

Evaluación de la función efectora de linfocitos T activados por péptidos provenientes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en macrófagos infectados por el patógeno



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

Valentina Vergara Vanegas

DIRIGO POR:

Mary Lilián Carabalí Isajar, cPhD.

Christian David Sánchez Barinas, MSc Bioquímica.

Susan Lorena Castro Molina, MSc Microbiología.



Bogotá, Mayo 2021

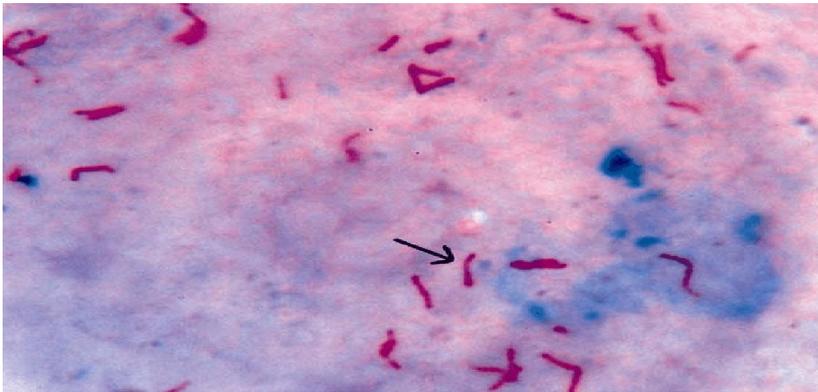
TABLA DE CONTENIDO

1. MARCO TEÓRICO
2. ANTECEDENTES
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
4. OBJETIVOS
5. METODOLOGÍA
6. RESULTADOS
7. CONCLUSIONES

TUBERCULOSIS

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis



https://www.researchgate.net/publication/236166795_Antimicrobials_of_plant_origin_against_TB_and_other_infections_and_Economics_of_plant_drugs_-_Introspection

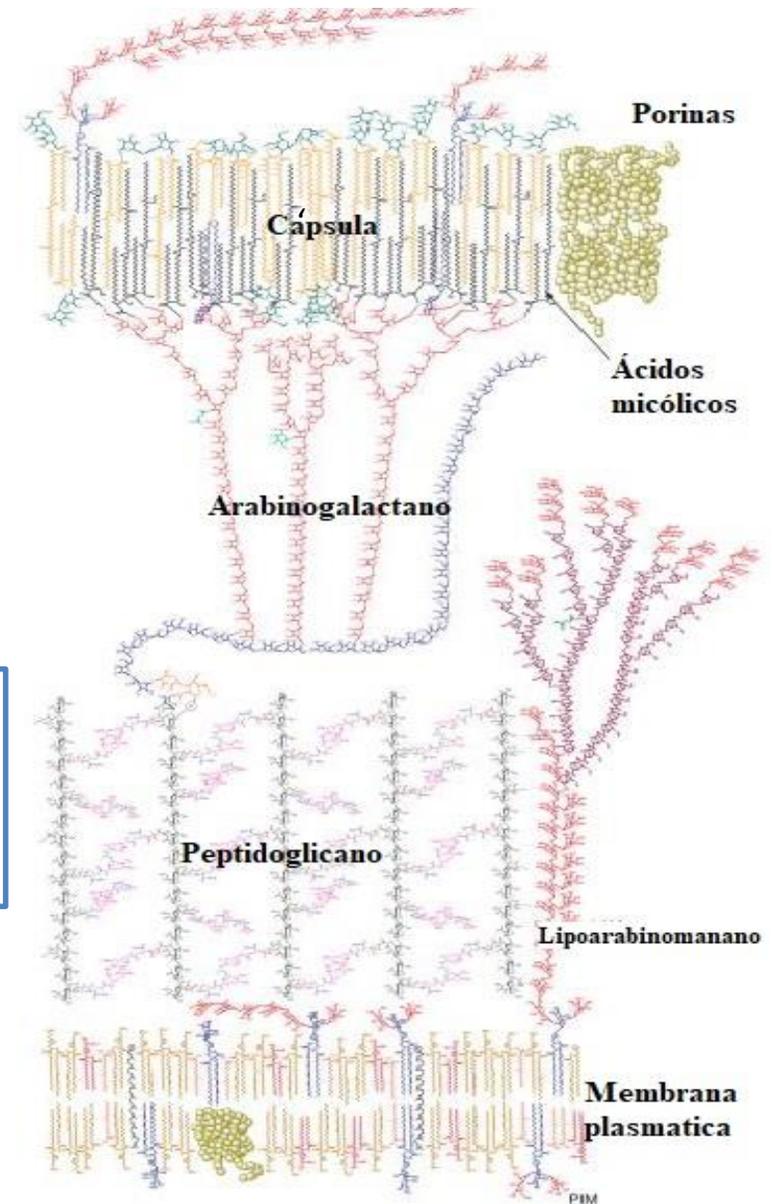
Son bacilos, ligeramente curvados

Aerobios estrictos, inmóviles

No formadores de esporas ni cápsulas

De crecimiento lento

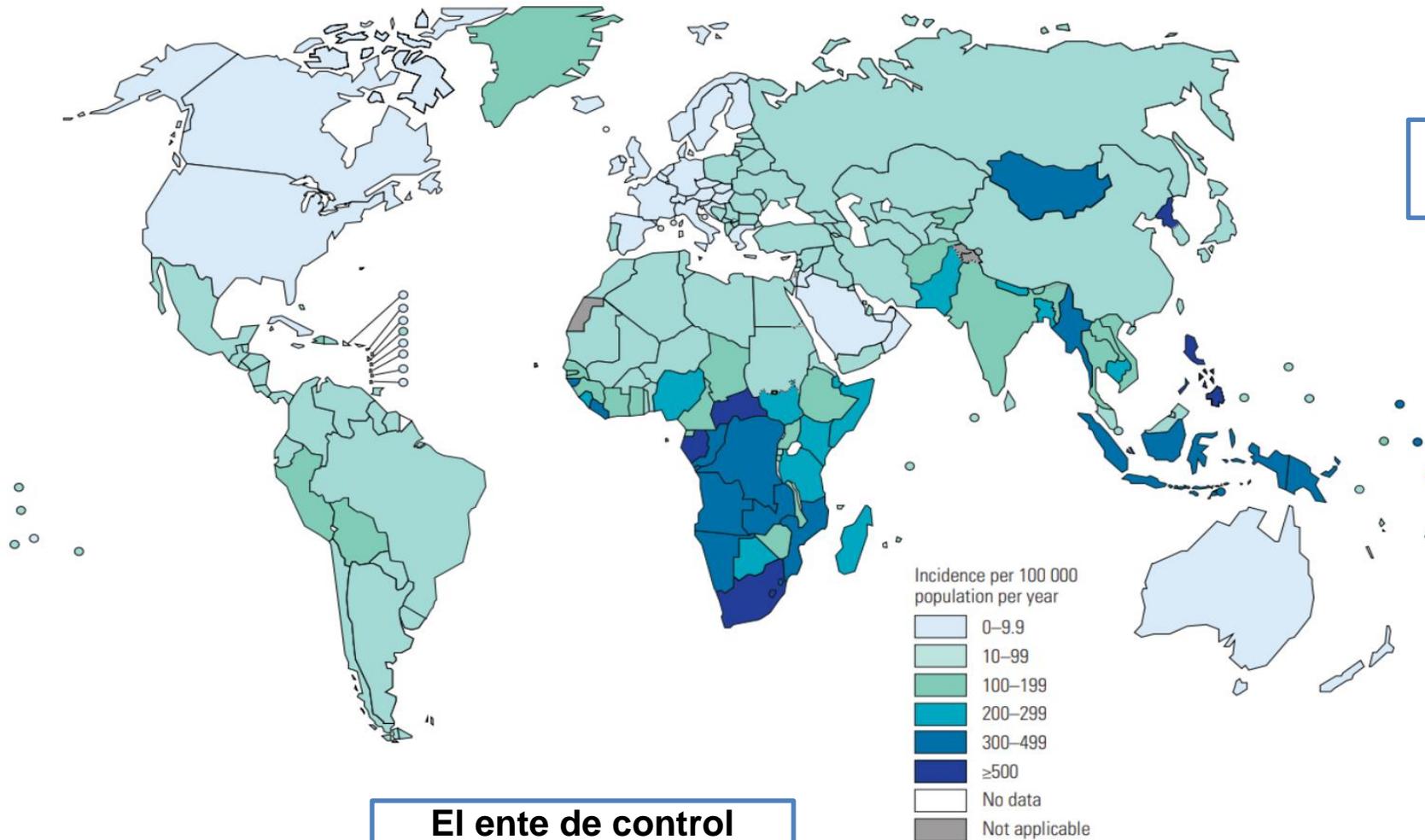
Son bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR) debido al alto contenido en lípidos que tienen en su pared celular.



Envoltura de *Mycobacterium tuberculosis*.

MARCO TEÓRICO

Epidemiología



Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2019

Los países más afectados por TB

1. India
2. China
3. Indonesia

TB causó la muerte de 1.4 millones de personas.

Según la Organización Panamericana de la Salud (PAHO)

Un total de 289.000 casos de TB y 22.900 muertes en las Américas

En 2019

El ente de control SIVIGILA del INS

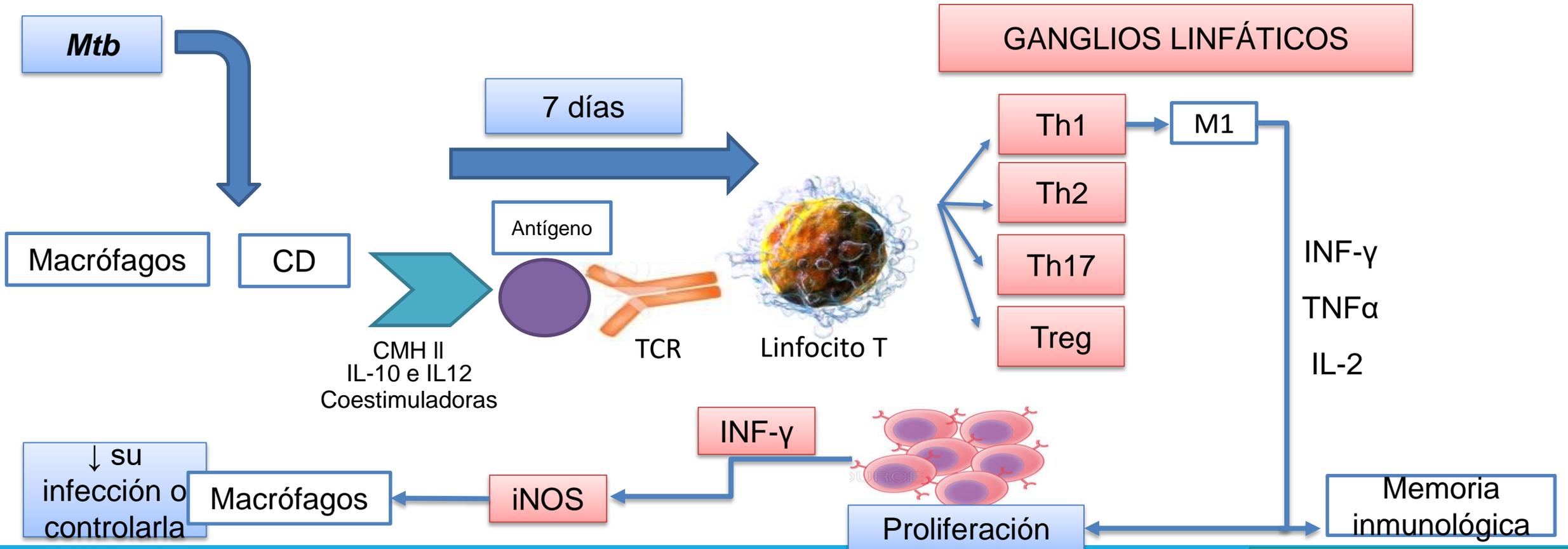
En Colombia se notificaron en la semana 11 del 2021, 11.390 casos de TB en el 2020.

