



**ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA PÉPTIDOS DE *Mycobacterium tuberculosis* Y SU FUNCIÓN EFECTORA EN MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS INFECTADOS**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**BOGOTÁ, 2022**



**ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA PÉPTIDOS DE Mycobacterium tuberculosis Y SU FUNCIÓN EFECTORA EN MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS INFECTADOS**

**ESTUDIANTES**

DANIELA ALEJANDRA GALEANO ORJUELA

JUAN SEBASTIÁN GÓMEZ CAMARGO

**ASESORA INTERNA**

JEANNETTE NAVARRETE OSPINA, MSc. Salud y producción animal

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

**ASESORA EXTERNA**

MARY LILIÁN CARABALÍ ISAJAR, MSc. Microbiología, cPhD

Grupo Funcional Tuberculosis

FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA (FIDIC)

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**BOGOTÁ, 2022**



**ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA PÉPTIDOS DE Mycobacterium tuberculosis Y SU FUNCIÓN EFECTORA EN MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS INFECTADOS**

**Laureada** \_\_

**Meritoria** \_\_

**Aprobada** \_\_

**JURADOS:**

---

---

---

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**BOGOTÁ, 2022**

### **Dedicatoria Daniela Alejandra Galeano Orjuela**

Dedico de manera especial a mi mamá, mis hermanos, mi padrastro y familiares que estuvieron conmigo en esta etapa tan importante para mi crecimiento personal y profesional, que sin su apoyo no sería la persona que soy hoy, llena de sueños y metas por realizar.

A mis amigos Daniela Salazar, Paula Vásquez, Daniela Valenzuela y Sebastián Quintero por brindarme su tiempo y colaboración en los momentos que más lo necesite.

A Jaime quien también es mi motivación para concluir con éxito este proyecto.

### **Dedicatoria Juan Sebastián Gómez Camargo**

Dedico este logro en primer lugar, a mis esfuerzos de seguir creciendo, a las batallas que gané y perdí durante el camino; a las personas que he despedido sin quererlo y a los intentos fallidos que muchas veces me derrotaron. Dedico este proyecto a mi valentía y perseverancia como joven en un país con oportunidades reducidas; a mis ganas de seguir luchando y a las muchas veces que yo mismo me impulsé a seguir adelante y no darme por vencido.

A mi mamá que con amor y sabiduría me inculcó la pasión por la academia y me brindó todas las condiciones necesarias para nunca dejar de soñar. A mi hermano que desinteresadamente me brindó la mano como un padre y un amigo, siendo un ejemplo a seguir muchas veces para culminar este proceso. A Mimi por ser muchas veces una voz de apoyo y una amiga que me enseñó la incondicionalidad, el amor y la compañía sincera, a lo largo de mi crecimiento y desarrollo como hombre y profesional.

Y finalmente, dedico este objetivo alcanzado a todas las personas que pasaron por mi vida y me quisieron ver crecer, que me mostraron muchas veces capacidades que no creía tener, a esas personas que me llenaron de risas, llantos, experiencias y consejos siendo ejemplos de vida para forjar el hombre y profesional que soy hoy en día.

## **Agradecimientos**

La culminación de este proyecto es gracias a:

Mis padres, mis hermanos y familiares quienes unieron esfuerzos para cumplir esta primera meta, entregándome todo su amor, motivación y respaldo.

A mis amigos que enriquecieron esta experiencia con su compañía en cada momento de esta etapa. A mi compañero de tesis por su apoyo en esta fase tan importante la cual culminaremos juntos, por sus consejos y por su amistad.

Mil gracias a todos.

Atentamente Daniela Galeano.

Agradezco a mi madre y a mi hermano por su ayuda incondicional durante todo este tiempo, a mi compañera de tesis por abrirme las puertas en este proyecto y en su vida, por ser un impulso, un apoyo y un motivo más para finalizar con éxito este proyecto.

A las experiencias, obstáculos y adversidades que he afrontado a lo largo de mi vida las cuales me permitieron llegar hasta aquí y que me impulsan a seguir creciendo cada día.

Agradecido con la vida, la ciencia y el área de salud, por demostrarme que el universo es un espacio de mundos inimaginables por descubrir y apreciar.

Atentamente Juan Gómez.

Agradecemos a cada uno de los docentes de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca que hicieron parte de nuestra formación integral y profesional.

A nuestra asesora Mary Carabalí por haber dedicado parte de su tiempo para compartir su conocimiento con nosotros, liderando de manera exitosa y fraternal nuestra tesis y formación como profesionales; a nuestra docente Jeannette Navarrette por el aprendizaje, sugerencias y comentarios que fueron importantes para culminar este proyecto de grado

A la FIDIC y en especial al grupo de Tuberculosis, a la doctora Marisol Ocampo por darnos la oportunidad de ser parte del grupo de investigación y adquirir nuevos conocimientos, a nuestros compañeros de laboratorio Jonathan y Christian quienes de manera desinteresada compartieron sus conocimientos con nosotros haciendo inolvidable el desarrollo de este proyecto.

## Tabla de contenido

<b>1. Resumen</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>12</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>15</b>
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos específicos	
<b>4. Antecedentes</b> .....	<b>16</b>
<b>5. Marco teórico</b> .....	<b>19</b>
5.1 Generalidades Tuberculosis	
5.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y el complejo <i>MTB</i>	
5.3 Epidemiología de la TB	
5.4 Diagnóstico de la TB	
5.5 Respuesta inmune innata de la TB	
5.8 Respuesta inmune adaptativa de la TB	
5.9 Vacunas contra la TB	
<b>6. Metodología</b> .....	<b>31</b>
6.1 Diseño metodológico	
6.1.1 Tipo de investigación	
6.1.2 Alcance, nivel y enfoque de investigación	
6.1.3 Población objeto de estudio	
6.1.4 Muestra	
6.2 Técnicas y procedimientos	
6.2.1 Macrófagos	
6.2.1.1 Cultivo de macrófagos U937	
6.2.1.2 Ensayo de inhibición en macrófagos infectados con <i>Mtb</i> H37Rv, mediado por péptidos	
6.2.2 Predicción de epítopes B	
6.2.2.1 Aproximación bioinformática	
6.2.3 Aislamiento de inmunoglobulinas IgG afines peptídicos seleccionados	
6.2.3.1 Aislamiento y purificación de IgG	
6.2.3.2 Purificación de IgG péptido-específica	
6.2.3.2.1 Aproximación experimental ELISAs	
6.2.3.2.2 Aproximación experimental Dot Blot	
6.2.4 Evaluación de la función efectora de inmunoglobulinas que reconocen péptidos derivados de la envoltura de <i>Mtb</i> H37Rv	
6.2.4.1 Macrófagos	
6.2.4.1.1 Ensayo de inhibición en macrófagos infectados con <i>Mtb</i> H37Rv, mediado por IgG	
6.2.4.2 Neutrófilos	
6.2.4.2.1 Aislamiento de neutrófilos en sangre periférica	
6.2.4.2.2 Ensayo de invasión en neutrófilos infectados con <i>Mtb</i> H37Rv, mediado por IgG	
<b>7. Resultados</b> .....	<b>38</b>

