	31,1	51,8	48,1	77,0	48,1	12,1	47,5	62,9	75,8	40,4	78,9	28,6	26,4	71,5
Rv2301c	30960 _{mn}	91,0	86,9	89,5	87,7	94,4	87,7	73,4	76,2	94,8	76,9	88,4	70,1	75,5	73,8	91,9
	40441 _{mm}	86,1	68,7	82,1	80,1	66,5	80,1	76,8	80,1	80,7	12,2	16,9	20,7	26,2	23,2	18,6
Rv2560	11024 _{mn}	88,5	79,4	86,3	82,7	78,9	82,7	82,5	85,7	85,5	39,1	62,2	40,2	65,8	61,0	61,6
	40403 _{mm}	74,5	51,0	72,2	67,8	70,2	67,8	35,9	47,9	73,0	84,6	72,5	83,9	40,0	37,0	63,3
Rv2707	16084 _{mn}	95,0	75,0	95,0	90,0	90,0	90,0	85,0	85,0	95,0	90,0	90,0	90,0	70,0	70,0	70,0
	40405 _{mm}	75,0	40,0	75,0	70,0	75,0	70,0	10,0	85,0	85,0	75,0	22,0	75,0	65,0	70,0	90,0
Rv3166c	16295 _{mn}	85,8	67,8	88,0	85,4	83,4	85,4	67,8	72,8	87,9	92,4	88,2	90,1	73,3	69,3	76,2
	40407 _{mm}	53,2	20,3	54,6	28,9	18,9	28,9	40,5	17,5	46,0	22,7	21,8	27,7	12,7	19,1	10,8
	16298 _{mn}	95,0	91,4	94,0	91,4	90,8	91,4	91,2	92,0	87,5	94,2	90,0	89,1	84,5	79,5	77,5
	40409 _{mm}	75,0	85,0	69,8	78,0	83,1	78,0	73,0	79,5	79,1	92,8	84,9	87,3	84,0	81,8	72,6
	16300 _{mn}	78,4	52,2	82,0	71,0	72,3	71,0	57,7	51,6	87,1	75,7	74,7	73,1	69,8	75,6	88,4
	40411 _{mm}	19,3	6,0	25,2	8,2	5,6	8,2	20,1	5,3	17,4	11,9	14,8	10,4	12,4	15,5	8,2
Rv3494c	38373 _{mn}	76,5	76,4	79,4	71,6	83,0	71,6	64,7	92,4	80,4	95,0	84,3	95,0	83,1	83,3	82,4
	40447 _{mm}	47,6	32,3	50,2	32,2	37,0	32,2	43,3	64,8	41,7	57,2	31,5	43,9	55,0	46,8	40,3
Rv3587c	39265 _{mn}	51,7	44,7	55,1	47,3	49,9	47,3	38,6	47,1	53,9	11,2	16,9	10,8	11,7	15,7	7,9
	39266 _{mn}	58,2	62,4	54,0	61,9	57,6	61,9	60,7	45,5	63,2	52,2	55,9	57,6	49,0	45,6	46,1
Rv3623	16661 _{mn}	58,3	80,0	72,6	54,6	56,2	54,6	50,3	79,8	70,9	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0
	16664 _{mn}	83,4	80,9	85,9	77,4	68,5	77,4	83,3	87,7	86,2	90,7	94,5	86,2	89,6	93,0	84,3
Rv3629	16645 _{mn}	30,5	29,1	23,2	29,1	52,5	29,1	24,4	23,6	31,6	49,5	38,9	52,1	47,1	39,0	45,1
	16646 _{mn}	91,4	91,0	88,6	91,7	86,8	91,7	88,1	94,7	94,1	92,7	82,2	83,0	86,3	81,8	62,5
	40413 _{mm}	28,1	24,0	31,6	16,6	12,1	16,6	36,9	29,0	22,1	48,7	61,4	46,7	33,6	42,9	31,6
Rv3632	39255 _{mn}	73,5	53,0	75,7	71,2	56,4	71,2	53,9	48,0	71,3	12,0	7,8	16,6	13,1	13,2	22,1
	39256 _{mn}	70,7	43,8	67,8	61,9	51,4	61,9	55,4	61,7	65,7	72,0	65,1	77,9	54,3	45,6	43,9

Proteína	Péptido	DRβ3					DRβ4	DRβ5	UNIONES	UD	UF	
		01:01	02:01	02:02	02:09	03:01	01:01	01:01				02:02
Rv0180c	31024 _{mn}	75,3	23,7	41,2	51,0	41,8	29,6	33,3	28,2	5	5	
	40415 _{mm}	40,0	43,5	57,9	65,4	62,6	52,2	45,0	25,8	2	2	
	31025 _{mn}	51,9	74,7	68,6	63,5	51,1	60,8	75,8	69,9	0		
	40417 _{mm}	30,1	77,9	83,6	72,9	71,6	83,6	88,4	89,8	0		

Proteína	Péptido	DR β 3					DR β 4	DR β 5		UNIONES	UD	UF
		01:01	02:01	02:02	02:09	03:01	01:01	01:01	02:02			
	31032 _{mn}	49,6	50,4	27,7	45,8	76,7	73,9	24,8	56,1	2	2	
	40419 _{mn}	53,6	53,8	27,4	37,9	64,3	62,7	26,7	54,3	3	3	
	31039 _{mn}	76,5	73,0	85,5	78,9	64,9	88,2	23,5	19,4	0		
	40421 _{mn}	82,1	82,4	89,2	85,9	75,2	87,4	33,2	19,3	0		
	31028 _{mn}	47,3	80,1	80,2	55,3	72,2	65,3	83,9	82,9	0		
	40423 _{mn}	34,8	17,4	33,5	52,2	40,1	40,7	3,1	0,1	15	13	2
	31044 _{mn}	63,6	47,9	26,7	50,3	78,9	61,2	22,6	51,1	5	4	1
	40425 _{mn}	54,8	15,0	30,6	53,1	42,1	30,3	2,0	0,1	26	18	8
Rv0227c	16945 _{mn}	44,4	71,2	39,8	24,8	61,3	77,6	62,2	70,0	0		
	40391 _{mn}	14,8	63,2	24,3	16,4	41,9	87,3	48,4	80,3	3	3	
	16951 _{mn}	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	0		
	40393 _{mn}	78,9	79,7	44,1	41,4	84,1	91,5	84,4	95,0	0		
	40395 _{mn}	67,9	87,3	72,3	58,9	89,9	88,4	93,0	95,0	0		
Rv0679c	30987 _{mn}	50,6	42,0	55,6	66,4	57,2	66,0	4,0	5,7	2	2	
	40449 _{mn}	32,4	11,3	6,0	17,2	31,9	15,7	4,6	17,3	30	22	8
Rv1268c	37964 _{mn}	93,3	71,5	84,9	83,1	76,0	91,4	84,3	80,8	0		
	40397 _{mn}	93,3	51,8	84,7	74,1	54,4	85,9	94,1	87,9	0		
Rv1411c	37096 _{mn}	30,4	28,6	9,4	7,5	37,0	66,0	18,7	51,2	9	8	1
	40399 _{mn}	35,1	38,9	17,1	17,5	24,7	46,7	16,1	37,6	11	9	2
Rv1490	11073 _{mn}	57,1	81,3	72,1	58,8	87,8	88,4	67,0	71,3	0		
	40401 _{mn}	23,3	17,5	29,6	42,4	47,5	48,8	0,8	0,7	13	8	5
Rv1911c	37763 _{mn}	95,0	57,0	74,4	73,0	67,1	63,0	87,4	88,1	0		
	40433 _{mn}	9,7	77,6	67,4	63,8	52,9	65,6	84,4	85,0	3	3	
	37765 _{mn}	30,6	19,1	27,9	26,8	18,8	56,5	54,5	48,3	0		
	40435 _{mn}	16,9	8,8	2,3	2,0	13,2	39,5	7,9	30,2	22	17	5
	37767 _{mn}	90,1	46,9	53,8	46,5	39,1	80,5	80,3	74,8	0		
	40437 _{mn}	89,2	43,5	49,9	39,9	36,3	83,7	79,5	75,3	0		
Rv1980c	36827 _{mn}	9,8	2,5	0,2	1,1	7,9	57,5	16,1	47,4	19	17	2
	40443 _{mn}	22,1	4,4	0,4	2,1	12,8	65,8	21,2	50,4	8	7	1
	31107 _{mn}	59,1	56,1	65,4	56,7	50,3	38,4	62,7	43,1	1	1	
	40445 _{mn}	18,2	3,1	1,6	2,4	2,1	78,2	62,7	47,1	6	5	1
Rv2004c	9111 _{mn}	63,1	44,3	45,4	50,6	45,8	38,8	59,6	54,5	0		
	40439 _{mn}	67,0	51,3	25,9	48,9	87,1	92,0	32,9	50,8	2	2	
Rv2270	37775 _{mn}	66,7	47,4	48,3	55,3	28,8	47,5	91,7	80,7	0		
	40427 _{mn}	4,8	19,0	19,2	47,0	37,9	59,2	44,7	27,2	4	1	3
	37777 _{mn}	46,7	82,8	81,7	84,3	75,0	52,4	94,5	86,6	0		
	40429 _{mn}	7,1	28,5	40,5	77,8	47,9	48,7	40,9	27,1	9	6	3
	37780 _{mn}	40,8	52,0	47,7	60,0	58,2	2,8	69,9	65,4	5	5	
	40431 _{mn}	18,4	40,3	7,4	5,2	25,3	90,9	32,6	75,6	7	5	2
Rv2301c	30960 _{mn}	83,8	85,5	73,8	51,2	85,0	87,7	84,7	93,6	0		
	40441 _{mn}	94,8	74,2	82,8	78,8	84,3	84,7	76,1	38,9	0		
Rv2560	11024 _{mn}	75,0	76,8	72,6	73,9	84,4	88,6	79,4	71,4	0		
	40403 _{mn}	63,3	61,6	33,2	21,5	54,8	84,3	44,4	74,5	1	1	
Rv2707	16084 _{mn}	95,0	70,0	60,0	75,0	80,0	95,0	70,0	90,0	0		
	40405 _{mn}	12,0	55,0	12,0	11,0	37,0	95,0	65,0	55,0	5	5	