Respuesta inmune



INMUNIDAD INNATA

INMUNIDAD ADAPTATIVA

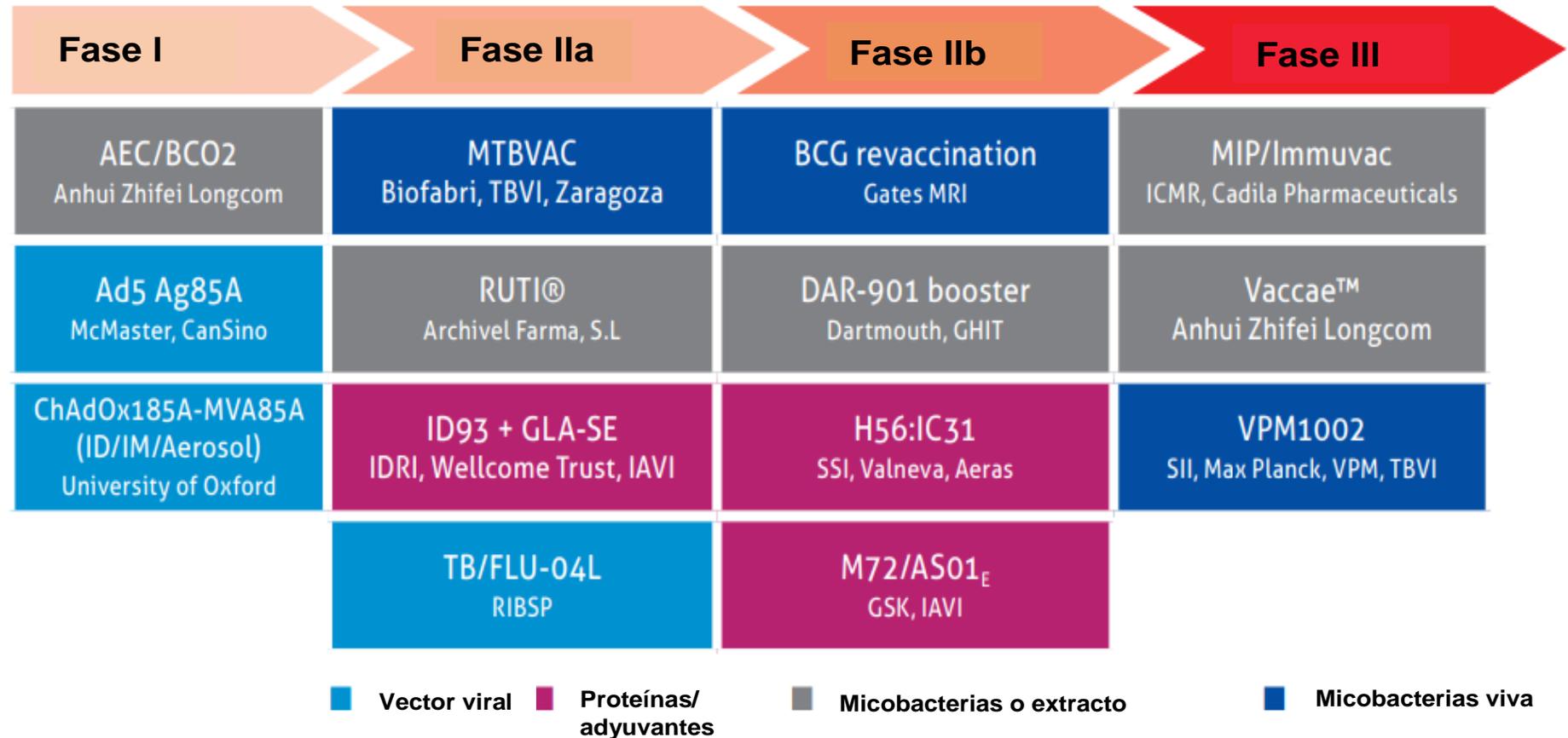


Candidatos Vacunales

La única vacuna contra TB avalada por la OMS es la **BCG** derivada de *Mycobacterium bovis* - Bacillus Calmette-Guérin.



X No previene la infección primaria o la reactivación de la tuberculosis latente en adultos.



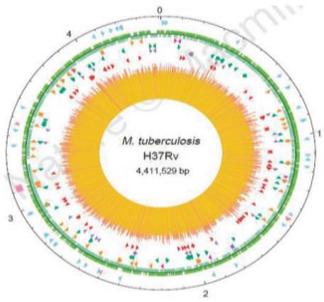
Candidatos a vacunas en ensayos clínicos. WHO, 2020

ANTECEDENTES

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia

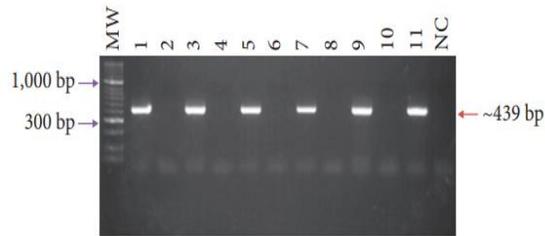
Ocampo M, *et al.* 2014

Ha descrito una alternativa lógica y racional en su búsqueda de antígenos candidatos para una vacuna eficaz contra la TB

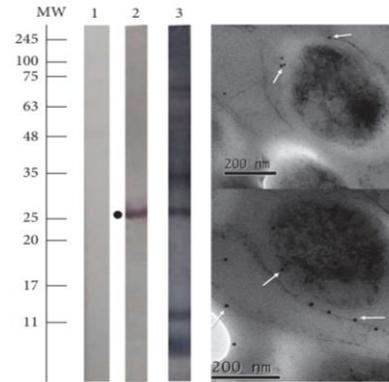


<http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v28n1/v28n1a04.pdf>

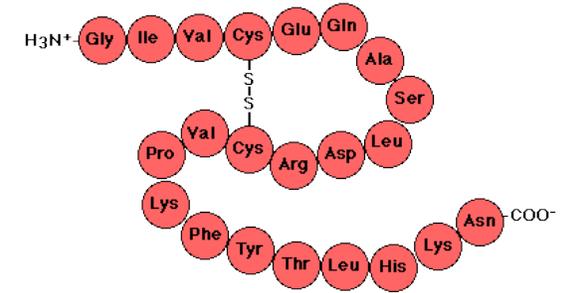
1. Análisis *in silico* o Bioinformático



2. Presencia y transcripción de genes



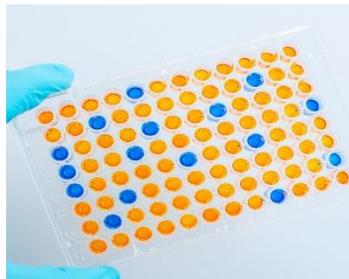
3. Expresión y Localización de proteínas



<http://www.ehu.es/biomoleculas/peptidos/pep1.htm>

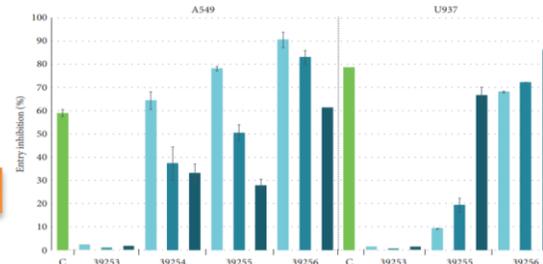
4. Síntesis de péptidos

8. Modificación del péptido



<https://www.estornuda.me/post/diagnostico-serologico-elisa>

7. Actividad del antígeno



6. Inhibición de la entrada de *Mtb* y citotoxicidad

Peptide number	Sequence	Binding activity (%)			
		A549		U937	
		1	2	1	2
39251	1 MNWIQVLLIASIGLLFYLL ²⁰				
39252	21 RRRSARSRAWKVGVLV ⁴⁰				
39253	41 LAGIYAVLRPDDTTVVANWF ⁶⁰				
39254	61 GVRRTDLMALVMAFSF ⁸⁰				
39255	81 TLSTYMRFKDLELRARI ¹⁰⁰				
39256	96 ARIARALALEGAQAEQTRY ¹¹⁴				

5. Ensayo receptor-ligando

Sánchez C, *et al.* 2019

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Los linfocitos T previamente estimulados por péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv pueden activar macrófagos infectados por la micobacteria para inhibir al microorganismo?



<https://revistadosis.com.ar/noticias/la-vacuna-contr-la-tuberculosis-reduce-los-niveles-de-azucar-en-la-diabetes.html>

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento de *Mtb* en macrófagos infectados *co-cultivados* con linfocitos T estimulados previamente con péptidos sintéticos derivados de proteínas de la micobacteria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar el ensayo de *co-cultivo* entre células presentadoras de antígenos y linfocitos T para inducir una respuesta protectora frente a *Mtb*.
- Determinar la función efectora de linfocitos T estimulados por péptidos en macrófagos infectados por *Mtb* H37Rv.
- Evaluar la producción de citoquinas y especies reactivas de nitrógeno relacionadas con la actividad bactericida en macrófagos infectados.