7.1 Inhibición de la entrada de <i>Mtb</i> H37Rv por péptidos modificados a macrófagos U937	
7.2 Selección de péptidos sintetizados a partir de proteínas presentes en la envoltura de <i>Mtb</i> H37Rv	
7.3 Evaluación del reconocimiento de péptidos nativos y modificados a partir de inmunoglobulinas presentes en suero humano	
7.4 Aislamiento de inmunoglobulinas IgG afines peptídicos seleccionados	
7.5 Inhibición de la entrada de <i>Mtb</i> H37Rv por anticuerpos dirigidos a péptidos nativos y modificados a macrófagos U937	
7.6 Muerte celular en Neutrófilos infectados con <i>Mtb</i> H37Rv, mediada por IgG	
<b>8. Discusión</b> .....	<b>48</b>
<b>9. Conclusiones</b> .....	<b>55</b>
<b>10. Recomendaciones</b> .....	<b>57</b>
<b>11. Referencias</b> .....	<b>58</b>
<b>12. Anexos</b> .....	<b>61</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Envoltura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
Figura 2. Incidencia de TB a nivel mundial, 2020 .....	23
Figura 3. Porcentaje de casos de TB a nivel nacional, 2020 .....	24
Figura 4. Algoritmo de utilización conjunta de PPD e IFN- $\gamma$ en el diagnóstico de TB.....	25
Figura 5. Resumen metodológico .....	32
Figura 6. Inhibición de la entrada de Mtb H37Rv en macrófagos U937 en presencia de péptidos modificados .....	39
Figura 7. Reconocimiento de péptidos nativos y sus secuencias modificadas por sueros de los donantes reclutados .....	42
Figura 8. Reconocimiento antigénico de IgGs péptido-específicas aisladas a partir de los sueros de donantes .....	42
Figura 9. Reconocimiento de inmunoglobulinas péptido-específicas de secuencias modificadas .....	43
Figura 10. Anticuerpos que reconocen péptidos nativos y modificados inhiben la entrada de <i>Mtb</i> a Macrófagos .....	44
Figura 11. Necrosis y apoptosis en neutrófilos .....	45

## **Índice de tablas**

Tabla 1. Sintomatología de TB extrapulmonar .....	<b>20</b>
Tabla 2. Informe de resultados del examen microscópico, baciloscopia .....	<b>25</b>
Tabla 3. Enfoque bioinformático de epítopes B en péptidos nativos y modificados.	<b>40</b>
Tabla 4. Resultados de necrosis y apoptosis en neutrófilos humanos .....	<b>46</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A549:</b> Células epiteliales alveolares tipo II	<b>LAM:</b> Lipoarabinomanano
<b>AV:</b> Anexina	<b>LM:</b> Lipomanano
<b>BAAR:</b> Bacilo ácido alcohol resistente	<b>Man-LAM:</b> Lipoarabinomanano protegido con manosa
<b>BCG:</b> <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>	<b>MOI:</b> Multiplicidad de infección
<b>BK:</b> Baciloscopia	<b>Mtb:</b> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>CD:</b> Cluster de diferenciación	<b>NKs:</b> Asesinas Naturales (del inglés Natural Killer)
<b>CMH:</b> Complejo mayo de histocompatibilidad	<b>OMS:</b> Organización Mundial de Salud
<b>CNBr:</b> Bromuro de cianógeno	<b>PAHO:</b> Organización panamericana de Salud
<b>DCs:</b> Células dendríticas (del inglés Dendritic Cells)	<b>PIM:</b> Fosfatidil-inositol manósido
<b>Fc:</b> Fragmento cristalizante	<b>PMN:</b> Polimorfonucleares
<b>FcR:</b> Receptor del fragmento cristalizante	<b>PPD:</b> Prueba cutánea de derivado proteico purificado
<b>FIDIC:</b> Fundación Instituto de Inmunología de Colombia	<b>ROS:</b> Especies reactivas de oxígeno
<b>HABPs:</b> Péptidos de unión de alta actividad	<b>TB:</b> Tuberculosis
<b>HBHA:</b> Hemaglutinina de unión a heparina	<b>TBA:</b> Tuberculosis activa
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b> Interferón gamma	<b>TBL:</b> Tuberculosis latente
<b>IL:</b> Interleucina	<b>Th<sub>1</sub>:</b> Linfocitos T ayudador 1
<b>IP:</b> Yoduro de propidio	<b>Th<sub>2</sub>:</b> Linfocitos T ayudador 2
	<b>TBMDR:</b> Tuberculosis multirresistente

## 1. RESUMEN

Actualmente la tuberculosis es un problema de salud pública. La forma más efectiva para contrarrestar es la vacunación; no obstante, se cuenta con la BCG, una vacuna que no otorga protección a toda la población, ya que solo protege a infantes de las presentaciones severas de la enfermedad. Durante años se ha evaluado el papel de la respuesta inmune humoral y celular frente a *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) para controlar el desarrollo de la enfermedad. Se conoce que los anticuerpos presentan funciones efectoras que median la respuesta inmune en diferentes patologías; sin embargo, para la tuberculosis no está bien descrita. En este proyecto se planteó el análisis de las funciones efectoras de los anticuerpos sobre macrófagos y neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv, a través del aislamiento de anticuerpos péptido específicos que reconocían péptidos derivados de la envoltura de la micobacteria; para esto se aislaron 34 anticuerpos péptido-específicos los cuales en su mayoría demostraron su función efectora neutralizante al inhibir la entrada de la micobacteria a macrófagos y además su capacidad para reducir la necrosis y aumentar la apoptosis en neutrófilos. Se encontró que los péptidos 40400, 31025 y 9111 son reconocidos por anticuerpos cuya función efectora en macrófagos neutraliza a la micobacteria inhibiendo su entrada y en neutrófilos reduce la muerte celular por necrosis favoreciendo un proceso apoptótico lo cual establece un mejor panorama en el control y resolución de la patología, estableciendo dichos péptidos como candidatos de un posible modelo vacunal sintético que supere la protección conferida por la BCG.

## 2. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa cuyo principal agente causal es *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (1). Las personas portadoras del bacilo pueden resolver espontáneamente la infección, no obstante, puede desarrollarse la forma activa (TBA) que afecta más frecuente a los pulmones (tuberculosis pulmonar), además, la micobacteria tiene la capacidad de migrar desde los pulmones hacia otros tejidos y órganos causando tuberculosis extrapulmonar. Por otro lado, se encuentra la forma latente de TB (TBL) en donde la micobacteria es contenida por la estructura del granuloma, cuyo objetivo es contener la multiplicación del bacilo tuberculoso (1). En Colombia, según el Ministerio de Salud en el año 2020 fueron notificados un total de 12.582 casos nuevos de TB con una incidencia de 22,6 casos y una mortalidad de 1,72 casos por cada 100.000 habitantes, persistiendo como un problema de salud pública en el país (2).

Considerando la importancia epidemiológica de la TB es necesario el uso de vacunas, dado que es el método más efectivo para contrarrestar la enfermedad según la OMS, en la actualidad se cuenta con la BCG (Bacillus de Calmette-Guérin) que induce protección especialmente contra las presentaciones severas de TB en la población infantil; no obstante, esta vacuna es ineficaz puesto que no ofrece protección a toda la población y además no reduce significativamente la incidencia de la patología a nivel mundial (3). Por tanto, se debe continuar con el estudio de candidatos vacunales eficientes, que permitan el control de la TB.

Durante la infección por *Mtb*, el sistema inmune juega un rol importante en el desarrollo y la resolución de la patología. Como respuesta inicial, el organismo cuenta con barreras de defensa primaria que buscan impedir el paso de la micobacteria hacia el espacio alveolar; entre dichas barreras se encuentran componentes que interfieren con sus mecanismos de replicación y proliferación; sin embargo, la micobacteria puede evadir esta respuesta y posteriormente entrar en contacto con diferentes poblaciones celulares en el espacio alveolar, entre las que se encuentran células epiteliales, macrófagos alveolares, células dendríticas (DCs, del inglés *Dendritic Cells*), células asesinas naturales (NK, del inglés *Natural Killer*),

neutrófilos y linfocitos. El desarrollo de la respuesta inmune innata y adaptativa en TB, está basada en la interacción receptor-ligando que permite el reconocimiento de la micobacteria, y la subsecuente liberación de citoquinas y quimiocinas direccionando una la respuesta inmune al foco de infección (4-7).