Proteína	Péptido	DRβ3					DRβ4	DRβ5		UNIONES	UD	UF
		01:01	02:01	02:02	02:09	03:01	01:01	01:01	02:02			
Rv3166c	16295 _{mn}	66,4	62,8	51,0	44,7	58,0	79,2	53,4	66,2	0		
	40407 _{mm}	75,8	19,0	26,7	40,3	40,0	29,1	23,5	25,8	8	8	
	16298 _{mn}	91,8	89,4	85,5	82,6	71,9	88,4	89,0	90,1	0		
	40409 _{mm}	87,0	86,6	90,7	77,6	64,8	91,6	89,3	80,9	0		
	16300 _{mn}	74,0	75,0	57,6	71,5	89,6	74,5	77,5	79,9	0		
	40411 _{mm}	46,5	27,0	41,7	39,9	37,0	29,2	17,2	13,7	20	14	6
Rv3494c	38373 _{mn}	74,2	52,2	37,4	40,3	29,1	90,9	86,3	78,0	0		
	40447 _{mm}	17,0	12,8	8,9	16,8	15,4	57,0	62,6	43,6	4	3	1
Rv3587c	39265 _{mn}	13,1	38,5	34,1	30,5	52,0	74,2	10,8	28,8	3	3	
	39266 _{mn}	84,5	59,5	58,8	55,8	60,5	75,7	65,0	53,9	0		
Rv3623	16661 _{mn}	37,1	90,7	86,4	88,7	85,9	93,9	95,0	94,5	3	3	
	16664 _{mn}	86,2	78,2	87,3	95,0	86,7	60,4	69,7	80,1	0		
Rv3629	16645 _{mn}	37,5	34,7	24,0	23,5	31,4	38,3	55,8	66,2	0		
	16646 _{mn}	72,3	70,3	86,3	67,3	75,6	87,0	88,6	90,9	0		
	40413 _{mm}	61,3	34,4	49,3	49,2	42,3	25,8	18,6	20,5	0		
Rv3632	39255 _{mn}	48,8	72,1	57,8	71,6	83,5	56,9	39,0	41,8	1	1	
	39256 _{mn}	85,9	35,0	43,6	49,5	45,3	51,8	55,1	56,8	0		