METODOLOGÍA

1. Objetivo específico

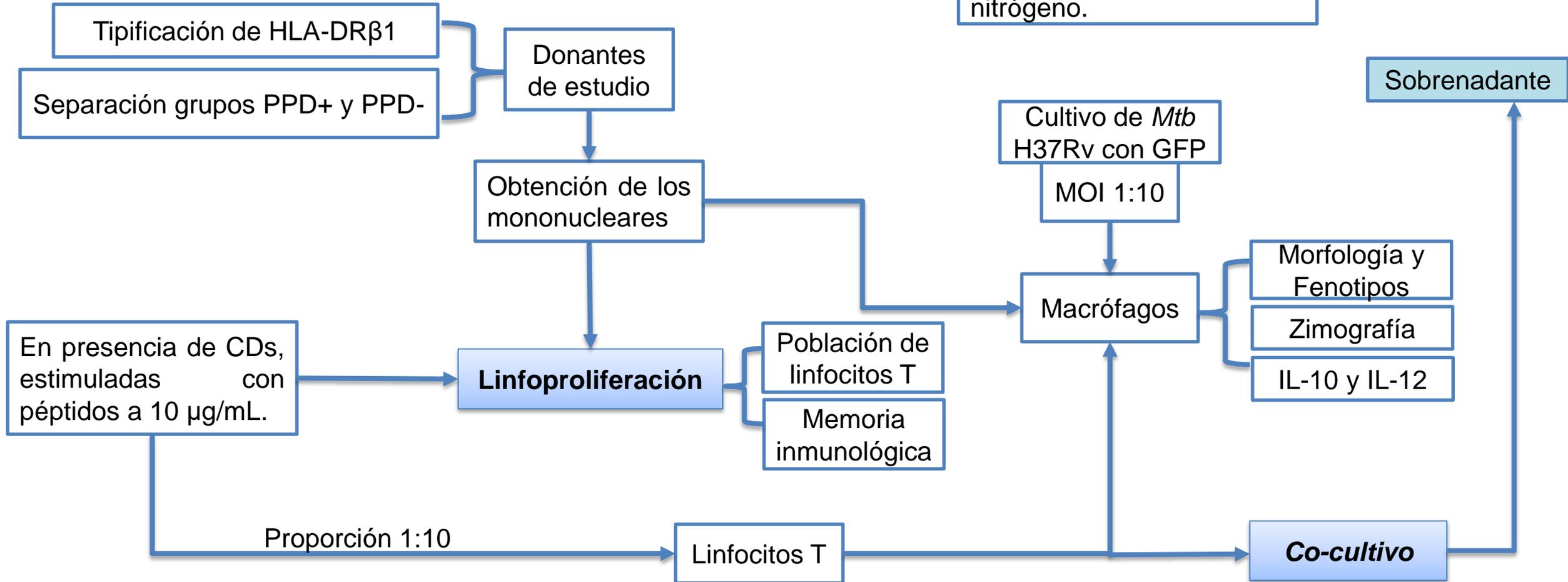
Estandarización del **Co-cultivo**, para inducir una respuesta protectora frente a *Mtb*.

2. Objetivo específico

Determinar la función efectora de linfocitos T estimulados por péptidos en el *co-cultivo*.

3. Objetivo específico

Evaluar la producción de especies reactivas de nitrógeno.



Clasificación de donantes según prueba diagnóstica de TB y sus alelos del HLA-DRβ1.

Unión péptido alelo específica

DTU Bioinformatics
Department of Bio and Health Informatics

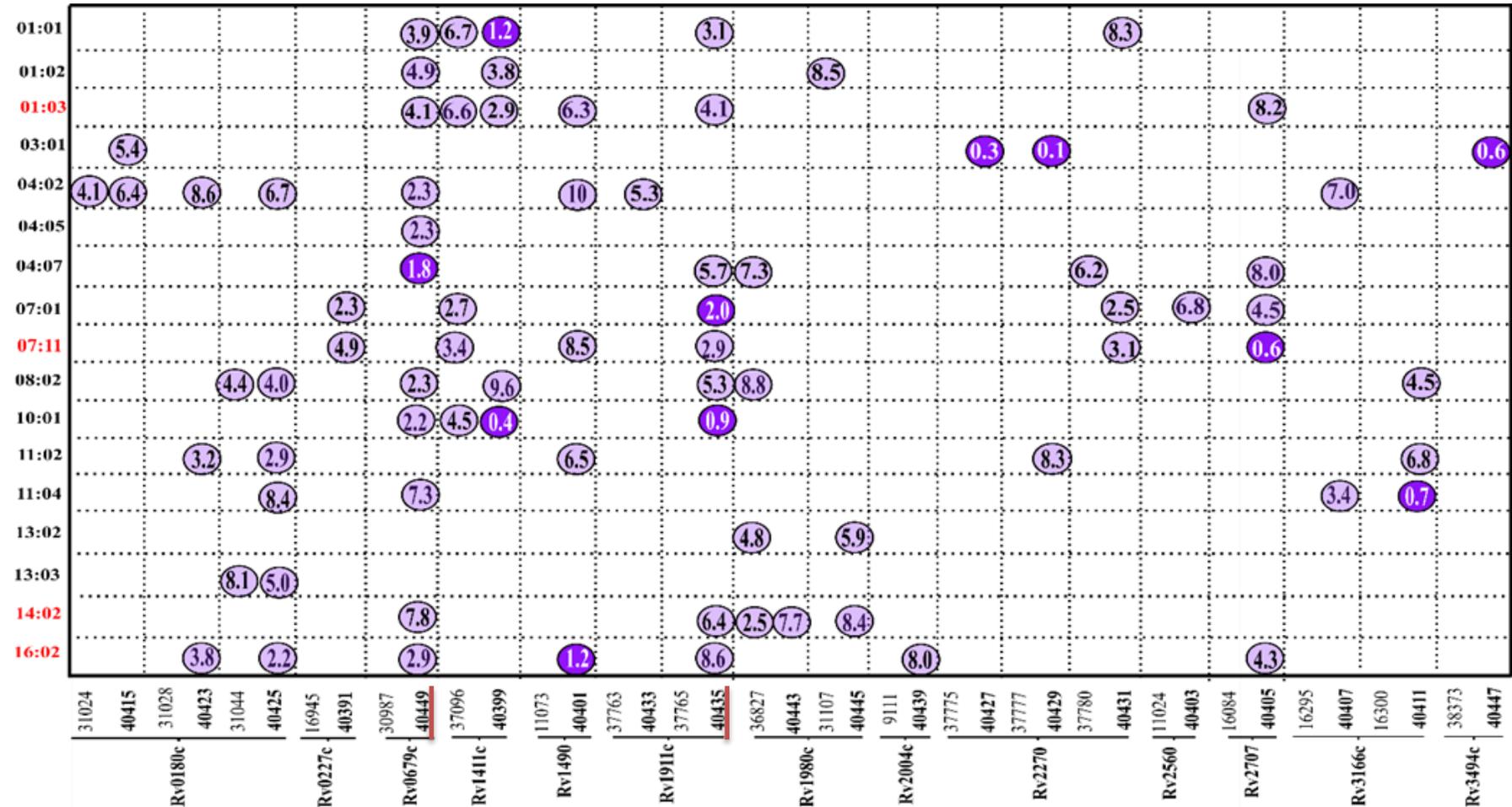
Services are gradually being migrated to <https://services.healthtech.dtu.dk/>.
Please try out the new site.

[Home](#)

NetMHCIIpan 4.0 Server

The NetMHCIIpan-4.0 server predicts peptide binding to any MHC II molecule of known sequence using Artificial Neural Networks (ANNs). It is trained on an extensive dataset of over 500.000 measurements of Binding Affinity (BA) and Eluted Ligand mass spectrometry (EL), covering the three human MHC class II isotypes HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, as well as the mouse molecules (H-2). The introduction of EL data extends the number of MHC II molecules covered, since BA data covers 59 molecules and EL data covers 74. As mentioned, the network can predict for any MHC II of known sequence, which the user can specify as FASTA format. The network can predict for peptides of any length.

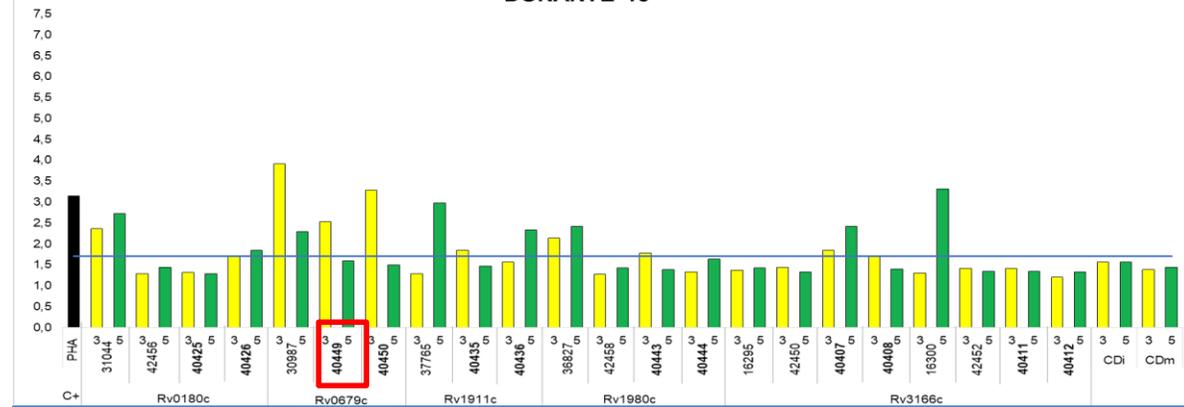
Donante	Alelos	PPD
13	1104-1402	+
15	1402-0711	+
16	1302-0802	+
18	1602-1102	-
19	0101-1104	-
20	0405-1001	-
23	0407-0701	-
25	0102-0407	+
26	1302-0407	-
27	0103-0301	+
28	0301-0402	+
29	0102-0102	-



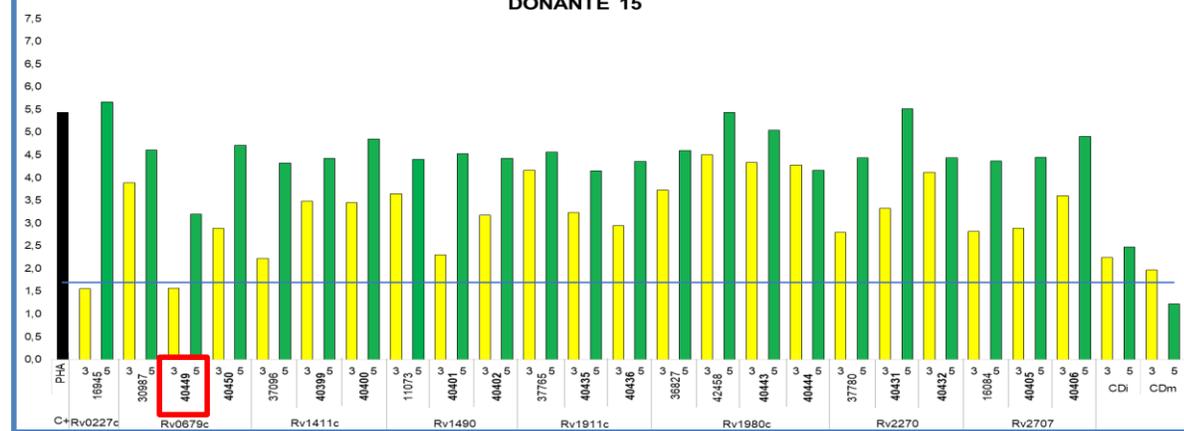
Carabalí ML, et al. 2020

Proliferación de linfocitos de los donantes PPD+ estimulados con péptidos nativos y modificados