Entre las células del sistema inmune se encuentran los macrófagos y los neutrófilos, los cuales presentan en su membrana receptores que entran en contacto con ligandos de la micobacteria, interacción que permite su ingreso al espacio intracelular; a partir de este momento los macrófagos pueden convertirse en las células hospederas de la *Mtb* durante gran parte de la infección, siendo el punto de partida para la progresión de la patología y el inicio de la respuesta inmune innata, al producir citoquinas proinflamatorias que media la destrucción de la micobacteria (4 - 8). Por su parte los neutrófilos tras la fagocitosis del microorganismo, sintetizan IFN- $\gamma$  contribuyendo a la función defensiva del macrófago y sufren un proceso de muerte celular con desenlaces tanto beneficiosas como perjudiciales, para la resolución de la infección (4-8) Considerando lo anterior, se denota la importancia de estas poblaciones celulares en la respuesta inmune por lo cual es importante enfocar estudios en estas poblaciones.

Así mismo se ha evidenciado que la función efectora de los anticuerpos sobre estas poblaciones celulares contribuye al control de microorganismos patógenos. Una vez la micobacteria entra en contacto con los anticuerpos ocurre la fagocitosis mediada por receptores que reconocen la fracción cristalizable (Fc), generando un aumento en la actividad antimicrobiana de los macrófagos, y muerte por apoptosis en los neutrófilos; proceso que desencadena la activación de los macrófagos y aporta componentes funcionales a sus mecanismos de defensa (9 -11).

Con el fin de inducir una respuesta inmune de protección por medio de una vacuna, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) ha identificado secuencias peptídicas provenientes de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* denominadas HABPs (del inglés *High Activity Binding Peptides*), que presentan alta capacidad de unión específica a las células hospederas y que pueden inhibir la entrada de *Mtb* H37Rv a tales células *in vitro* (12 - 33). En la experiencia con malaria los HABPs han resultado ser poco inmunogénicos, por lo que la FIDIC ha

implementado estrategias para modificar dichas secuencias peptídicas con el fin de mejorar su potencial inmunogénico, considerando cambios de aminoácidos en las secuencias nativas, con relación a su tamaño y polaridad (12 - 33).

Considerando la importancia de los macrófagos y los neutrófilos en la TB y que además, la BCG no otorga protección a toda la población; es necesario encontrar antígenos capaces de inducir una respuesta inmune humoral, que desencadene la función efectora de los anticuerpos en macrófagos y neutrófilos, con el fin de contribuir a la destrucción de la micobacteria, y de tal forma, generar un posible resultado de importancia para el diseño de una nueva vacuna antituberculosa. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y con el fin de contribuir al diseño de una vacuna antituberculosa, en el presente estudio se buscó evaluar el papel de las IgGs que reconocen péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb*, en la inducción del tipo de muerte en neutrófilos y en la entrada de la micobacteria a macrófagos U937.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Establecer la función de anticuerpos que reconocen péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv, y su efecto en neutrófilos y macrófagos U937 infectados.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Identificar anticuerpos IgG en sangre periférica que reconocen antígenos peptídicos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv.
- Evaluar la capacidad que tienen los anticuerpos, que reconocen péptidos nativos y modificados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv, para inhibir la entrada de la micobacteria en los macrófagos U937.
- Analizar los tipos de muerte que se presentan en neutrófilos infectados por *Mtb* H37Rv pre incubada con anticuerpos que reconocen antígenos peptídicos derivados de la envoltura micobacteriana.

#### 4. ANTECEDENTES

La TB es una enfermedad infecciosa cuya transmisión se asocia a la propagación de gotículas provenientes de la saliva o secreciones respiratorias de un paciente con TB pulmonar a un individuo sano (4). Una vez *Mtb* ingresa al espacio alveolar, es fagocitada por los macrófagos alveolares promoviendo la respuesta inmune innata a expensas de neutrófilos, DCs, NK y mastocitos (4 - 7, 34).

Comúnmente los macrófagos hospedan a la *Mtb* y son el punto de partida para el desarrollo de la infección si no logran neutralizar al microorganismo. Estas células, producen citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , interleuquina 12 (IL-12) e interleuquina 1 $\beta$ , en respuesta al patógeno (7). Otros actores involucrados en esta respuesta, son las DCs que están asociadas de manera específica a la presentación antigénica siendo un puente entre la inmunidad innata y adaptativa, dado que estimula la proliferación de linfocitos (7). Entre tanto, los neutrófilos son las células que se presentan con mayor abundancia durante la infección, su respuesta se relaciona con los componentes presentes en sus gránulos y el tipo de muerte que presentan tras entrar en contacto con la micobacteria (7). En cuanto a las células NK, éstas cuentan con capacidad citolítica e inhibitoria para lisar monocitos infectados y producir citoquinas que impiden el crecimiento intracelular de *Mtb* respectivamente, disminuyendo la propagación de la infección (7). Finalmente, los mastocitos pueden desempeñar diversas funciones durante el desarrollo de la TB entre las que se menciona la liberación de citoquinas proinflamatorias en el foco de la infección, el reclutamiento celular y su contribución en la fibrosis crónica del tejido pulmonar (7).

Una vez se ha dado inicio a la respuesta inmune innata, la infección por *Mtb* puede avanzar permitiendo la intervención de células pertenecientes a la inmunidad adaptativa. Por su parte, la inmunidad adaptativa está relacionada con la interacción entre células presentadoras de antígeno (como macrófagos y DCs) y la población linfocitaria que incluye linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma$ - $\delta$  y linfocitos B. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son activados tras reconocer antígenos de *Mtb* presentados mediante el Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (CMH II), lo que inducen la producción de IFN- $\gamma$  el cual aumenta la función antimicobacteriana del macrófago (4 - 7, 35). Otra fuente significativa de IFN- $\gamma$  son los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que se activan tras reconocer

antígenos presentados en este caso a través del CMH I, liberando además gránulos citolíticos que se dirigen hacia la célula infectada para su destrucción (4). Células de la inmunidad innata y adaptativa ante la imposibilidad de eliminar la micobacteria, se ubican alrededor de ella, generando una estructura conocida como granuloma la cual busca contener la infección (4 - 7, 35).

Se ha visto que los neutrófilos pueden tener una función dual durante la infección por *Mtb*, ya que al reconocer a la micobacteria establecen un ambiente propicio para el desarrollo de la patología, así como también hacen frente a la infección desencadenando reacciones de manera defensiva (8). Tras el primer contacto con la micobacteria, los neutrófilos fagocitan el microorganismo y en un intento fallido por destruirlo, mueren por necrosis generando un daño tisular en el tejido adyacente (36). En contraposición, desde una perspectiva protectora, a partir de los neutrófilos son generados cuerpos apoptóticos, que además de presentar en su interior gránulos con características antimicrobianas útiles para inhibir el crecimiento intracelular tras ser fagocitados por los macrófagos, promueven potencialmente la presentación antigénica dirigiendo la respuesta inmune hacia una respuesta de tipo celular que puede contrarrestar el desarrollo de la enfermedad (36 - 39).

En síntesis, cuando se produce una muerte por apoptosis en los neutrófilos después del ingreso de *Mtb*, se propicia la respuesta inmune celular y los mecanismos micobactericidas en los macrófagos infectados. La apoptosis de neutrófilos en TB ha sido relacionada con vías dependientes de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *Reactive Oxygen Species*) que son generadas tras la fagocitosis de la micobacteria (40, 41). Es importante tener en cuenta que los neutrófilos presentan en su membrana receptores de la fracción Fc de los anticuerpos (FcγR), ya que esto les permite internalizar inmunocomplejos generados tras un proceso infeccioso y que están mediados por la opsonización de la IgG en algún microorganismo; lo cual se ha visto que acelera el proceso de apoptosis en estas células estimulando su degranulación y la producción de ROS (42, 43).