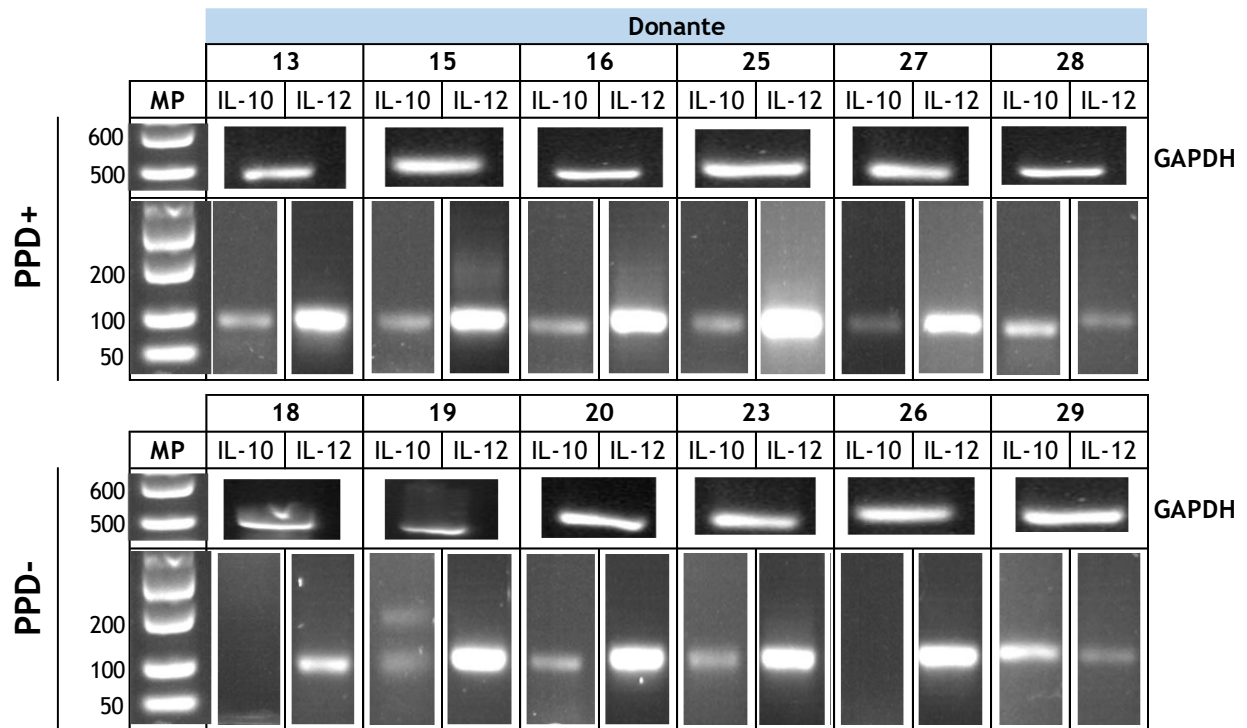
Total 257 206 51

Alelos no frecuentes

Proteína	Péptido	DRβ1					UNIONES	UD	UF
		01:03	04:01	07:11	14:02	16:02			
Rv0180c	31024 _{mn}	62	9,8	55,3	39,9	27	1	1	
	40415 _{mm}	58	56	59	52	55	0		
	31025 _{mn}	74	15	66	55	59	0		
	40417 _{mm}	77	66	71	83	75	0		
	31032 _{mn}	26	21	50	54	17	0		
	40419 _{mm}	19	19	40	43	10,44	0		
	31039 _{mn}	54	69	54	74	38	0		
	40421 _{mm}	74	72	71	81	30	0		
	31028 _{mn}	80	69	72	76	89	0		
	40423 _{mn}	20	35	31	10,9	3,8	1	1	
	31044 _{mn}	12,3	35	26	31	25	0		
Rv0227c	40425 _{mm}	12,6	31	26	10,4	2,1	1	1	
	16945 _{mn}	47	33	19	39	29	0		
	40391 _{mm}	42	51	4,9	37	13	1	1	
	16951 _{mn}	95	95	95	95	95	0		
	40393 _{mm}	63	92	72	69	83	0		
Rv0679c	40395 _{mm}	85	78	88	89	94	0		
	30987 _{mn}	41	63	51	61	29	0		
Rv1268c	40449 _{mm}	4,07	4,2	12,6	7,8	2,8	4	4	
	37964 _{mn}	74	78	93	91	94	0		

Proteína	Péptido	DR β 1					UNIONES	UD	UF
		01:03	04:01	07:11	14:02	16:02			
	40397 _{mm}	87	79	89	82	93	0		
Rv1411c	37096 _{mn}	6,6	45	3,3	20	17	2	2	
	40399 _{mm}	2,9	22	14	24	12,6	0		
Rv1490	11073 _{mn}	32	63	42	85	30	0		
	40401 _{mm}	6,2	29	8,5	20	1,1	3	2	1
Rv1911c	37763 _{mn}	80	80	82	61	92	0		
	40433 _{mm}	90	77	78	64	70	0		
	37765 _{mn}	28	41	18	33	49	0		
	40435 _{mm}	4,1	29	2,9	6,4	8,6	4	4	
	37767 _{mn}	43	76	58	68	75	0		
	40437 _{mm}	42	76	52	59	72	0		
Rv1980c	36827 _{mn}	17	28	14	2,5	11,5	1	1	
	40443 _{mm}	18	37	22	7,7	24	1	1	
	31107 _{mn}	13	63	35	76	27	0		
	40445 _{mm}	32	55	16	12,4	31	0		
Rv2004c	9111 _{mn}	39	36	76	65	70	0		
	40439 _{mm}	29	31	53	62	8	1	1	
Rv2270	37775 _{mn}	62	54	39	46	61	0		
	40427 _{mm}	71	79	82	18	64	0		
	37777 _{mn}	84	42	77	81	80	0		
	40429 _{mm}	91	78	91	12,6	74	0		
	37780 _{mn}	40	25	51	61	31	0		
	40431 _{mm}	10,7	80	3,1	31	25	1	1	
Rv2301c	30960 _{mn}	58	80	71	93	86	0		
	40441 _{mm}	54	35	60	83	22	0		
Rv2560	11024 _{mn}	80	72	64	86	63	0		
	40403 _{mm}	33	56	10,6	47	33	0		
Rv2707	16084 _{mn}	30	59	13	38	35	0		
	40405 _{mm}	8,2	36	0,58	16	4,3	3	2	1
Rv3166c	16295 _{mn}	47	85	44	71	79	0		
	40407 _{mm}	17	24	44	32	19	0		
	16298 _{mn}	82	85	67	90	81	0		
	40409 _{mm}	82	68	74	86	78	0		
	16300 _{mn}	62	76	66	53	69	0		
	40411 _{mm}	10,6	32	16	14	15	0		
Rv3494c	38373 _{mn}	64	85	75	72	89	0		
	40447 _{mm}	37	37	47	30	41	0		
Rv3587c	39265 _{mn}	21	45	34	34	15	0		
	39266 _{mn}	69	28	36	57	36	0		
Rv3623	16661 _{mn}	89	95	85	52	95	0		
	16664 _{mn}	86	85	95	74	93	0		
Rv3629	16645 _{mn}	59	22	16	30	34	0		
	16646 _{mn}	63	74	89	90	86	0		
	40413 _{mm}	46	42	19	30	38	0		
Rv3632	39255 _{mn}	27	45	35	56	10,9	0		

ANEXO 3. Detección de la presencia o ausencia de las citoquinas IL-10 e IL12 en células dendríticas obtenidas a partir de línea mieloide de los 12 donantes PPD.



ANEXO 4. Resumen general de la actividad antigénica e inmunogénica de secuencias peptídicas provenientes de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* con alta capacidad de ser incluidas dentro de un modelo de vacuna contra TB.

Donante	PPD	Proteína	Péptido	Proliferación		Población Linfocitos			Memoria Inmunológica				% Inhibición
				Día	IP	CD4	CD8	CD19	CD62L	CD45RA	CD45RO	Memoria	
D15	+	Rv0227c	16945 mn	5	5,67	59,3	30,5	10,30	35,1	2,47	63,9	TCM	41,6
D18	-	Rv0679c	40450 pm	5	3,89	89,30	38,00	5,12	86,90	3,75	80,00	TCM	37,9
	-	Rv0180c	31044 mn	5	3,81	82,30	29,50	14,40	79,10	2,22	53,50	TCM	37,0
	-		42456 pn	5	2,36	80,70	60,50	9,22	77,40	6,07	65,40	TCM	41,7
	-		40424 pm	5	2,33	69,30	38,10	17,90	58,90	2,66	50,10	TCM	29,6
	-		40426 pm	5	2,84	90,40	25,40	5,62	79,00	3,05	72,10	TCM	34,5
D27	+	Rv0679c	30987 mn	5	3,51	90,30	25,10	90,30	86,70	3,53	74,40	TCM	37,4
				5	3,77	76,30	26,80	21,10	60,20	3,53	64,70	TEM	51,2
D13	+	Rv0679c	40449mm	3	2,53	61,60	8,35	5,24	52,70	2,28	28,10	TCM	28,0
D18	-			5	2,51	64,10	44,40	16,40	61,50	2,99	55,30	TCM	77,4
D25	+			3	2,32	64,80	21,70	2,82	68,10	7,87	56,20	TCM	46,3
D20	-	Rv1411c	37096 mn	5	3,89	67,20	38,30	8,66	77,70	7,26	59,90	TEM	42,0
	-		40399 mm	5	2,90	69,00	44,00	21,60	76,90	8,74	63,10	TEM	33,3
D18	-	Rv1490	40401 mm	5	3,00	82,20	67,30	6,54	77,90	8,20	68,20	TCM	39,5
	-	Rv1911c	37765 mn	5	3,98	68,40	50,30	22,60	67,20	3,63	52,40	TCM	87,2
D23	-			5	6,44	58,20	25,50	9,73	80,60	11,60	50,90	TEM	24,6
D18	-			40435 mm	5	1,89	63,20	49,90	24,60	59,00	4,45	49,60	TCM
	D20	-	5		2,83	75,10	75,90	5,04	84,90	7,16	67,90	TEM	36,4
D23	-	Rv1980c	36827 mn	5	6,68	61,10	33,40	11,60	84,40	19,80	63,20	TEM	46,4
	-		40443 mm	3	4,96	59,20	25,50	5,94	81,70	8,70	69,50	TEM	42,6
D18	-	Rv2004c	40439 mm	3	6,45	78,00	26,60	5,91	76,80	4,98	82,70	TCM	54,4
	-		40440 pm	5	3,14	87,20	25,70	8,99	82,00	2,09	82,40	TCM	69,4
	-	Rv2270	40429 mm	5	1,98	76,50	38,00	13,30	65,00	2,56	40,40	TCM	83,7
	-	40406 pm	40405 mm	5	2,83	70,60	40,30	10,50	57,50	4,05	52,70	TCM	70,0
	-		5	4,87	93,20	20,00	4,62	88,40	2,50	60,40	TCM	86,3	
D15	+	Rv2707	16084 mn	5	4,91	64,8	28,7	8,02	22,1	1,2	68,6	TEM	49,0
D18	-			5	3,89	80,80	51,20	6,81	67,80	6,71	49,10	TCM	53,2
D27	+			5	1,93	77,60	41,40	30,50	72,60	3,42	64,60	TEM	62,2
D18	-	Rv3166c	42452 pn	5	4,02	79,40	69,70	7,16	78,10	4,40	65,30	TCM	46,5
D16	+		5	3,83	63,70	46,60	16,20	63,80	2,00	58,00	TCM	69,1	
D18	-	16300mn	5	2,13	73,00	48,40	16,10	65,00	3,35	51,70	TCM	64,5	