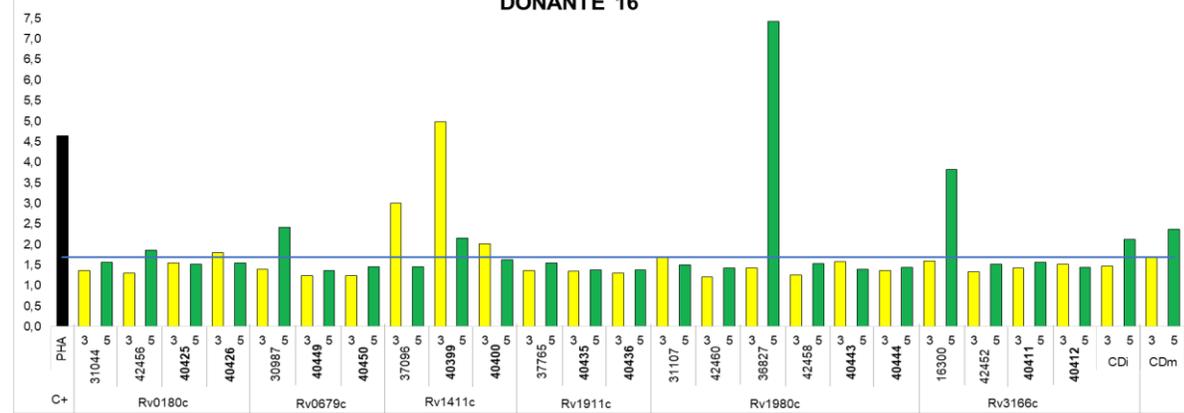
DONANTE 13



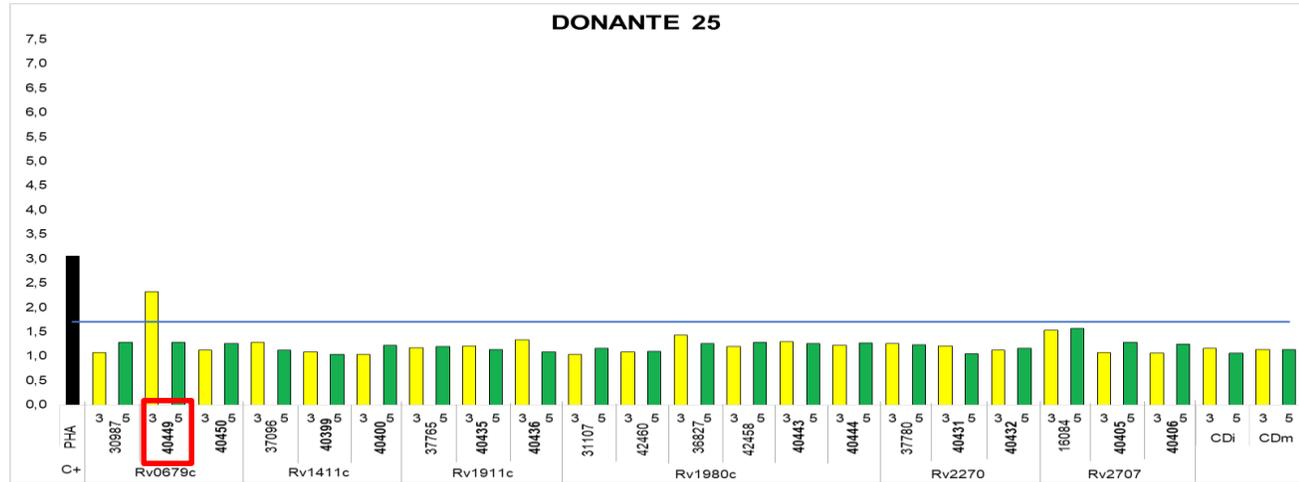
DONANTE 15



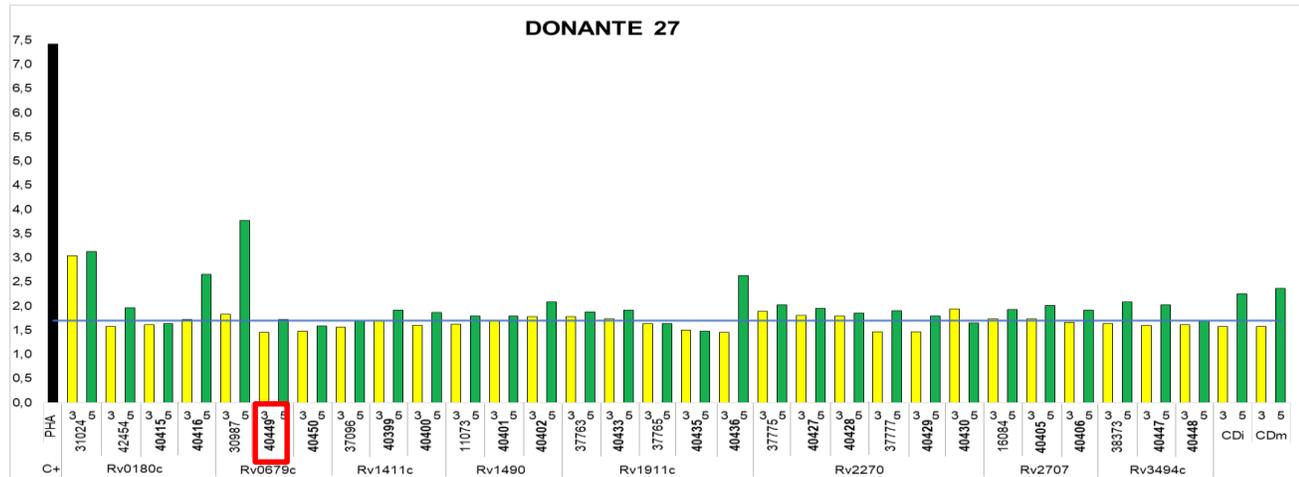
DONANTE 16



DONANTE 25

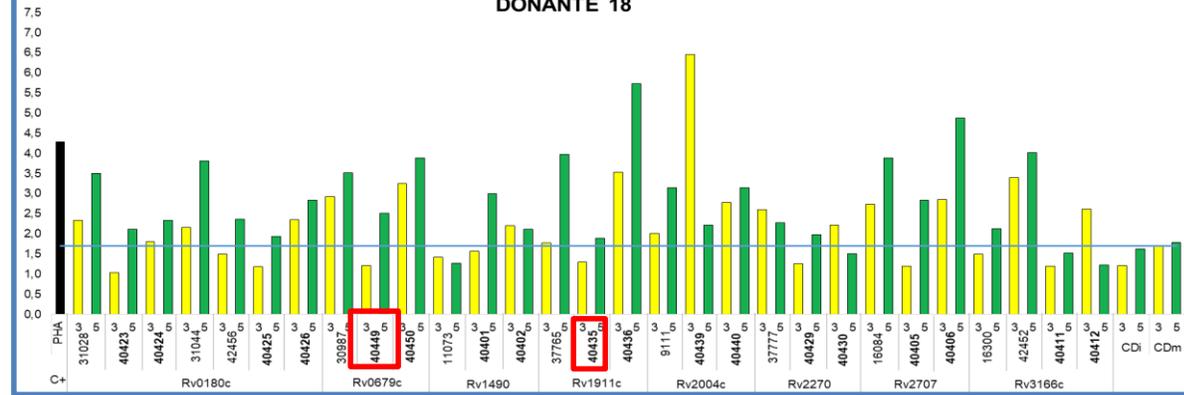


DONANTE 27

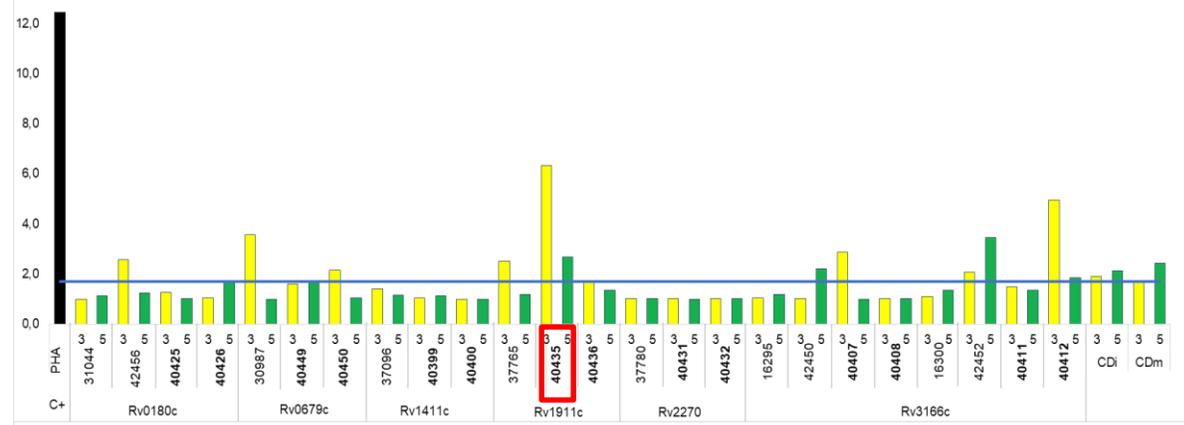


Proliferación de linfocitos de los donantes PPD-
estimulados con péptidos nativos y modificados