La FIDIC tiene como objetivo desarrollar una vacuna anti-tuberculosa con antígenos peptídicos multiepitope, siguiendo el modelo de malaria, que sea eficiente y otorgue protección a la mayoría de la población; por lo tanto, se han realizado

investigaciones enfocadas en la interacción de receptores presentes en las células hospederas y ligandos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* (19-40). Dichas investigaciones se fundamentan en un análisis bioinformático para identificar proteínas de interés determinando su ubicación subcelular, presencia, transcripción y expresión; una vez seleccionadas, se sintetizan en secuencias peptídicas de 20 aminoácidos cubriendo la secuencia completa de cada proteína (12-33).

Después de obtenidas las secuencias peptídicas, se evalúa su capacidad de unión específica a líneas celulares hospederas: macrófagos derivados de monocitos (U937) y células epiteliales alveolares tipo II (A549) (12-33). Teniendo en cuenta la interacción específica entre los péptidos y sus receptores en las líneas celulares, se realizan ensayos de inhibición de la entrada de la micobacteria, para finalmente determinar los péptidos que inhiben la entrada a las líneas celulares antes mencionadas, posteriormente éstas secuencias serán tenidas en cuenta para el desarrollo de la vacuna (12-33). Ahora bien, se ha demostrado con los antígenos para el desarrollo de la vacuna contra malaria, los péptidos nativos son inmunológicamente silentes, por lo cual se les realizan modificaciones de aminoácidos, con el fin de aumentar su inmunogenicidad (12-33).

Ahora bien, con el fin de aportar en el diseño de vacunas para la TB propuesto por la FIDIC, es fundamental evaluar la inmunogenicidad inducida *in vitro* por los péptidos. Considerando que se ha evidenciado que la inmunidad humoral también tiene un papel importante para evitar el desarrollo de la enfermedad, así como la intervención de los macrófagos y neutrófilos, en el presente trabajo, se propuso evaluar la capacidad de dichos anticuerpos que reconocen secuencias peptídicas obtenidas con la metodología de la FIDIC, para inhibir el ingreso de la micobacteria a macrófagos e inducir la apoptosis en los neutrófilos mediada por endocitosis de inmunocomplejos. Estos dos procesos podrían ser relevantes para lograr una respuesta inmune más eficiente.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. Generalidades de la Tuberculosis

La TB ha afectado a la humanidad desde hace millones de años, en la antigüedad era llamada “la plaga blanca” (44). En 1882 Robert Koch, médico y microbiólogo identifica el agente causal de la TB, el cual se denominó bacilo tuberculoso; Koch aisló y cultivó el bacilo de dicha enfermedad a través de la inoculación del agente causal en animales de experimentación (45, 47). En 1944, Selman Waksman, bioquímico y microbiólogo anunciaron el aislamiento del primer antibiótico frente a la TB, la estreptomycin, fármaco obtenido de una cepa de *Streptomyces griseum*, siendo el primer fármaco eficaz contra esta enfermedad, inicialmente se disponía de altas dosis, pero dado a problemas de toxicidad y resistencia se limitó su uso (47).

El contagio por *Mtb* se produce por vía aérea, cuando los aerosoles contaminados con la bacteria se depositan en los alvéolos pulmonares en donde puede iniciarse la infección y diseminarse por vía sanguínea a otras zonas del cuerpo (48). El primer contacto con el bacilo puede resultar en una resolución espontánea de infección, aunque también puede producirse la fase activa de la enfermedad (TBA) que ocurre entre el 5 al 10% de las personas que entran en contacto con la micobacteria o en otros casos puede desencadenarse la fase latente (TBL) (46).

En cuanto a manifestaciones clínicas, la TBL puede ser asintomática; sin embargo, en algunos individuos que contraen la infección y que son susceptibles a desarrollar la enfermedad, los síntomas pueden presentarse sin ser patognomónicos (50). Los síntomas de la TBA pueden ser agudos, subagudos o crónicos, estos pueden ser inespecíficos como la sudoración nocturna, pérdida de peso, fiebre, astenia y anorexia; algunos pueden llegar a ser más orientativos, como la tos o expectoración de más de 15 días de evolución que no mejora tras tratamiento con fármacos de primera línea; para el caso de la primoinfección en niños, esta suele ser asintomática o generar síntomas inespecíficos (51, 52). La TB extrapulmonar, se relaciona con diferentes patologías, acorde con el órgano o sistema en el que se desarrolla la infección como se observa en la Tabla 1 (53).

**Tabla 1.** Tuberculosis extrapulmonar. Modificado de *Diagnosis and treatment of tuberculosis: latest developments and future priorities*, 2017 (53).

<b>TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR</b>	<b>SINTOMATOLOGÍA</b>
Linfadenitis tuberculosa	Indolora, inflamación progresiva de los ganglios linfáticos.
Tuberculosis pleural	Puede ser asintomática, a menudo se asocia con síntomas pulmonares típicos de TB incluido el dolor torácico pleurítico.
Tuberculosis del sistema nervioso central	Se puede manifestar como tuberculomas, tuberculosis cerebral abscesos o meningitis tuberculosa, esta presenta síntomas clásicos de meningitis incluido el dolor de cabeza, fiebre, meningismo y déficits neurológicos focales.
Tuberculosis esquelética	Incluye la enfermedad de Pott caracterizada por dolor localizado, deformidad espinal. Puede estar asociado con complicaciones que generalmente afecta los huesos largos que soportan peso causando dolores localizados.
Peritonitis tuberculosa	Se caracteriza por presentar dolor abdominal, fiebre y adelgazamiento. Otras manifestaciones incluyen diarrea, ascitis, hepatomegalia y esplenomegalia.
Tuberculosis genitourinaria	Provoca disuria, hematuria, enfermedad pélvica inflamatoria, dolor en el flanco y masas según el sitio específico de infección.
Pericarditis tuberculosa	Presenta síntomas como dolor de pecho, tos y disnea, fiebre, taquicardia y cardiomegalia.

## **5.2 *Mycobacterium tuberculosis* y complejo el MTB**

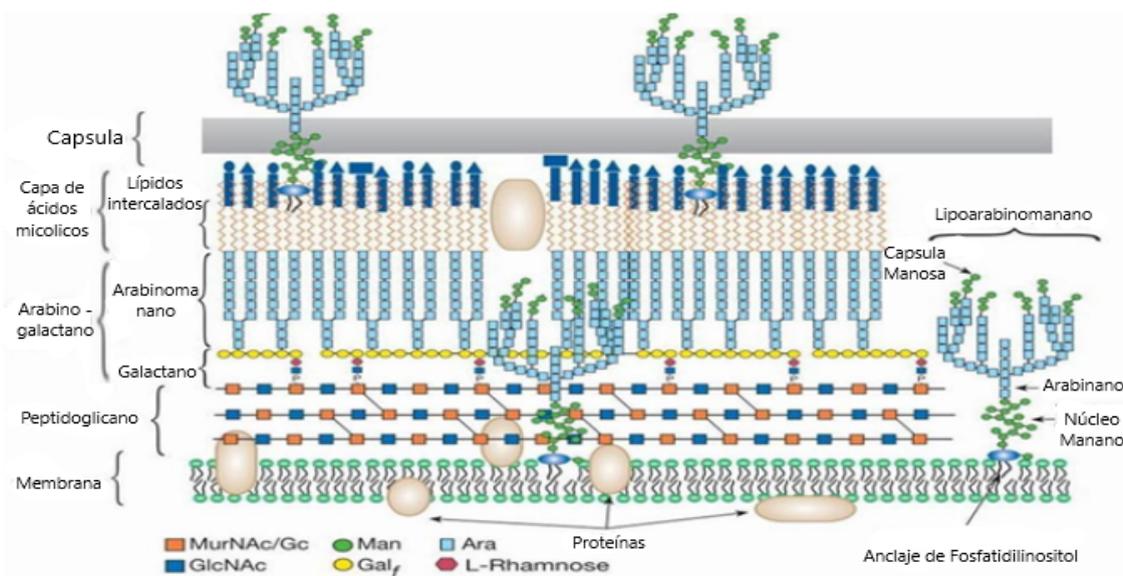
*Mycobacterium tuberculosis* es el principal agente causal de la TB en humanos y se describe como un bacilo ácido alcohol resistente con una longitud aproximada de 1 a 4 micras; conocido como patógeno intracelular de crecimiento lento aerobio estricto perteneciente a la familia *Mycobacteriaceae*, *Mtb* puede sobrevivir al interior de los macrófagos del hospedero (54, 55); además de tener ciertos mecanismos de evasión como lo son arresto o detención de la fusión fagosoma-lisosoma; resistencia contra los metabolitos reactivos del nitrógeno y óxido nítrico y la

interferencia con la presentación antigénica a moléculas CMH de clase II contra otras células del sistema inmune y un desarrollo de mediadores que favorecen la replicación bacteriana mediante las plaquetas (56).