Lo colores en las columnas de la población de linfocitos señala aquellos que mostraron un valor mayor con respecto al basal, verde para el caso de CD4+, amarillo para CD8+ y azul para CD19+.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los procedimientos utilizados en este proyecto se hicieron acatando las normas de laboratorio establecidas en la resolución No. 008430 de 1993 (“Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”) y buenas prácticas clínicas (BPC). Para el Ministerio de Salud colombiana establece en el artículo 11 de la Resolución 2378 de 2008 que este trabajo se clasificó como de riesgo mínimo. Sin embargo, considerando que se tomó muestras de sangren periférica no mayor a 100 mL, extraída por punción venosa del brazo, obedece a llevar a cabo un consentimiento informado según lo establece la resolución 2378 de 2008 en los artículos 14 y 15, el cual se describe a continuación. Cabe la pena mencionar que el estudio sigue los lineamientos jurídicos y éticos contemplados en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (“Principios éticos para la investigación que involucra sujetos humanos”).

Esta investigación será llevada a cabo en las instalaciones de la Fundación instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), la manipulación de células obtenidas de humanos se realizará en un laboratorio de cultivo celular con un nivel de bioseguridad clase II, y la manipulación de la cepa de bacteria *Mtb* H37Rv se realizará en el laboratorio del grupo de Tuberculosis que tiene un nivel de seguridad tipo I, pero la cabina donde se trabaja es de contención tipo II.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

No. _____

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC

“Uso de células dendríticas en la generación de respuesta inmune inducida por péptidos sintéticos derivados de *Mycobacterium tuberculosis*”

Es importante que lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- a. La participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- b. La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica.
- c. Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quién con mucho gusto, le contestará sus preguntas.
- d. CONFIDENCIALIDAD: Los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial y para propósitos exclusivos de investigación científica, de manera que solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos.
- e. De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 (“Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”), este estudio puede ser clasificado como una “Investigación con riesgo mínimo” y se cumplirá con las normas establecidas por el Ministerio de protección social colombiano.
- f. El estudio sigue los lineamientos jurídicos y éticos contemplados en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (“Principios éticos para la investigación que involucra sujetos humanos”).

INFORMACIÓN AL PACIENTE

Justificación y objetivos de la investigación

La tuberculosis es una enfermedad causada por la bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enfermedad sigue siendo uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo, causando aproximadamente dos millones de muertes anualmente. Aunque la enfermedad puede curarse mediante un tratamiento con antibióticos, existen varios problemas que han evitado el control eficiente de la enfermedad, como son: la falta de un diagnóstico oportuno principalmente en las poblaciones más pobres donde la tuberculosis es más frecuente, abandono del tratamiento debido a su larga duración, y el surgimiento de cepas de bacterias resistentes a los medicamentos. Actualmente, solo existe una vacuna contra tuberculosis, capaz de proteger a una parte de la población y en un lapso de tiempo entre 10 y 20 años, por lo cual se hace necesario desarrollar nuevas vacunas y métodos de diagnóstico que sean más rápidos y eficientes, permitiendo disminuir la aparición de nuevos casos de tuberculosis.

En los países del trópico como Colombia, es muy probable que las personas hayan estado en contacto alguna vez con la bacteria; sin embargo, gracias a nuestro sistema inmune responsable de la defensa contra cualquier patógeno, está compuesto por varias células como macrófagos, células dendríticas y linfocitos, importantes para la eliminación de la bacteria y evitan que genere la sintomatología propia de la enfermedad. Por ello el objetivo de este estudio es usar estos monocitos obtenidos de la muestra de sangre para estimularlos y convertirlos en células presentadoras de antígenos (células dendríticas) y así evaluar el efecto que puedan tener respecto a moléculas producidas químicamente en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) que le confieran al individuo una protección *in vitro* contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (lo que NO implica que la persona presente o vaya a tener la enfermedad), este procedimiento será realizado por la estimulación de las células dendríticas a los linfocitos y medido por citometría de flujo, que permitirá evaluar los cambios que se produzcan del ambiente de citoquinas en respuesta por los linfocitos. Además, se llevará un co-cultivo *in vitro* que permitirá evaluar el efecto de los linfocitos primados previamente en el crecimiento de unidades formadoras de colonia (UFC) mediante la infección de macrófagos con el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* (lo que NO implica que la persona presente o vaya a tener la enfermedad).

Por esta razón solicitamos su permiso para:

- Obtener una muestra de sangre de 60 mL a partir de la cual se evaluará el estímulo para la obtención de células dendríticas y su posterior maduración con los péptidos sintéticos; además de esta muestra se evaluarán los linfocitos y su capacidad de proliferar respecto al estímulo de las moléculas sintetizadas.
- Obtener una muestra de sangre de 40 mL luego de 9 días de transcurrida la primera toma de muestra con la finalidad de obtener los macrófagos y linfocitos para llevar a cabo la prueba *in vitro* concerniente al efecto del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

A partir de este estudio se pretende determinar la importancia de estas moléculas sintetizadas químicamente que corresponden a secuencias de proteínas de membrana involucradas en la interacción del patógeno y la célula hospedera, para contribuir en el desarrollo de una vacuna contra tuberculosis.

Procedimiento

Si usted es mayor de 18 años y está de acuerdo en participar en este estudio, se le solicitará la donación de 100 mL de sangre de la vena de su brazo. La sangre será tomada por personal de la salud especializado, a partir de dos tomas de muestra que corresponde al día 0 y día 9.

Una vez obtenida la muestra de sangre en tubos heparinizados de 10mL, ésta será procesada por personal del laboratorio de investigaciones de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), con el fin de alcanzar los propósitos antes descritos.

Molestias o Riesgos

Los riesgos que existen al aceptar participar en este estudio son mínimos, pues solo son causados por la toma de la muestra de sangre. Producto de la toma de la muestra de sangre se puede presentar dolor o enrojecimiento en el área de la veno-punción, y ocasionalmente algunas personas pueden presentar sensación de mareo del cual la persona se recuperará rápidamente con algo de reposo. La toma de la muestra se hará bajo condiciones de estricta limpieza para evitar el riesgo de infección.

Beneficios

Su participación en este estudio no será objeto de remuneración alguna, ni tiene ningún costo para usted. Su participación en este estudio es una contribución al desarrollo del conocimiento de posible utilidad en el desarrollo de una vacuna contra la tuberculosis.