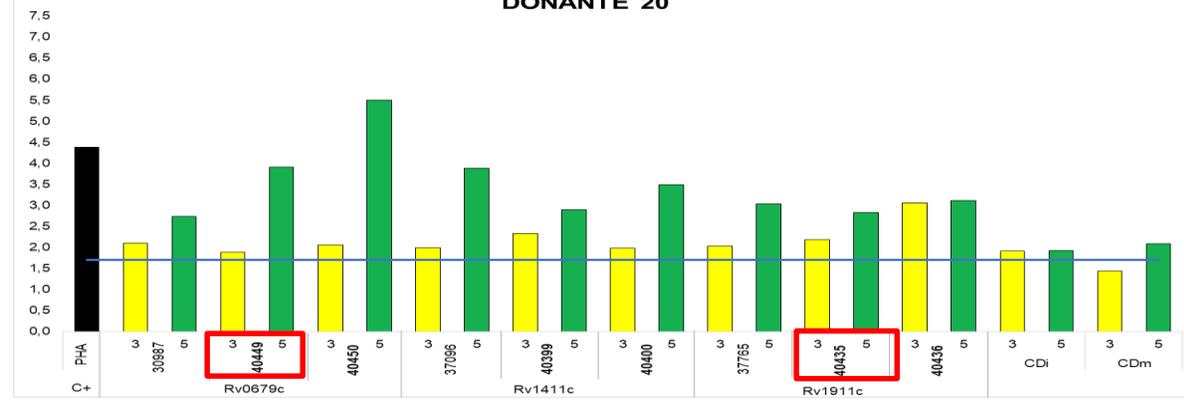
DONANTE 18



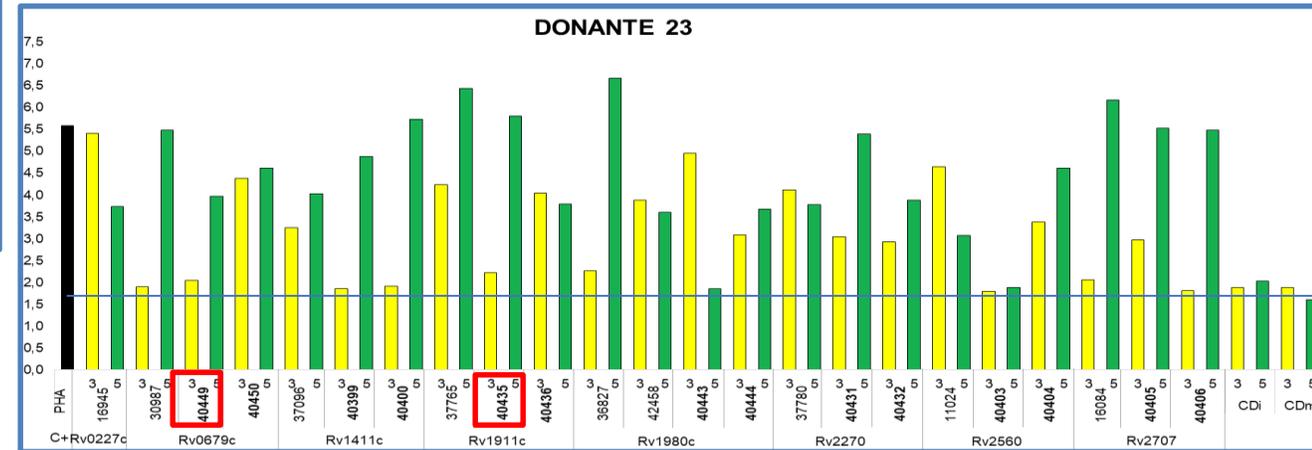
DONANTE 19



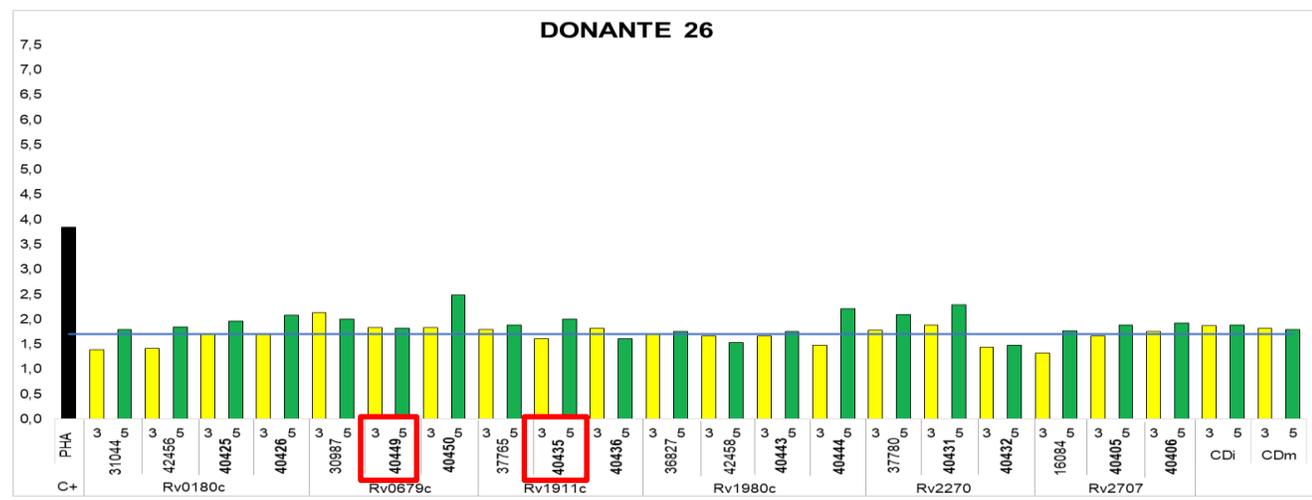
DONANTE 20



DONANTE 23

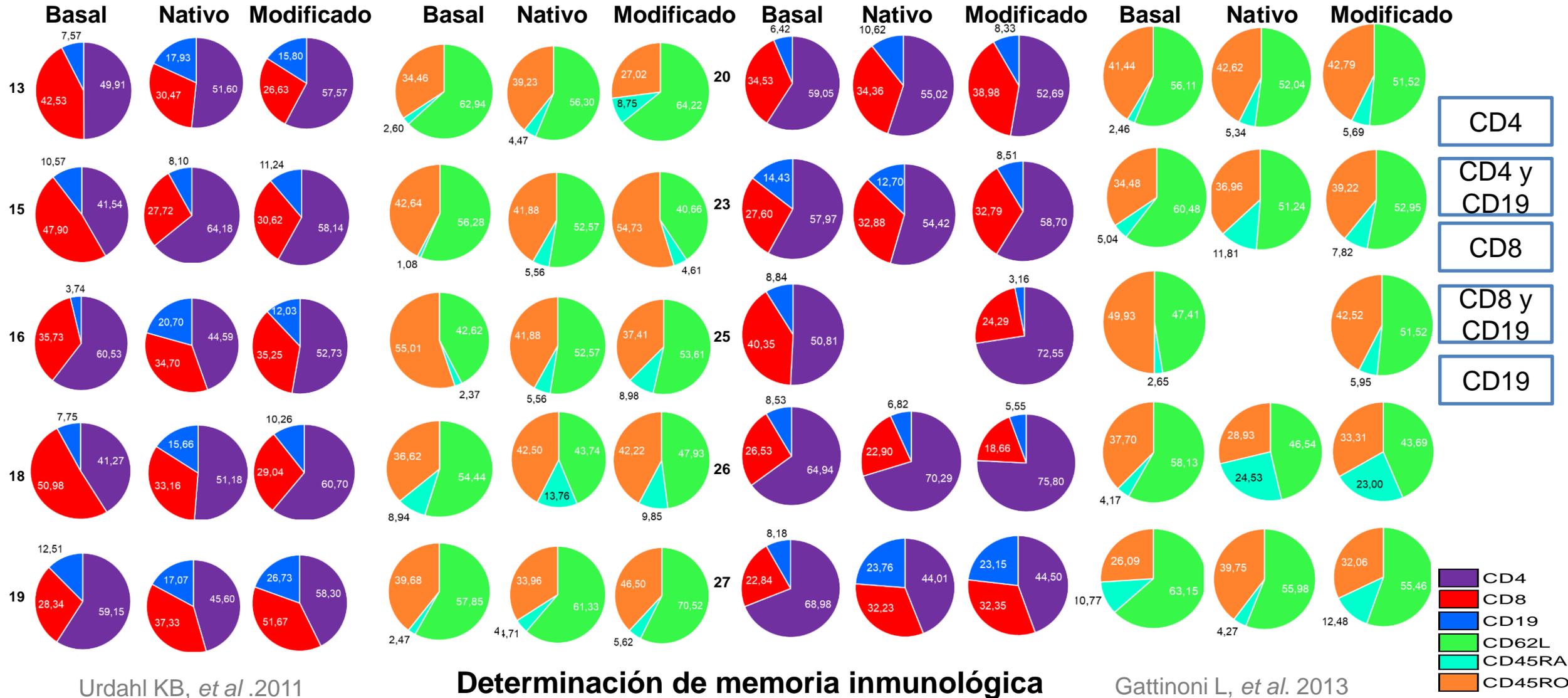


DONANTE 26



Brinke A, et al. 2017

Evaluación de moléculas de superficie en linfocitos estimulados con péptidos nativos y modificados