La envoltura celular de *Mtb*, tiene una cápsula la cual incluye polisacáridos como lo son manano, glucanos y arabinomanano (57); por otro lado, su capa externa que consiste principalmente de ácidos micólicos hidrofóbicos que intervienen en la entrada de nutrientes provocando un crecimiento lento del microorganismo, aunque aumenta la resistencia celular frente a la degradación por parte de enzimas lisosomales; junto a esta capa se incluyen moléculas que contienen manosa como el lipoarabinomanano protegido con manosa (Man-LAM), el lipomanano (LM) y manoglicoproteínas, que se caracterizan por su potencial inmunogénico al ser reconocidas por las células de defensa en el hospedero (54, 55).

Además de la capa externa, este microorganismo presenta una capa interna la cual se encuentra compuesta por arabinogalactano, fosfatidil-inositol manósido (PIM) y peptidoglicanos, sumados al manano y el arabinomanano quienes están presentes en la superficie y conforman forman la cápsula exterior de la micobacteria (54, 55), como se observa en la Figura 1.

*Mtb* pertenece a una agrupación de microorganismos conocida como el complejo *Mycobacterium tuberculosis*; en él, se contempla un grupo de especies las cuales se caracterizan por presentar una homología en su ADN mayor al 95% y una envoltura de pared celular compleja. Este complejo abarca especies como *M. tuberculosis*, principal agente causal de la TB en humanos y *M. bovis* que afecta a bovinos y está asociada a TB en pacientes inmunocomprometidos (58).



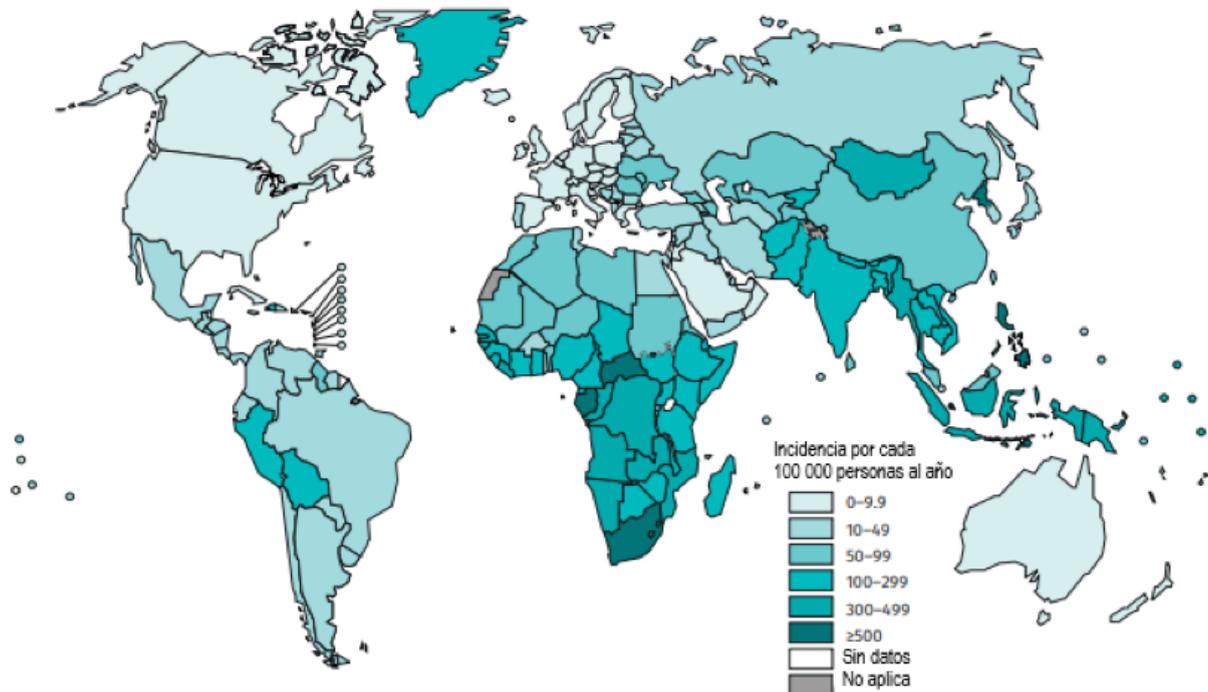
**Figura 1.** Envoltura micobacteriana. Modificado de *Identificación de interactores in vivo de la proteína FhaA de Mycobacterium tuberculosis*. 2018 (55).

Por otra parte también se encuentran *M. bovis* BCG aislada por Calmette y Guérin, que es la única vacuna utilizada en la prevención de la tuberculosis durante la infancia, *M. microti* causa la TB en roedores, llamas y otros mamíferos, *M. africanum* y *M. canettii* están estrechamente relacionadas con la *Mtb* dado que estas pueden llegar a causar tuberculosis humana y principalmente es encontrada en pacientes africanos, *M. pinnipedii* la cual infecta focas (58, 59), *M. caprae* agente causal de la tuberculosis en caprinos, también se puede dar en otros animales como cerdos, tigres siberianos, jabalíes, entre otros, *M. mungi* es una nueva especie causante de TB la cual es transmitida a través de la nariz y piel de la mangosta rayada, *M. orygis* es otra especie causante de TB en humanos y animales como rinocerontes, monos, ganado lechero, entre otros (60). Un estudio filogenético del complejo demostró que las cepas que hacen referencia a los animales se encuentran en un solo linaje marcado por la delección de regiones cromosómicas como la RD9 (61)

### 5.3 Epidemiología de la TB

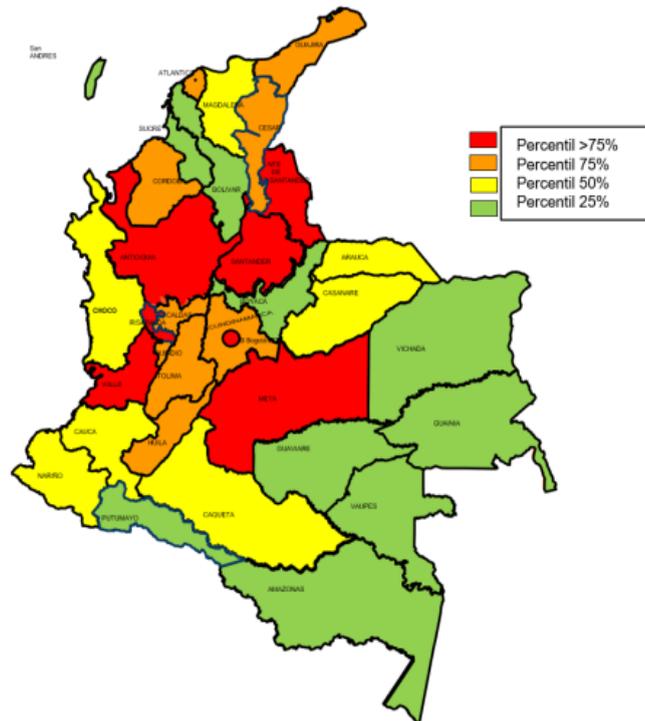
La problemática de la TB actualmente se relaciona con la incidencia presentada anualmente. Para el año 2020, las OMS reportó un estimado de 9,9 millones de personas infectadas por *Mtb*, de las cuales el 43% corresponde al Sur oriente

asiático, el 25% a África, el 18% al Pacífico oriental, el 8,3% al Mediterráneo oriental, 3% a las Américas y el 2,3% a Europa (62).