Confidencialidad

Los resultados de este estudio ingresarán a la base de datos y serán confidenciales. Si la información derivada del estudio se publica o presenta en reuniones científicas, no se usará su nombre ni ningún otro tipo de información personal, en su lugar se utilizará códigos. Su información personal y resultados serán mantenidas con total confidencialidad. La información acerca de usted no será compartida ni entregada a nadie, excepto a entidades de control y vigilancia que podrían tener acceso a esta información con fines de garantizar el adecuado manejo de la información y desarrollo del estudio.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Recibí una copia de cada una de las cuatro páginas de este formulario. Las he leído (o me fueron leídas), he entendido la información y me han respondido claramente las preguntas e inquietudes acerca de los asuntos relacionados con la investigación. Además, mi participación en este estudio es totalmente voluntaria y tengo el derecho de abandonarlo en cualquier momento y por cualquier razón, sin que esta decisión afecte mi atención médica futura en esta institución.

Por lo anterior estando en pleno uso de mis facultades acepto participar voluntariamente en este estudio y autorizo la toma de 100mL de sangre periférica por punción venosa, firmando este documento: SI ____ NO ____

Apellidos

Nombres

Firma
C.C.

Documento de identidad
Tel:

Testigos:

HE LEÍDO CON EXACTITUD, O HE SIDO TESTIGO DE LA LECTURA EXACTA DEL DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PARTICIPANTE Y EL INDIVIDUO HA TENIDO LA OPORTUNIDAD DE HACER PREGUNTAS. CONFIRMO QUE EL INDIVIDUO HA DADO CONSENTIMIENTO LIBREMENTE.

Apellidos y Nombres
C.C.
Teléfono:

Firma del **Testigo 1**
Dirección:

Relación con el Paciente: _____

Apellidos y Nombres
C.C.
Teléfono:

Firma del **Testigo 2**
Dirección:

Relación con el Paciente: _____

Firma del Investigador que administra el consentimiento

Bogotá, DC, día _____, del mes de _____, del año _____.

Si tiene cualquier pregunta acerca de este estudio puede comunicarse con la Dra Marisol Ocampo en Bogotá al teléfono 3244672 extensión 137.

CONSIDERACIONES AMBIENTALES

Los elementos corto punzantes serán colectados en contenedores rígidos de paredes imperforables (guardianes); las cajas de cultivo, pipetas, guantes y demás material de laboratorio serán recolectadas en bolsas rojas de material biológico, según las indicaciones establecidas por el Ministerio de la Protección Social (resolución No. 008430 de 1993), para finalmente ser descartados por la empresa ECOCAPITAL contratada por la Fundación instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC para dicha actividad.

Teniendo en cuenta las características patogénicas de *M tuberculosis* H37Rv se deben mantener 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, lo cual cumple con un laboratorio de contención nivel I. Los derivados biológicos obtenidos de la manipulación del co-cultivo serán inactivados mediante tratamiento con fenol al 5% por 3 minutos y esterilización por vapor a presión en la autoclave a 121 °C y 2 atmósferas 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.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abebe F, Bjune G. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(2):235-43.
2. Gagneux S, P. S. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(5):328-37.
3. Coscolla M, S. G. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in Immunology* 2014;26(6):431-44.
4. WHO. Global Tuberculosis Report 2020. 2020.
5. Mashael Al-Saeedi., Al-Hajoj S. Diversity and evolution of drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Drug Resist*. 2017;10:333-42.
6. Palomino JC, Martin A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*. 2014;3:317-40.
7. Dockrell HM, Smith SG. What Have We Learnt about BCG Vaccination in the Last 20 Years? *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1134.
8. Moliva J, Turner J, Torrelles J. Prospects in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette et Guérin (BCG) vaccine diversity and delivery: why does BCG fail to protect against tuberculosis? *Vaccine*. 2015;33(39):5035-41.
9. Hatherill M, Tait D, McSha H. Clinical Testing of Tuberculosis Vaccine Candidates. *Microbiology Spectrum*. 2016;4(5).
10. AERAS. Global Clinical Portfolio of TB Vaccine Candidates. 2020.
11. Ocampo M, Patarroyo M, Vanegas M, Alba M, Patarroyo M. 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.
12. Rodríguez DC, Ocampo M, Reyes C, Arévalo-Pinzón G, Muñoz M, Patarroyo MA, et al. Cell-Peptide Specific Interaction Can Inhibit *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Infection. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2015;117:946-58.
13. Díaz D, Ocampo M, Varela Y, Curtidor H, Patarroyo M, Patarroyo M. Identifying and characterising PPE7 (Rv0354c) high activity binding peptides and their role in inhibiting cell invasion. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017;430(1-2):149-60.
14. Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo M, Patarroyo M. 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.

15. Carabali-Isajar M, Ocampo M, Rodriguez D, Vanegas M, Curtidor H, Patarroyo M, et al. Towards designing a synthetic antituberculosis vaccine: The Rv3587c peptide inhibits mycobacterial entry to host cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;36(9):2401-9.
16. Patarroyo ME, Cifuentes G, Bermúdez A, Patarroyo MA. Strategies for developing multi-epitope, subunit-based, chemically synthesized anti-malarial vaccines. *Molecular Immunology*. 2008;12:1915-35.
17. Curtidor H, Reyes C, Bermúdez A, Vanegas M, Varela Y, Patarroyo ME. Conserved Binding Regions Provide the Clue for Peptide-Based Vaccine Development: A Chemical Perspective. *molecules*. 2017;22:2199.
18. Patarroyo M, Bermúdez A, Alba M, Vanegas M, Moreno-Vranich A, Poloche L, et al. IMPIPS: The Immune Protection-Inducing Protein Structure Concept in the Search for Steric-Electron and Topochemical Principles for Complete Fully-Protective Chemically Synthesised Vaccine Development. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0123249.
19. Ahsan M. Recent advances in the development of vaccines for tuberculosis. *Therapeutic Advances in Vaccines*. 2015;3(3):66-75.
20. Dalmia N, Ramsay AJ. Prime–boost approaches to tuberculosis vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(10):1221-33.
21. Goldberg M, Saini N, Porcelli S. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. *American Society for Microbiology*. 2014;2(5).
22. Patarroyo ME, Bermúdez A, Patarroyo MA. Structural and Immunological Principles Leading to Chemically Synthesized, Multiantigenic, Multistage, Minimal Subunit-Based Vaccine Development. *Chemical Reviews*. 2011;111:3459-507.
23. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging Rules for Subunit-Based, Multiantigenic, Multistage Chemically Synthesized Vaccines. *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH*. 2008;41(3):377-236.
24. Stewart G, Robertson B, Young D. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(2):97-105.
25. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:581-91.
26. Baena A, Porcelli SA. Evasion and subversion of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tissue Antigens*. 2009;74(3):189-204.
27. van Crevel R, Ottenhoff T, van der Meer J. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):294-309.
28. Mantilla Galindo A, Ocampo M, Patarroyo M. Experimental models used in evaluating anti-tuberculosis vaccines: the latest advances in the field. *Expert Review of Vaccines*. 2019;18(4):365-377.