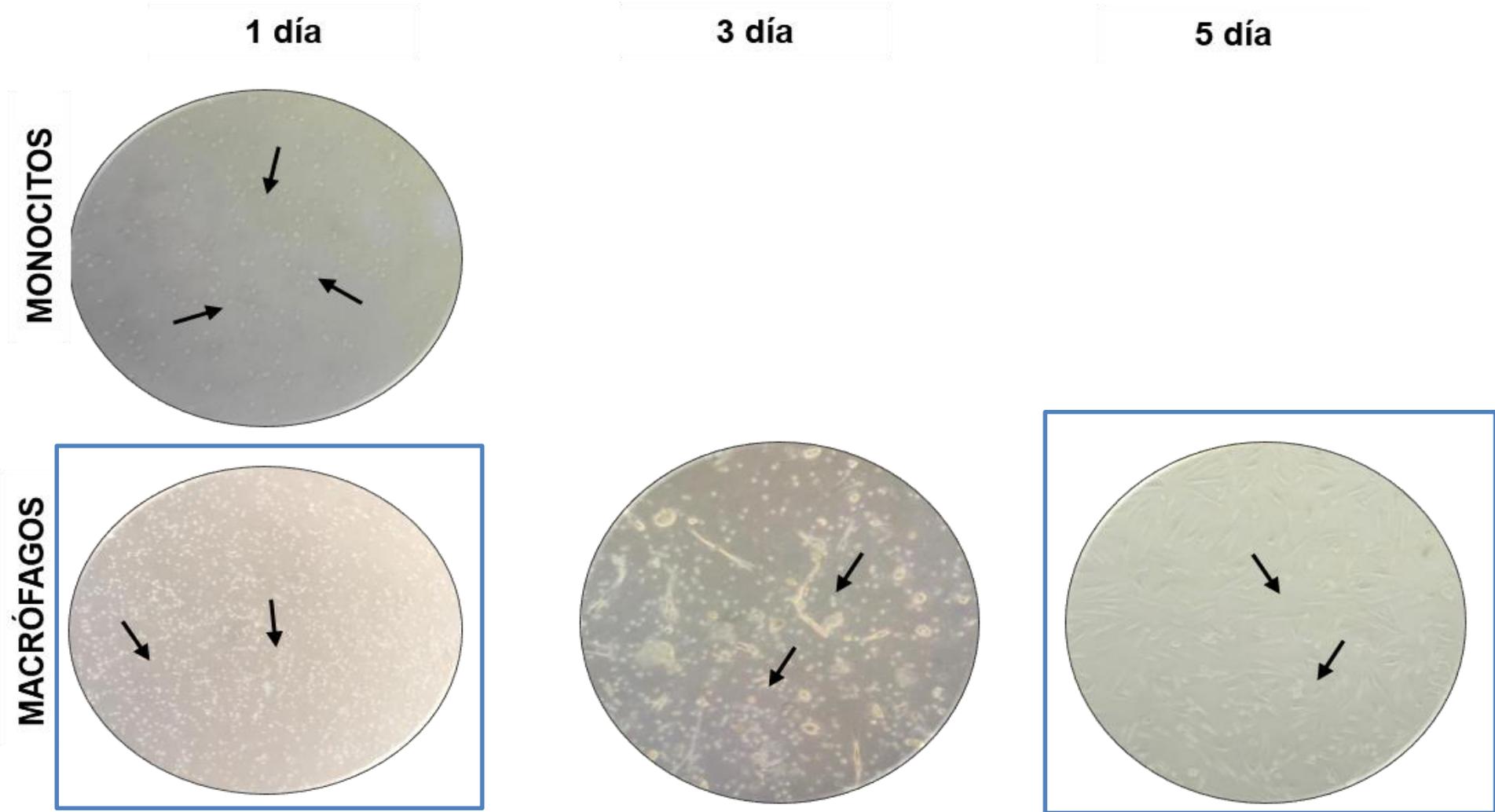
Urdahl KB, et al. 2011

Determinación de memoria inmunológica

Gattinoni L, et al. 2013

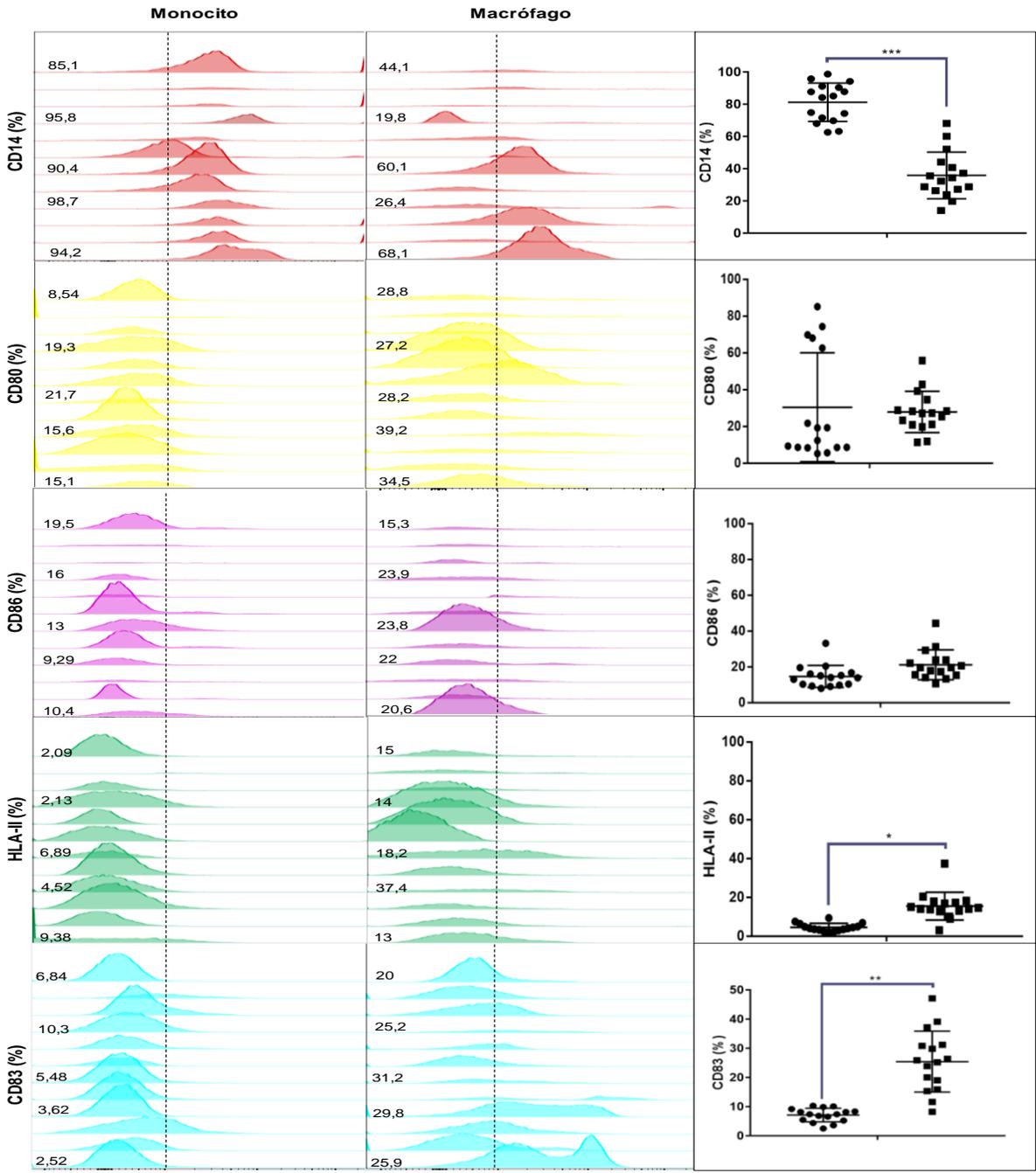
CD4
CD8
CD19
CD62L
CD45RA
CD45RO

Seguimiento del cambio morfológico en los macrófagos

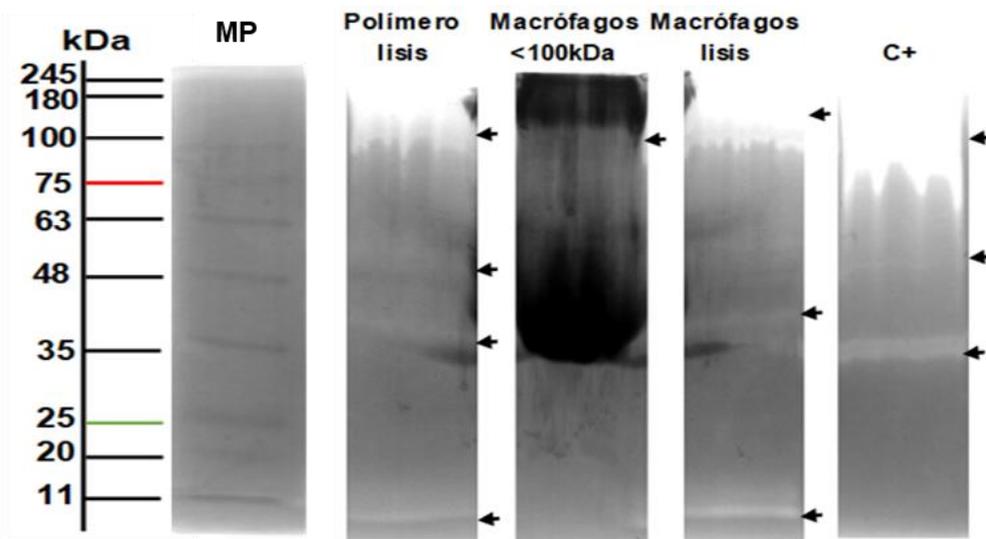
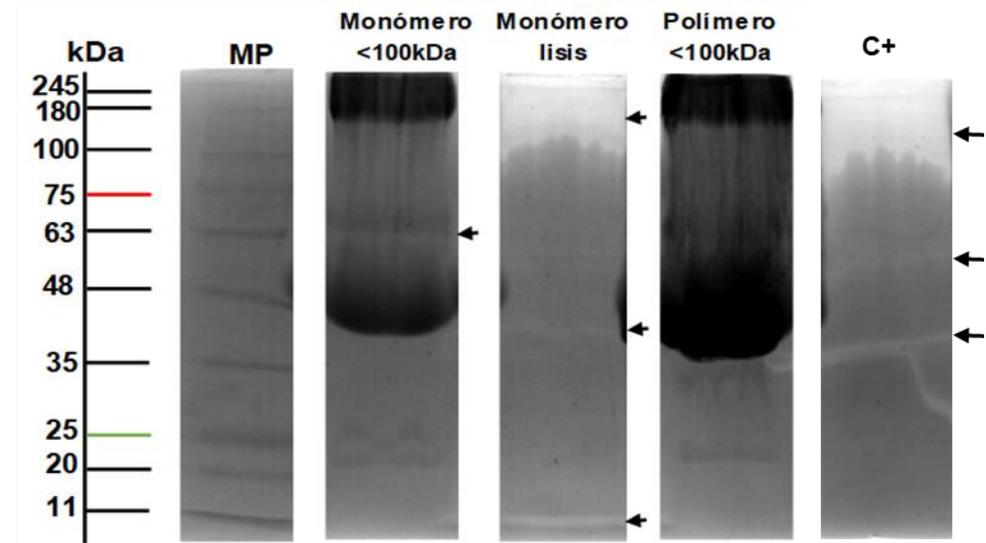