**Figura 2.** Incidencia a nivel mundial de TB para el año 2020. Tomado y modificado de *Global Tuberculosis Report. 2021* (62).

En Colombia, según el Ministerio de Salud para el año 2020 fueron notificados un total de 12.582 casos nuevos de TB con una incidencia de 22,6 casos y una mortalidad de 1,72 casos por cada 100.000 habitantes, siendo un problema de salud pública en el país (2). En relación con la caracterización poblacional, son los hombres la población más afectada con un 65,8% respecto a las mujeres con un 34,2% del total de la población infectada (2). Para el caso de los grupos de edad mayormente afectados por la TB, se encuentran entre 25 a 34 años con un 19,9%, personas mayores de 65 años con un 18,3% y niños y niñas menores de 15 años con un 2,2% (2). Regionalmente, los territorios con mayor cantidad de casos reportados en Colombia las cuales concentran el 75% de los casos son: Antioquia, Valle del Cauca, Bogotá D.C., Santander, Barranquilla, Norte de Santander, Meta y Risaralda como se muestra en la Figura 3 (2).



**Figura 3.** Porcentaje de casos de TB a nivel nacional en el año 2020. Tomado de *Informe de evento tuberculosis año 2021 (2)*.

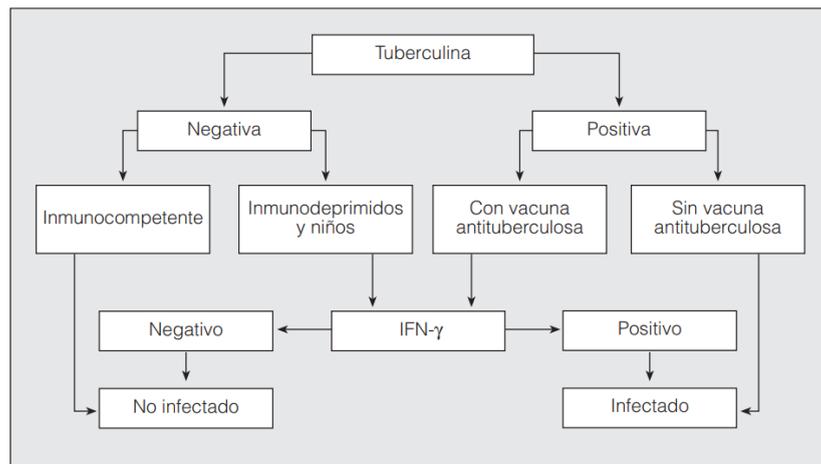
#### 5.4 Diagnóstico de tuberculosis

En el diagnóstico de la TB es necesario tener en cuenta diferentes criterios que incluyen bacteriológicos, histopatológicos, clínicos, epidemiológicos y radiológicos, siendo los bacteriológicos e histopatológicos confirmatorios del diagnóstico y suficientes para dar inicio al tratamiento (63).

La etapa de infección determina en algunos casos el tipo de método diagnóstico utilizado; por ejemplo, personas con TBL son diagnosticadas por la sensibilización del sistema inmune frente a antígenos de *Mtb*, a través de la Prueba de tuberculina (PPD) en la que un derivado proteico purificado es inyectado por vía intradérmica en el antebrazo generando una hipersensibilidad retardada de 48 a 72 horas cuando el resultado es positivo; la lectura de la prueba y su resultado dependen del diámetro de la induración generada en la zona de aplicación, una lectura positiva varía de acuerdo con el tipo de población a la que pertenece el individuo; una PPD positiva para una persona con VIH o que haya estado en contacto con una persona diagnosticada con TB es igual o mayor a 5 mm, para alguien que haga parte de la población de alto riesgo o personal de salud se considera positiva al ser igual o

mayor a 5 mm, y finalmente, una PPD mayor o igual a 15 mm es un resultado positivo en un individuo sin factores de riesgo (64, 65).

Otro método diagnóstico empleado en personas con TBL es el ensayo basado en la detección del IFN- $\gamma$  liberado como respuesta a la estimulación de las células T extraídas de sangre periférica sensibilizadas con antígenos específicos de *Mtb* (66, 67). En la figura 4 se observa la interpretación de los resultados de la PPD en combinación con las técnicas de IFN- $\gamma$ .



**Figura 4.** Algoritmo de utilización conjunta de la PPD y la técnica de IFN- $\gamma$  en el diagnóstico de la TB. Tomado de Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis 2008. (64)

Respecto al diagnóstico de la TBA se emplea la baciloscopia (BK); esta técnica consiste en la observación microscópica de bacilos ácido alcohol resistentes en una muestra determinada, tras aplicar la tinción de Ziehl-Neelsen con la cual se reporta el número de bacilos observados en el campo (tabla 2) (68 - 70).

**Tabla 2.** Informe de resultados del examen microscópico; baciloscopia. Tomado de la Guía para la vigilancia por laboratorio de Tuberculosis 2020. (68)

Resultado del examen microscópico	Informe
No se encuentran BAAR en los 100 campos observados	No se observan bacilos ácido-alcohol resistentes

Se observan de 1 a 9 BAAR en 100 campos observados	Número exacto de bacilos en 100 campos
Se observa entre 10 y 99 BAAR en 100 campos observados	Positivo (+)
Se observan de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos observados	Positivo (++)
Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados	Positivo (+++)

También se hace cultivo de micobacterias como técnica diagnóstica, en la que se precisan 21 días para evidenciar el crecimiento bacteriano tras la inoculación de una muestra proveniente de un paciente sospechoso de TB; actualmente se cuentan con medios a base de huevo (Ogawa-Kudoh, Lowenstein-Jensen), medios sintéticos (Middlebrook 7H10 y Middlebrook 7H9) y algunos medios líquidos (MGIT y MB/BacT), que por sus componentes permiten el desarrollo y crecimiento de la micobacteria en el medio (70).

En la actualidad, como criterio bacteriológico, es posible contar con la prueba GeneXpert; una técnica de PCR que identifica el ADN de *Mtb*, además detecta la posible resistencia de la cepa a la Rifampicina dada por la mutación del gen *rpo* en aproximadamente 2 horas; la resistencia a este antibiótico está asociada a la resistencia contra la Isoniacida, es por tanto que la resistencia a Rifampicina se considera un marcador TBMDR (71).

Finalmente, en cuanto al criterio histopatológico la biopsia de cualquier tejido que evidencie presencia de granulomas con necrosis de caseificación activa y un Ziehl-Neelsen positivo soporta resultado más claro para el diagnóstico de la patología; este criterio debe sustentar y correlaciona los resultados de criterios bacteriológicos (63).

## 5.5 Respuesta inmune innata en tuberculosis

El reconocimiento de *Mtb* está a cargo de estructuras específicas presentes en células fagocíticas, como son los receptores tipo toll, receptores del complemento, receptores de manosa, receptores Scavenger, receptores de inmunoglobulinas, entre otros; dicho reconocimiento inicia una serie de reacciones desde la membrana celular corriente abajo hasta el núcleo donde se estimula a la célula para producir interleuquinas proinflamatorias que buscan resolver la infección, y quimioquinas que modulan la respuesta inmune innata al atraer al foco infeccioso neutrófilos, DCs, NK y macrófagos, conectando directamente con la respuesta adaptativa al atraer de igual manera población linfocitaria (4, 36).