29. Orr M, Ireton G, Beebe E, Huang PW, Reese V, Argilla D, et al. Immune subdominant antigens as vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Immunology*. 2014;193(6):2911-8.
30. Tameris M, Hatherill M, Landry B, Scriba T, Snowden M, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2013;381(9871):1021-8.
31. Doherty T, Olsen A, Weischenfeldt J, Huygen K, D'Souza S, Kondratieva T, et al. Comparative analysis of different vaccine constructs expressing defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 2004;190(12):2146-53.
32. Demangel C, Bean A, Martin E, Feng C, Kamath A, Britton W. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin-infected dendritic cells. *Eur J Immunol*. 1999;29(6):1972-9.
33. Rubakova E, Petrovskaya S, Pichugin A, Khlebnikov V, McMurray D, Kondratieva E, et al. Specificity and efficacy of dendritic cell-based vaccination against tuberculosis with complex mycobacterial antigens in a mouse model. *Tuberculosis*. 2007;87(2):134-44.
34. García J, Puentes A, Rodríguez L, Ocampo M, Curtidor H, Vera R, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2536 protein implicated in specific binding to human cell lines. *Protein Science*. 2005;14(9):2236-45.
35. Forero M, Puentes A, Cortés J, Castillo F, Vera R, Rodríguez L, et al. Identifying putative *Mycobacterium tuberculosis* Rv2004c protein sequences that bind specifically to U937 macrophages and A549 epithelial cells. *Protein Science*. 2005;14(11):2767-80.
36. Vera-Bravo R, Torres E, Valbuena J, Ocampo M, Rodriguez L, Puentes A, et al. Characterising *Mycobacterium tuberculosis* Rv1510c protein and determining its sequences that specifically bind to two target cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;332(3):771-81.
37. Chapeton-Montes J, Plaza D, Curtidor H, Forero M, Vanegas M, Patarroyo M, et al. Characterizing the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2707 protein and determining its sequences which specifically bind to two human cell lines. *Protein Science*. 2008;17(2):342-51.
38. Plaza D, Curtidor H, Patarroyo M, Chapeton-Montes J, Reyes C, Barreto J, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* membrane protein Rv2560--biochemical and functional studies. *The FEBS journal*. 2007;274(24):6352-64.
39. Patarroyo M, Curtidor H, Plaza D, 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.
40. Patarroyo M, Plaza D, Ocampo M, Curtidor H, Forero M, Rodriguez L, et al. Functional characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv2969c membrane protein. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;372(4):935-40.

41. Cifuentes D, Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Forero M, Patarroyo M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0679c protein sequences involved in host-cell infection: potential TB vaccine candidate antigen. *BMC Microbiology*. 2010.
42. Cáceres S, Ocampo M, Arévalo-Pinzón G, Jimenez R, Patarroyo M, Patarroyo M. 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.
43. Ocampo M, Aristizábal-Ramírez D, Rodríguez D, Muñoz M, Curtidor H, Vanegas M, et al. The role of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3166c protein-derived high-activity binding peptides in inhibiting invasion of human cell lines. *Protein engineering*. 2012;25(5):235-42.
44. Ocampo M, Rodríguez D, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo M, Patarroyo M. Peptides derived from *Mycobacterium tuberculosis* Rv2301 protein are involved in invasion to human epithelial cells and macrophages. *Amino Acids*. 2012;42(6):2067-77.
45. Rodríguez D, Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo M, Patarroyo M. *Mycobacterium tuberculosis* surface protein Rv0227c contains high activity binding peptides which inhibit cell invasion. *Peptides*. 2012;38(2):208-16.
46. OPS-OMS. Situación del control de la Tuberculosis en las Américas; 2021.
47. Maltempe FG, Caleffi-Ferracioli KR, Ribeiro RC, de Oliveira D, F., Dias Siqueira VL, Regiane LS, et al. Activity of rifampicin and linezolid combination in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2017;104:24-9.
48. Bertholet S, Ireton G, Ordway D, Windish H, Pine S, Kahn M, et al. A defined tuberculosis vaccine candidate boosts BCG and protects against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med*. 2010;2(53):53ra74.
49. INS. Boletín informativo semanal. Semana 16. 2021.
50. Forrellad MA. KL, Gioffré A. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013;4(1): 3–66.
51. Maitra A. MT, HealyCell J. Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(5): 548–575.
- 52 Kaur I. GM, Skovierová H. Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Appl Microbiol*. 2009;69:23-78
53. Kieser KJ, Rubin EJ. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12:550-62
54. Forrellad MA. KL, Gioffré A. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013;4(1): 3–66.

55. SH K. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? Nature reviews Immunology. Nat Rev Immunol 2001;1(1):20-30.
56. Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. Seminars in Immunology. 2004;16(1):35-41.
57. Harding CV, Boom WH. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. Nat Rev Microbiol. 2010;8(4):296-307.
58. Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg B, Bourhis LL, de Jong DJ, Langenberg DML, et al. NOD2 and Toll-Like Receptors Are Nonredundant Recognition Systems of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 2005;1(3):e34.
59. Pandey AK, Yang Y, Jiang Z, Fortune SM, Coulombe F, Behr MA, et al. NOD2, RIP2 and IRF5 Play a Critical Role in the Type I Interferon Response to *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 2009;5(7):e1000500.
60. Coulombe F, Divangahi M, Veyrier F, de Léséleuc L, Gleason JL, Yang Y, et al. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. journal of Experimental Medicine. 2009.
61. Awuh JA, Flo TH. Molecular basis of mycobacterial survival in macrophages. Cellular and molecular life sciences. 2016;74(9):1625-48.
62. Mogue T, Goodrich M, Ryan L, LaCourse R, North R. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J Exp Med. 2001;193(3):271-80.
63. Pai M, Behr M, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme C et al. Tuberculosis. Nature Reviews Disease Primers. 2016;2(1).
64. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. Nature Reviews Immunology. 2012;12(5):352-366.
65. Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J, et al. Depletion of Cd4+ T Cells Causes Reactivation of Murine Persistent Tuberculosis despite Continued Expression of Interferon γ and Nitric Oxide Synthase 2. J Exp Med. 2000;192(3):347-58.
66. Repique C, Li A, Brickey W, Ting J, Collins F, Morris S. Susceptibility of mice deficient in the MHC class II transactivator to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol. 2003;58(1):15-22.
67. Bürdek M, Spranger S, Wilde S, Frankenberger B, Schendel DJ, Geiger C. Three-day dendritic cells for vaccine development: Antigen uptake, processing and presentation. J Transl Med. 2010;8:90.
68. Hajam IA, Dar PA, Appavoo E, Kishore S, Bhanuprakash V, Ganesh K. Bacterial Ghosts of *Escherichia coli* Drive Efficient Maturation of Bovine Monocyte-Derived Dendritic Cells. PLoS ONE. 2015;10(12):e0144397.

69. Griffiths KL, Ahmed M, Das S, Gopal R, Horne W, Connell TD, et al. Targeting dendritic cells to accelerate T-cell activation overcomes a bottleneck in tuberculosis vaccine efficacy. *Nature communications*. 2016.
70. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*. 2007;26(4):503-17.
71. Dauer M, Schad K, Herten J, Junkmann J, Bauer C, Kiefl R, et al. FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *J Immunol Methods*. 2005;302(1-2):145-55.
72. Mailliard R, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens C, Kapsenberg M, et al. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res*. 2004;64(17):5934-7.
73. Bernal-Estevez DA, Tovar-Murillo DR, Parra- Lopez CA. Functional and Phenotypic Analysis of Two-Day Monocyte-Derived Dendritic Cells Suitable for Immunotherapy Purposes. *SOJ Immunology*. 2016;4(21):1-18.
74. Wegner J, Hackenberg S, Scholz C, Chuvpilo S, Tyrsin D, Matskevich A, et al. High-density preculture of PBMCs restores defective sensitivity of circulating CD8 T cells to virus- and tumor-derived antigens. *Blood*. 2015;126(2):185-94.
75. Martinuzzi E, Afonso G, Gagnerault M-C, Naselli G, Mittag D, Combadière B, et al. Accelerated co-cultured dendritic cells (acDCs) enhance human antigen-specific T-cell responses. *Blood*. 2011;118(8):2128-37.
76. Verdijk P, van Veelen PA, de Ru. AH, Hensbergen PJ, Mizuno K, Koerten HK, et al. Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane. *Eur J Immunol*. 2004;34(1):156-64.
77. Sherman M, Weber D, Spotts E, Moore J, Jensen P. Inefficient peptide binding by cell-surface class II MHC molecules. *Cell Immunol*. 1997;182(1):1-11.
78. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med*. 1997;185(2):317-28.
79. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(1):10-6.
80. Rutella S, Danese S, G. L. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood*. 2006;108(5):1435-40.
81. Shinde P, Fernandes S, Melinkeri S, Kale V, Limaye L. Compromised functionality of monocyte-derived dendritic cells in multiple myeloma patients may limit their use in cancer immunotherapy. *Nature*. 2018;8:5705.