Morfología de monocitos y macrófagos

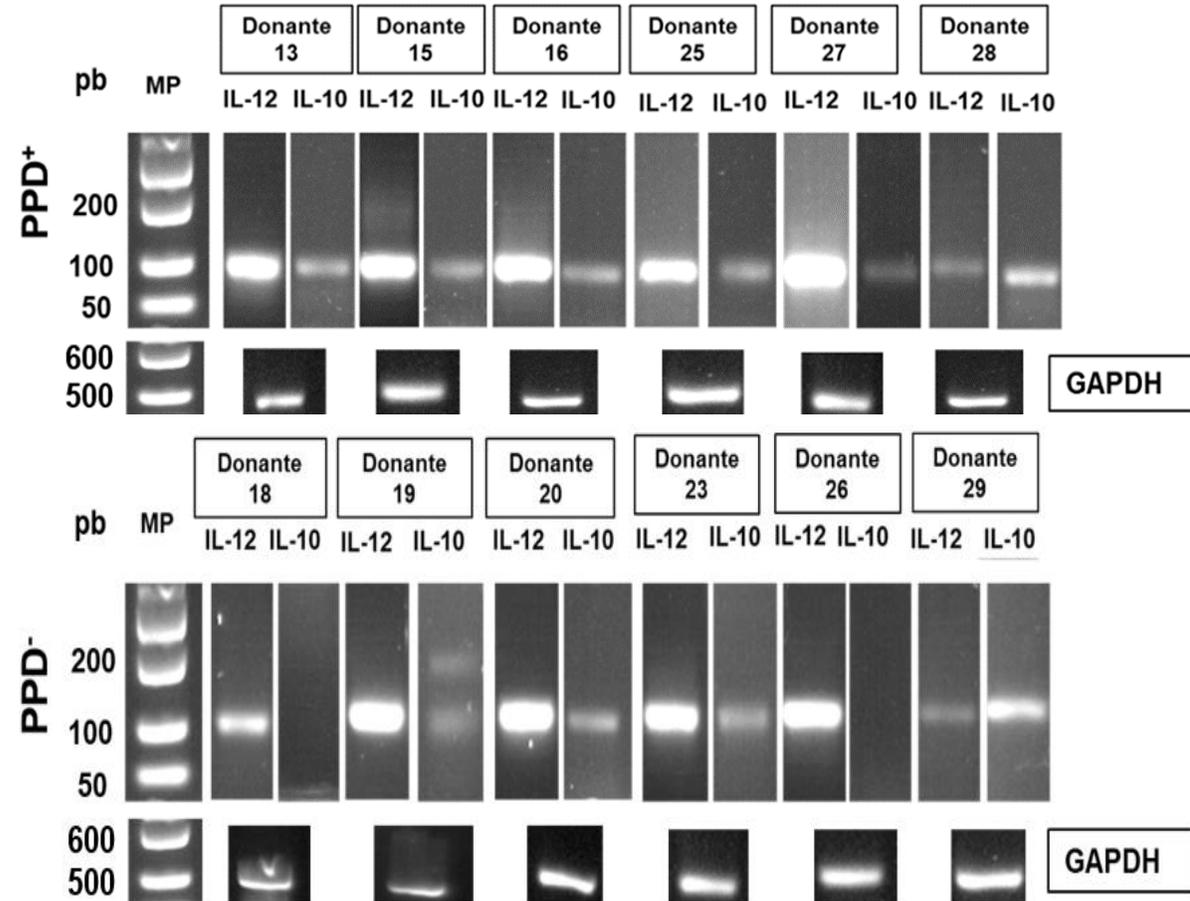
Análisis fenotípico de macrófagos



Activación y presentación antigénica de macrófagos

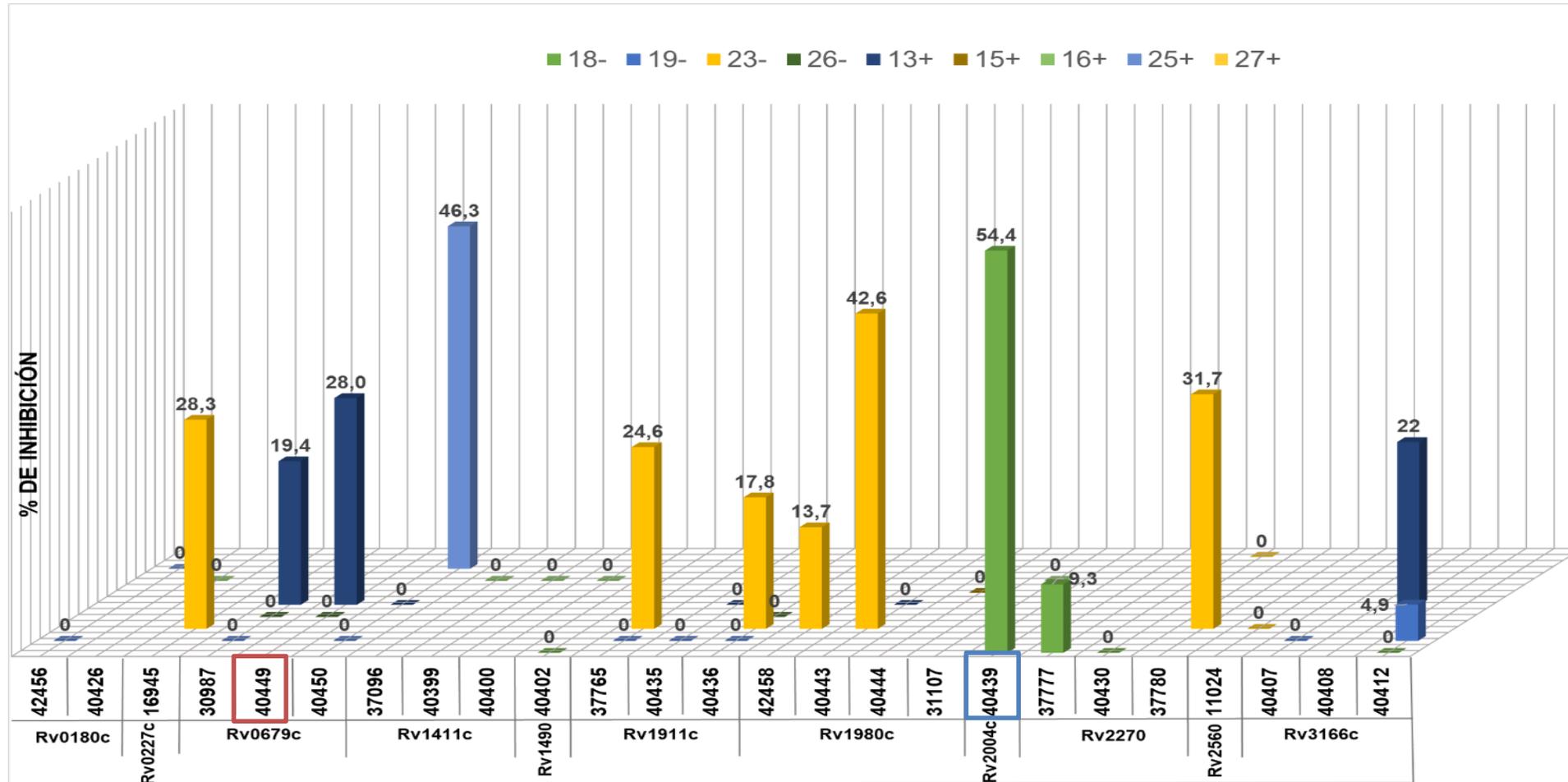


Zimograma para la liberación de proteasas



Presencia de IL-10 e IL-12

Ensayo de *co-cultivo*

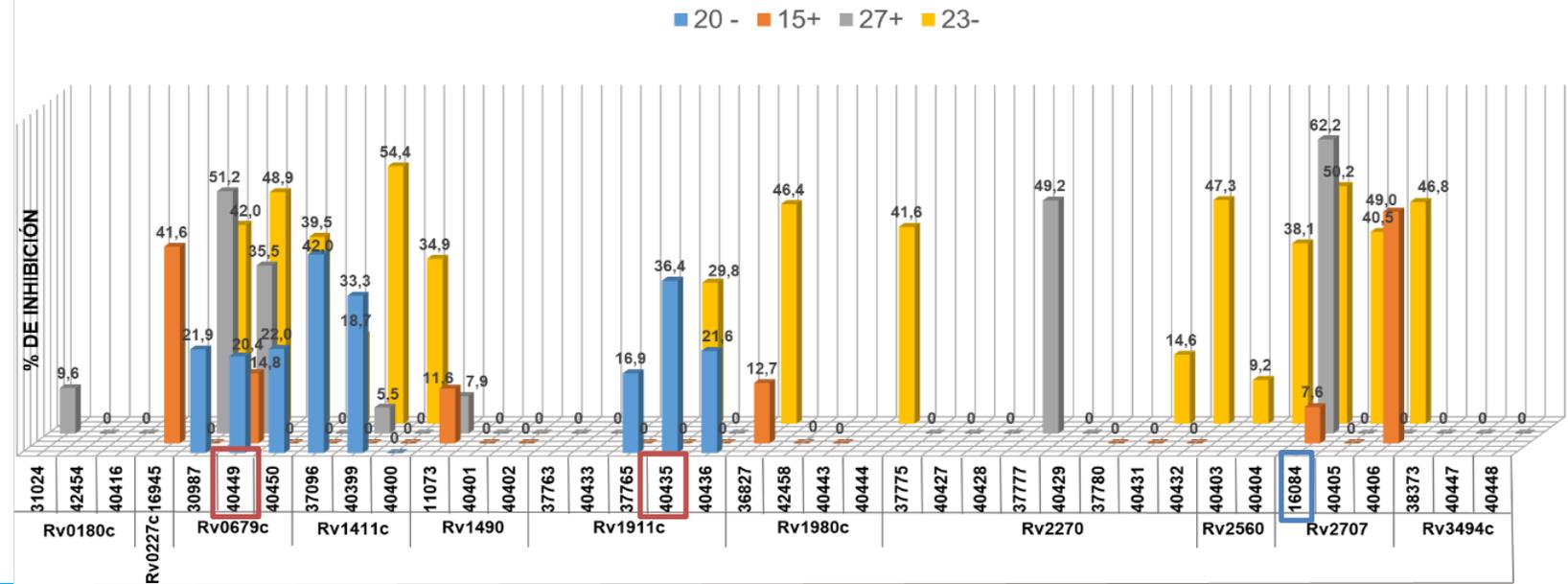
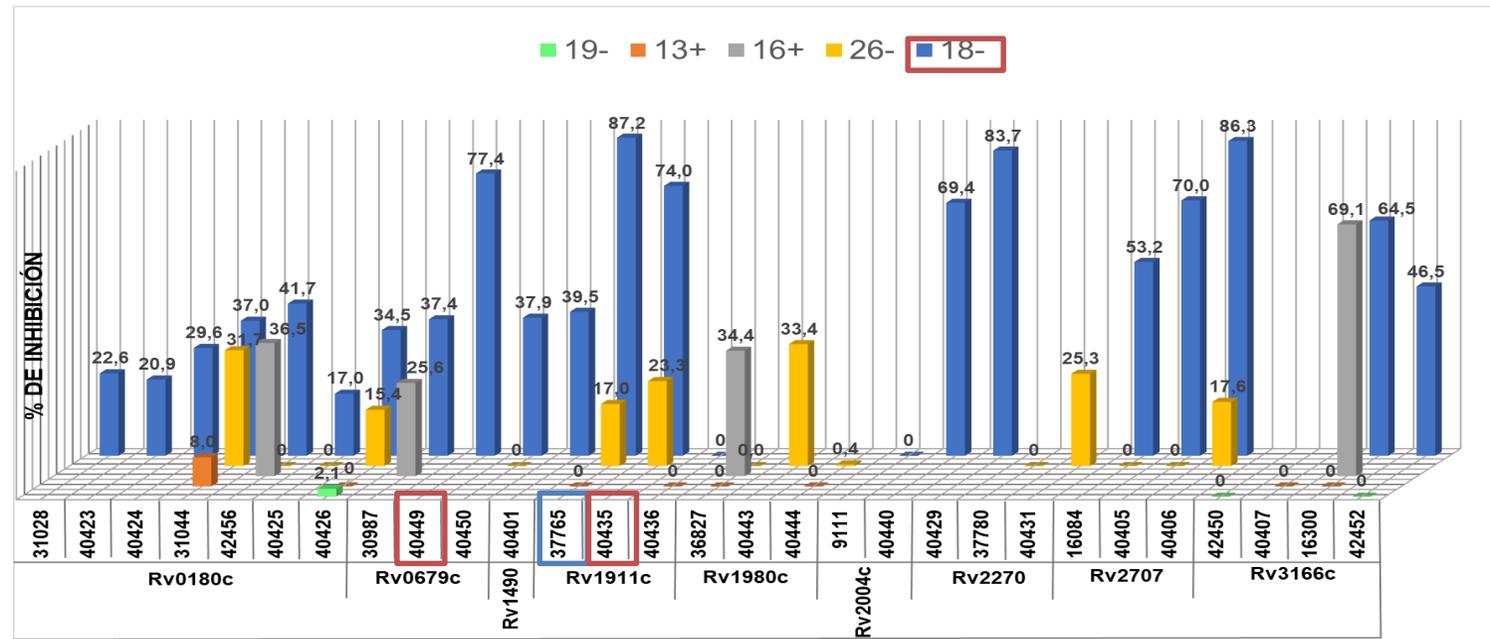