Los macrófagos en la TB cumplen diferentes funciones que dependen de la estimulación celular recibida, puesto que se encuentran en capacidad de expresar un fenotipo M1, en el que se induce la respuesta inmune celular proinflamatoria y en contraste un fenotipo M2, en el cual se genera una respuesta inmunosupresora antiinflamatoria (7, 35). Los macrófagos especialmente M1 reconocen el IFN- $\gamma$  liberado por otras poblaciones celulares, y sintetizan en su interior, componentes como ROS y óxido nítrico para atacar a la micobacteria y destruirla en su interior (7, 35).

En la infección por *Mtb*, los neutrófilos fagocitan la micobacteria y generan una explosión oxidativa enfocada en la destrucción del microorganismo, relacionada directamente con la unión de ROS a componentes enzimáticos presentes en los gránulos que se liberan tras la degranulación (7, 35, 72). También se ha visto que en la TB, los neutrófilos son sometidos a un proceso apoptótico para luego ser fagocitados por los macrófagos, favoreciendo la activación de los mismos y por tanto aumentando la respuesta proinflamatoria, para la resolución de la infección; sin embargo, en algunos casos dicha respuesta no se favorece y se entorpece la eliminación del patógeno a expensas de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune que posee *Mtb* (7, 35, 72).

Es necesario comprender que los neutrófilos se encuentran en capacidad de morir por vías dependientes e independientes de oxígeno tras procesos como necrosis,

apoptosis mediada por endocitosis directa de microorganismos, apoptosis mediada por endocitosis tras el reconocimiento de componentes del complemento y fracciones Fc de anticuerpos IgG que se encuentran opsonizando microorganismos, apoptosis por activación de receptores de muerte celular y netosis que consiste en liberación de trampas extracelulares de neutrófilos, descritas como barreras físicas que intentan contener la propagación de algún microorganismo (9, 10); además, se ha descrito que la formación de inmunocomplejos insolubles inducen apoptosis en neutrófilos a expensas de una vía de señalización intracelular así como la producción de ROS al interior de la célula (73 - 75). La importancia de este proceso radica en el tipo de muerte que genera *Mtb* en los neutrófilos y cómo esto contribuye o entorpece la respuesta inmune efectiva contra la infección.

En otro sentido, las DCs en TB, además de liberar IL-12 (que no sólo da lugar a la proliferación de linfocitos, sino que también genera un aumento en la producción de IFN- $\gamma$ ), son el intermediario central que conecta la inmunidad innata con la adaptativa, ya que reconocen y presentan antígenos provenientes de *Mtb* a linfocitos presentes en los ganglios linfáticos, para estimular su activación y migración hacia el foco infeccioso (6, 7, 35).

Para el caso de las células NK, estas son también una fuente importante de IFN- $\gamma$  e IL-12 y ejercen un control en la patología, a través de mecanismos citotóxicos relacionados con la presencia de gránulos, los cuales contienen componentes citotóxicos que son liberados durante la infección, para destruir células que se encuentran infectadas por *Mtb* (7).

## **5.6 Respuesta adaptativa en tuberculosis**

Luego de haber sido generada una respuesta celular a cargo de la inmunidad innata, células como macrófagos y DCs presentan por el CMH I y II antígenos peptídicos a linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente; realizando de igual forma la presentación antigénica de glucolípidos a células T restringidas de CD1<sup>+</sup> y fosfolípidos derivados de *Mtb* a linfocitos T  $\gamma\delta$  (35). Dichas interacciones celulares, dan lugar a la síntesis y liberación de IFN- $\gamma$ , promoviendo la activación de macrófagos infectados y la destrucción de la micobacteria mediada por ROS e intermediarios de nitrógeno reactivo; además de esto, linfocitos T CD8<sup>+</sup> excretan

granzimas y perforinas que contribuyen en la destrucción intracelular del microorganismo (35).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son los encargados de establecer el tipo de respuesta inmune adaptativa que va a generar durante la infección. Una expresión fenotípica del perfil Th<sub>1</sub>, produce una respuesta celular, aumentando la probabilidad de controlar el crecimiento y la replicación de la micobacteria; en contraste, la expresión de un perfil Th<sub>2</sub>, da como resultado la producción de citoquinas antiinflamatorias propiciando la acción de linfocitos T reguladores que, en conjunto suprimen los mecanismos efectores antimicrobianos y otorgan un ambiente favorable para el desarrollo de la infección (35).

Finalmente, se ha visto que los linfocitos B desempeñan un rol funcional en la inmunidad adaptativa, puesto que procesan y presentan antígenos a linfocitos T en los centros germinales, promoviendo una respuesta celular a cargo de linfocitos CD4<sup>+</sup> (11). Los linfocitos B median la respuesta inmune humoral como células productoras de anticuerpos quienes presentan una función efectora que activa células de la inmunidad innata, favoreciendo los mecanismos de defensa en la infección (11). Adicionalmente, se ha demostrado que existen anticuerpos encargados de opsonizar o neutralizar a la micobacteria; de esta forma, se ha visto que por medio de anticuerpos opsonizantes, los macrófagos logran fagocitar a la micobacteria desarrollando con éxito el fagolisosoma que destruye al microorganismo; mientras que, anticuerpos de tipo neutralizante, evitarían la infección por *Mtb* en los macrófagos alveolares (11).

### **5.7 Vacunas contra la TB**

En la actualidad, la única vacuna avalada por la OMS que puede emplearse para la protección contra TB es la vacuna del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) en la que se utiliza una cepa viva atenuada de *M. bovis*, para la inmunización en el ser humano (3). Sin embargo, esta vacuna solamente previene las formas severas de TB como la meningitis tuberculosa y la tuberculosis miliar en población infantil, siendo ineficaz para otorgar protección a la población restante y para reducir significativamente la incidencia global de TBA (3).

Para agosto del año 2021, de acuerdo con la OMS, se cuenta con 14 candidatos a vacunas ubicados en diferentes fases de análisis: 2 se encuentran en fase I, 8 en fase II, y 4 en fase III; entre ellos se incluyen tanto candidatos que buscan prevenir la infección y el desarrollo de la enfermedad, así como aquellos que ayudan a mejorar los resultados tras el tratamiento de la infección (62).

Con el fin de desarrollar una vacuna eficaz para la población, la PAHO establece 5 fases por las cuales debe pasar un candidato vacunal: la primera fase (fase preclínica) hace referencia a los ensayos experimentales basados en modelos animales que permitan sustentar su estudio posteriormente en humanos; la segunda fase (fase I es aquella en la que se procede a una implementación experimental en menos de 100 adultos evaluando seguridad y efectos biológicos; la segunda fase (fase II) implica el estudio en un grupo poblacional más grande (200 - 500 adultos) para determinar seguridad, eficacia, dosis y método de administración; la tercera fase (fase III) incluye el testeo de la vacuna en una mayor cantidad de voluntarios de cientos a miles, haciendo pruebas contra un placebo; finalmente, la cuarta (fase IV) está relacionada con los estudios en los que se evalúan los resultados posteriores a la aplicación respecto a su eficacia y posibles eventos adversos en la población (76).

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Diseño metodológico**

#### **6.1.1 Tipo de investigación**

La investigación se refiere al tipo cuantitativo dado que es un método científico el cual representará resultados a través de una expresión de cantidad numérica; haciendo posible interpretar los datos recolectados por medio de técnicas con apoyo en información de bases de datos.

#### **6.1.2 Alcance, nivel y enfoque de investigación**

La investigación tiene un enfoque exploratorio, ya que busca apoyar el diseño de una vacuna contra la TB con la aproximación empleada en el macroproyecto de la FIDIC identificando péptidos que cumplen parámetros específicos para ser incluidos en un modelo vacunal, a partir de los cuales se busca obtener anticuerpos específicos y evaluar su función efectora en macrófagos y neutrófilos infectados como objetivos de la investigación.