82. Barratt-Boyes SM, Zimmer MI, Harshyne LA, Meyer EM, Watkins SC, Capuano III S, et al. Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. *J Immunol.* 2000;164(5):2487-95.
83. Zimmer M, Larregina A, Castillo C, Capuano S, Falo LJ, Murphey-Corb M, et al. Disrupted homeostasis of Langerhans cells and interdigitating dendritic cells in monkeys with AIDS. *Blood.* 2002;99(8):2859-68.
84. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* 1995;182(2):389-400.
85. Majlessi L, Benoit C, Albrecht I, García JE, Nouze C, Pieters J, et al. Inhibition of Phagosome Maturation by Mycobacteria Does Not Interfere with Presentation of Mycobacterial Antigens by MHC Molecules. *Journal Immunology.* 2007;179(3):1825-33.
86. Steinman RM, Turley S, Mellman I, K. I. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med.* 2000;191(3):411-6.
87. Santambrogio L, Sato AK, Carven GJ, Belyanskaya SL, Strominger JL, Stern LJ. Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *PNAS.* 1999;96(26):15056-61.
88. Rosalia RA, Quakkelaar ED, Redeker A, Khan S, Camps M., Drijfhout JW, et al. Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *Eur J Immunol.* 2013;43:2554-65.
89. Sallusto F, Geginat J, A. L. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745-63.
90. Moser JM, Sassano ER, Leistritz del C, Eatrides JM, Phogat S, Koff W, et al. Optimization of a dendritic cell-based assay for the in vitro priming of naïve human CD4+ T cells. *J Immunol Methods.* 2010;353(1-2):8-19.
91. Mackey MF, Barth RJ Jr, RJ. N. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol* 1998;63(4):418-28.
92. Krowka JF, Cuevas B, Maron DC, Steimer KS, Ascher MS, . SH. Expresión de CD69 después de la estimulación in vitro: un método rápido para cuantificar las respuestas de linfocitos alterados en individuos infectados por el VIH. *J Adquirir inmunodeficiencia Syndr Hum Retrovirol.* 1996;11(1):95-104.
93. González-Amaro R., Cortés JR, Sánchez-Madrid F, P. M. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med.* 2013;19(10):625-32.

94. Bernal-Estévez DA. Evaluación de la capacidad inmuno-estimulante de la terapia neoadyuvante con Doxorubicina Ciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama: Universidad Nacional de Colombia; 2017.
95. Quah B. PC. The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *J Vis Exp.* 2010;(44): 2259
96. Parish CR. GM, Quah B. . Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. . *Curr Protoc Immunol.* 2009;Chapter 4:Unit4.9.
97. Zhou Juhua, Nagarkatti P, Zhong Y, Nagarkatti M. Characterization of T-Cell Memory Phenotype after In Vitro Expansion of Tumor-infiltrating Lymphocytes from Melanoma Patients. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4099-109.
98. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory and effector memory CD4+ T cells. *Pathol Biol (Paris).* 2003;51(2):64-6.
99. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, A. L. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6574):708-12.
100. Gattinoni L. RN. Moving T memory stem cells to the clinic. *Blood.* 2013;121(4):567.
101. Jenkins MK, JJ. M. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol.* 2012;188(9):4135-40.
102. Zhu J, Yamane H, WE. P. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89.
103. Muranski P, Restifo N. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood.* 2013;121(13):2402-14.
104. 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. . *Cell Mol Immunol.* 2010;7(3):182-9.
105. Zhu J, WE. P. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008;112(5):1557-69.
106. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, DE. S. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol.* 2015;6:310.
107. L.S.K. W. PD-1 and CTLA4: Two checkpoints, one pathway? *Europe PMC Funders Group.* 2017;2(11).
108. Walker LS, DM. S. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(12):852-63.

109. Kopf, M., Coyle, A. J., Schmitz, N., Barner, M., Oxenius, A., Gallimore, A., et al. (2000). Inducible costimulator protein (99) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J. Exp. Med.* 192, 53–61.
110. Herman, A. E., Freeman, G. J., Mathis, D., and Benoist, C. (2004). CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J. Exp. Med.* 199, 1479–1489.
111. Rottman, J. B., Smith, T., Tonra, J. R., Ganley, K., Bloom, T., Silva, R., et al. (2001). The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat. Immunol.* 2, 605–611.
112. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory Molecules on Immunogenic Versus Tolerogenic Human Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology.* 2013;4.
113. Fillatreau S, Gray D. T Cell Accumulation in B Cell Follicles Is Regulated by Dendritic Cells and Is Independent of B Cell Activation. *Journal of Experimental Medicine.* 2003;197(2):195-206.
114. B Wagner, L Fattorini, M Wagner, S H Jin, R Stracke, G Amicosante, et al. Antigenic properties and immunoelectron microscopic localization of *Mycobacterium fortuitum* beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1995;39:3739-45.
115. Boggiano C, Eichelberg K, Ramachandra L, Shea J, Ramakrishnan L, Behar S, et al. "The Impact of *Mycobacterium tuberculosis* Immune Evasion on Protective Immunity: Implications for TB Vaccine Design"- Meeting report. *Vaccine.* 2017;35.
116. Usman MM. IS, Teoh TC. Vaccine research and development: tuberculosis as a global health threat. *Central-European journal of immunology. Cent Eur J Immunol.* 2017;42(29): 196–204.
117. Poyntz HC. SE, Griffiths KL. Non-tuberculous mycobacteria have diverse effects on BCG efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2014;94:226–237
118. Moliva JI. TJ, Torrelles JB. Prospects in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette et Guérin (BCG) vaccine diversity and delivery: why does BCG fail to protect against tuberculosis? *Vaccine.* 2015;22; 33 (39):5035-41
119. Vizcaíno C, Restrepo-Montoya D, Rodríguez D, Niño LF, Ocampo M, e. a. Computational Prediction and Experimental Assessment of Secreted/ Surface Proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *PLoS Comput Biol.* 2010;6(6).
120. Restrepo-Montoya D, Vizcaino C, Nino LF, Ocampo M, Patarroyo ME, MA. P. Validating subcellular localization prediction tools with mycobacterial proteins. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:134.

121. Li W, Cowley A, Uludag M, Gur T, McWilliam H, Squizzato S, et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W580-4.
122. Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 2005;33.
123. Gardy JL, Laird MR, Chen F, Rey S, Walsh CJ, Ester M, et al. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics.* 2005;21(5):617-23.
124. Kuo-Chen Chou, &, Hong-Bin Shen. "Cell-PLoc: A package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms". *Nature Protocols.* 2008;3:153-62.
125. Hong-Bin Shen, &, Kuo-Chen Chou. Gpos-PLoc: an ensemble classifier for predicting subcellular localization of Gram-positive bacterial proteins. *Protein Engineering, Design and Selection.* 2007;20:39-46.
126. Rashid M, Saha S, R G. Support Vector Machine-based method for predicting subcellular localization of mycobacterial proteins using evolutionary information and motifs. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:337.
127. Jannick Dyrlov Bendtsen, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijne, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol.* 2004;340:783-95.
128. Jannick Dyrlov Bendtsen, Henrik Nielsen, David Widdick, Tracy Palmer, Brunak S. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics.* 2005;6:167.
129. Agnieszka S.Juncker, Hanni Willenbrock, Gunnar von Heijne, Søren Brunak, Henrik Nielsen, Anders Krogh. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* 2003;12(8):1652-62.
130. Bendtsen JD, Kiemer L, Fausboll A, Brunak S. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* 2005;5:58.
131. Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology.* 1998;6:175-82.
132. Käll L, Krogh A, Sonnhammer. ELL. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Research.* 2007;35:429-32.
133. Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology.* 2005;15(2):153-64.
134. Yubin Xie, Yueyuan Zheng, Hongyu Li, Xiaotong Luo, Zhihao He, Shuo Cao, et al. GPS-Lipid: a robust tool for the prediction of multiple lipid modification sites. *Scientific Reports.* 2016;6.