Inhibición intracelular de *Mtb* H37Rv al 3 día: 3-55%

Mayor inhibición el péptido **40439**

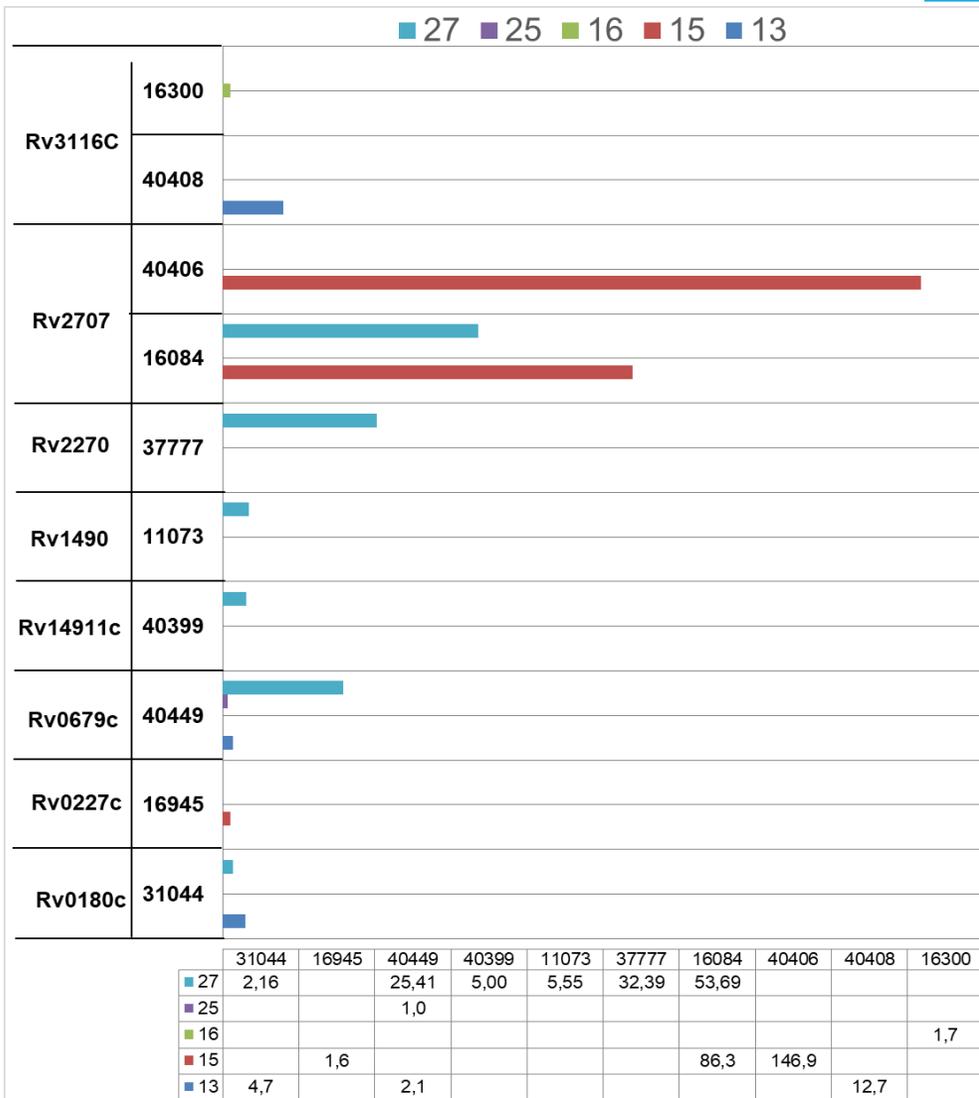
Inhibición intracelular de *Mtb* con linfocitos estimulados al 3 día.

Ensayo de *co-cultivo*

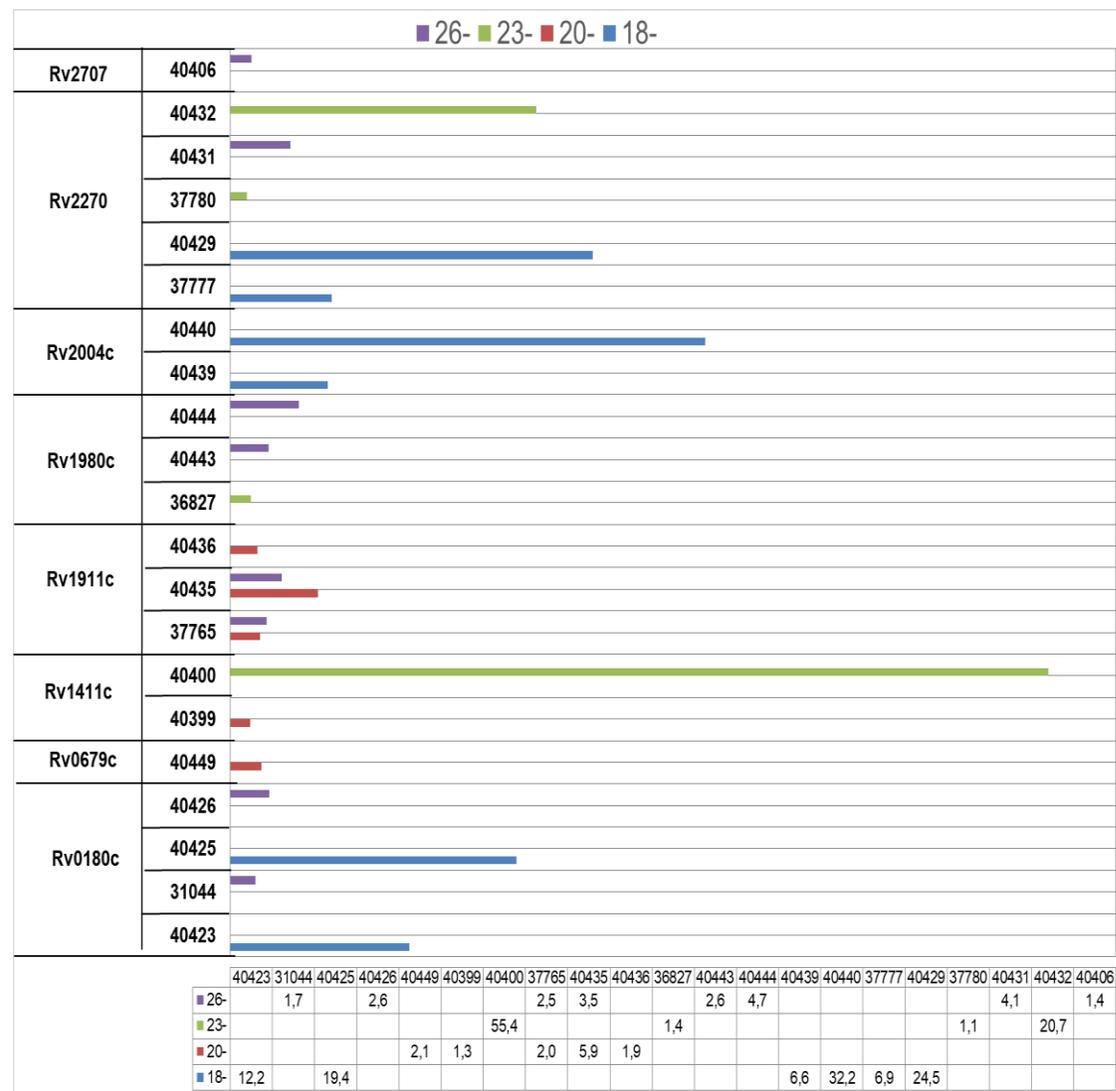


Inhibición intracelular de *Mtb* con linfocitos estimulados al 5 día

Cuantificación y evaluación de la producción del óxido nítrico



DONANTES PPD+.



DONANTES PPD-.

Salvemini D, et al. 2006

CONCLUSIONES

- Se pudo estandarizar el ensayo de *co-cultivo*, el cual permitió establecer cuales péptidos de los seleccionados para estimular a los linfocitos, están involucrados en inducir la activación de los macrófagos para inhibir la micobacteria intracelular.
- Entre las secuencias evaluadas, se encontraron péptidos que inducían linfocitos efectores en capacidad de interactuar con macrófagos infectados cuyo resultado fue la inhibición de la micobacteria intracelular.
- En los macrófagos se evidencia la presencia de IL-12 y la ausencia de IL-10, lo cual sugiere una polarización al fenotipo M₁, en el cual se induce la producción de NO.

PERSPECTIVAS

1. Al momento de establecer la respuesta inmune celular de los linfocitos frente a los HABPs pulsados a través de CDs, en el ensayo de expansión clonal, se puede llegar a estudiar la respuesta humoral que se puede producir, por medio del rol de anticuerpos IgG específicos contra los péptidos, para evaluar el tipo de respuesta protectora (Anticuerpos neutralizantes o opsonizantes) que generan el control de la infección por *Mtb*.
2. Igualmente, evaluar en el sobrenadante del *co-cultivo* los perfiles Th1 y Th2, que permite caracterizar la polarización de estos perfiles linfocitarios que participan en el control de la infección por *Mtb*.

AGRADECIMIENTOS

- En primera instancia agradezco a mi familia, a mis amigos por el amor y apoyo incondicional.
- También agradecer a la FIDIC por la financiación y el apoyo para la realización de este trabajo de grado. A mis asesores externos por las enseñanzas y el apoyo total durante el desarrollo del proyecto, a Christian David Sánchez Barinas y Mary Lilián Carabalí Isajar del grupo de Tuberculosis de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia.
- A mi asesora interna por su orientación y amistad a lo largo de este proyecto, la docente Susan Lorena Castro Molina, MSc y a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca que brindo los conocimientos necesarios para realizar el trabajo grado.

GRACIAS