135. Larsen JEP, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research*. 2006;2(2).
136. Jones D. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 1999;292:195-202.
137. Lawrence A Kelley, Stefans Mezulis, Christopher M Yates, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*. 2015;10:845-58.
138. Bienert S, Waterhouse A, de Beer TA, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, et al. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic Acids Research*. 2017;45:313-19.
139. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*. 2014;42:252-58.
140. Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput Mol Sci*. 2013;3:198-210.
141. Damian Szklarczyk, John H Morris, Helen Cook, Michael Kuhn, Stefan Wyder, Milan Simonovic ea. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D362-D8.
142. 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*. 2012;40(2):117-45.
143. Merrifield R. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 1963;85(14):2149-54.
144. Sreerama N., RW. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*. 2000;15:252-60.
145. Ocampo M, Patarroyo MA, Vanegas M, Alba MP, ME. P. Functional, biochemical and 3D studies of Mycobacterium tuberculosis protein peptides for an effective anti-tuberculosis vaccine. *Critical Reviews in Microbiology* 2013;40(2).
146. Bermudez LE, Goodman J. Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells. *Infection and Immunity*. 1996;64(4):1400-06.
147. Luiz E. Bermudez, Felix J. Sangari, Peter Kolonoski, Mary Petrofsky, Goodman. J. The Efficiency of the Translocation of Mycobacterium tuberculosis across a Bilayer of Epithelial and Endothelial Cells as a Model of the Alveolar Wall Is a Consequence of Transport within Mononuclear Phagocytes and Invasion of Alveolar Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. 2002;70(1):140-46.

148. Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand W, Peters B, Nielsen M. Improved Prediction of MHC II Antigen Presentation through Integration and Motif Deconvolution of Mass Spectrometry MHC Eluted Ligand Data. *Journal of Proteome Research*. 2020;19(6):2304-2315.
149. Coscolla M, Gagneux aS. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in Immunology*. 2014;26:431-44.
150. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. Human Press. 2007:571-607.
151. JackKyte F, Doolittle R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*. 1982;157(1):105-32.
152. Shen HB, KC. C. Gpos-mPLOC: a top-down approach to improve the quality of predicting subcellular localization of Gram-positive bacterial proteins. . *Protein and peptide letters*. 2009;16(12):1478-84.
153. Chen J., Liu H., Yang J., Chou K-C. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *AminoAcids*. 2007;33:423-8.
154. 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(0):641-50.
155. Kelly SM, Jess TJ, NC. P. How to study proteins by circular dichroism. . *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;10:119-39.
156. Hajam I, Dar P, Appavoo E, Kishore S, Bhanuprakash V, Ganesh K. Bacterial Ghosts of *Escherichia coli* Drive Efficient Maturation of Bovine Monocyte-Derived Dendritic Cells. *PLOS ONE*. 2015;10(12):e0144397.
157. Sánchez-Barinas C, Ocampo M, Vanegas M, Castañeda-Ramirez J, Patarroyo M, Patarroyo M. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv LpqG Protein Peptides Can Inhibit Mycobacterial Entry through Specific Interactions. *Molecules*. 2018;23(3):526.
158. Sánchez-Barinas C, Ocampo M, Tabares L, Bermúdez M, Patarroyo M, Patarroyo M. Specific Binding Peptides from Rv3632: A Strategy for Blocking *Mycobacterium tuberculosis* Entry to Target Cells?. *BioMed Research International*. 2019;2019:1-13.
159. H. Škovierová, G. Larrouy-Maumus, H. Pham et al., "Biosynthetic origin of the galactosamine substituent of arabinogalactan in *Mycobacterium tuberculosis*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 53, pp. 41348–41355, 2010.
160. Jacobs AJ, Juthathip Mongkolsapaya, Gavin R. Screaton, Helen McShane, aRJ. W. Antibodies and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016;101:102-3.

161. Patarroyo ME, Bermúdez A, MA. P. Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. *Chemical Reviews* 2011.
162. Curtidor H, Patarroyo M, Patarroyo MA. Recent advances in the development of a chemically synthesised anti-malarial vaccine. *Expert Opin Biol Ther* 2015; 40(29):117-45.
163. Carabali-Isajar M, Ocampo M, Varela Y, Díaz-Arévalo D, Patarroyo M, Patarroyo M. Antibodies targeting Mycobacterium tuberculosis peptides inhibit mycobacterial entry to infection target cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;161:712-720.
164. Bürdek M, Spranger S, Wilde S, Frankenberger B, Schendel D, Geiger C. Three-day dendritic cells for vaccine development: Antigen uptake, processing and presentation. *Journal of Translational Medicine*. 2010;8(1):90.
165. Delgado G, Granados D. Células Dendríticas (CDs) diferenciadas a partir de Monocitos humanos como herramienta para el estudio de agentes antileishmaniales. *Nova*. 2008;6(10):162.
166. Lubong Sabado R, Kavanagh D, Kaufmann D, Fru K, Babcock E, Rosenberg E et al. In Vitro Priming Recapitulates In Vivo HIV-1 Specific T Cell Responses, Revealing Rapid Loss of Virus Reactive CD4+ T Cells in Acute HIV-1 Infection. *PLoS ONE*. 2009;4(1):e4256.
167. Parra D, Rieger A, Li J, Zhang Y, Randall L, Hunter C et al. Pivotal Advance: Peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011;91(4):525-536.
168. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by trans-Presenting Interleukin 15. *Immunity*. 2007;26(4):503-517.
169. Schlienger K, Craighead N, Lee K, Levine B, June C. Efficient priming of protein antigen-specific human CD4+ T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2000;96(10):3490-3498.
170. López C, Yepes-Pérez Y, Díaz-Arévalo D, Patarroyo M, Patarroyo M. The in Vitro Antigenicity of Plasmodium vivax Rhoptry Neck Protein 2 (PvRON2) B- and T-Epitopes Selected by HLA-DRB1 Binding Profile. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018;8.
171. Rosalia R, Quakkelaar E, Redeker A, Khan S, Camps M, Drijfhout J et al. Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *European Journal of Immunology*. 2013;43(10):2554-2565.
172. Davoust J, Banchereau J. Naked antigen-presenting molecules on dendritic cells. *Nature Cell Biology*. 2000;2(3):E46-E48.
173. Santambrogio L, Sato A, Carven G, Belyanskaya S, Strominger J, Stern L. Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(26):15056-15061.
174. Brinke A, Trzonkowska N, Mansilla MJ, Turksma AW, Piekarska K, et al. Monitoring T-Cell Responses in Translational Studies: Optimization of Dye-Based Proliferation Assay for Evaluation of Antigen-Specific Responses. *Front Immunol* 2017.
175. Kaufmann SH . Libro de Abbas *Lancet* 2010; 375:2110-19.

176. Yoon H, Kim TS, Braciale TJ. The Cell Cycle Time of CD8+ T Cells Responding In Vivo Is Controlled by the Type of Antigenic Stimulus. *PLoS One* 2010; 5(11): e15423.

177. Davoust J, Banchereau J. Naked antigen-presenting molecules on dendritic cells. *Nature Cell Biology*. 2000;2(3):E46-E48.