#### **6.1.3 Población objeto del estudio**

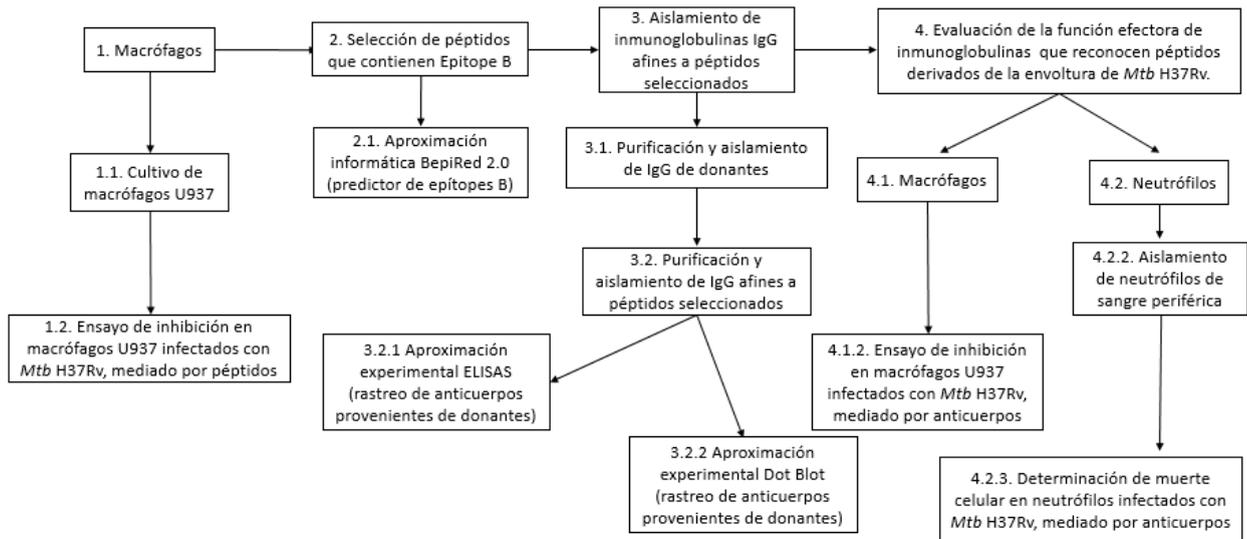
Ocho personas sanas entre los 25 y 45 años que tenían riesgo a estar en contacto con *Mtb*; además, toda la población cuenta con la vacuna de la BCG, teniendo en cuenta la exposición continua a micobacterias de origen ambiental.

#### **6.1.4 Muestra**

Neutrófilos aislados a partir de sangre periférica de donantes sanos y línea celular de macrófagos derivados de monocitos U937.

### **6.2 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS**

En la figura 5, se presenta el resumen metodológico que se llevó a cabo en la evaluación de la inhibición de la entrada de la *Mtb* a las células hospederas (U937) y la muerte celular en neutrófilos, infectados por *Mtb* H37Rv pre-opsonizada con IgGs que reconocen antígenos peptídicos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb*.



**Figura 5.** Resumen metodológico relacionado con la inhibición de la entrada de la *Mtb* a las células hospederas (U937) y la muerte celular en neutrófilos, infectados por *Mtb* H37Rv.

## 6.2.1 Macrófagos

### 6.2.1.1 Cultivo de macrófagos U937

Se utilizaron células U937 (macrófagos derivados de monocitos) para cultivo celular, se parte de 100.000 células para el mantenimiento del cultivo teniendo en cuenta que estas células se duplican cada 4 horas, se mantuvieron en incubación aproximadamente 5 días para tener una confluencia celular del 95 al 100%, una vez obtenido este porcentaje se procede al desprendimiento de estas utilizando tripsina a una concentración de 0.6% en incubación 3 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, pasado este tiempo se inactiva la tripsina al doble de volumen de RPMI 1640 suplementado con suero bovino al 10%, después se centrifuga el volumen total a 2500 rpm por 5 minutos, obtenido el pellet celular se disgrega hasta no dejar grumos y se resuspende en 2 mL del medio anteriormente mencionado para conteo en cámara de Neubauer y verificación de viabilidad celular mediante azul de tripán, una vez obtenido el total de células desprendidas se realiza el cálculo para disponer en caja de 24 pozos  $7,2 \times 10^6$  (300.000 células/pozo) células para el ensayo de inhibición de la entrada de *Mtb* H37Rv.

### **6.2.1.2 Ensayo de inhibición de la entrada de *Mtb* H37Rv en macrófagos en presencia de péptidos**

Los ensayos con macrófagos derivados de monocitos U937 (ATTC CRL-2367) se realizaron por triplicado. El ensayo en presencia de péptidos consistió en colocar  $1 \times 10^5$  células en placas de 48 pozos (Greiner bio-one CELLSTAR®) e incubarlas durante 2 h, a 4°C en 5% de CO<sub>2</sub> a diferentes concentraciones (2, 20 y 200 µM) de cada antígeno peptídico. Las células se infectaron con *Mtb* H37Rv GFP a 1:5 multiplicidad de infección (MOI).

Los ensayos en presencia de péptidos implican la preincubación de las micobacterias (*Mtb* H37Rv que expresa GFP) durante 1h a 37°C en agitación constante con cada antígeno peptídico. Los macrófagos se infectaron con estas micobacterias, se permitió el contacto por 12 horas a 37°C y luego se lavaron con PBS para eliminar las micobacterias extracelulares, se tripsinizaron para ser desprendidas de los pozos y por último, se fijaron durante la noche a 4°C con una solución de paraformaldehído-glutaraldehído (4% y 0,25% respectivamente) en PBS. Luego se utilizó la citometría de flujo para analizar la inhibición de entrada de la micobacteria a las células U937, utilizando un citómetro BD FACSCanto II para leer 10,000 eventos por pozo. Como control positivo de inhibición se emplearon citocalasina D (50µM) que impide el proceso de polimerización de los filamentos de actina y/o la colchicina (50µM) quien cumple la misma función a nivel de los microtúbulos en los dímeros de tubulina, procesos importantes durante el proceso de fagocitosis en la internalización de patógenos (77, 78). Se utilizaron células U937 incubadas con micobacterias sin ningún tipo de inhibidor como control de la infección y este valor se tomó como 100% de infección para calcular el porcentaje de inhibición en presencia de los diferentes inhibidores (péptidos).

## **6.2.2 Predicción de epítopes B**

### **6.2.2.1 Aproximación bioinformática**

Se describen como epítopes B aquellas secuencias antigénicas que pueden ser reconocidas por linfocitos B encargados de la producción de inmunoglobulinas específicas para estas. La aproximación bioinformática se realizó mediante una predicción de epítopes B en las secuencias peptídicas seleccionadas y proporcionadas por la FIDIC; se tuvo en cuenta aquellos epítopes que poseen una

longitud a partir de 5 aminoácidos. La determinación se realizó mediante el programa BepiRed 2.0 (79), un predictor de epítopes B lineales, a partir del cual se identificaron regiones con epítopes B en 48 secuencias peptídicas definidas como HABPs; además, este servidor generó un puntaje de predicción y se tomó un umbral de 0.5 para definir el epítope.

### **6.2.3 Aislamiento de inmunoglobulinas IgG afines peptídicos seleccionados**

#### **6.2.3.1 Aislamiento y purificación de IgG**

Con el fin de aislar IgG total se tomó una muestra de sangre periférica separando el suero de la fracción celular; se inactivaron los sueros de los 8 donantes reclutados a 55°C por 30 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos, se adiciona el doble de buffer acetato 0.5M pH 4 (0,83 g de acetato y 100 mL agua desionizada) respecto al volumen inicial del suero, inicialmente se precipitaron las proteínas que no correspondían a gammaglobulinas con ácido caprílico (98%) mezclando durante dos horas, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos, quedando en el sobrenadante las inmunoglobulinas el cual fue filtrado con papel Whatman N°2. Después, la IgG se precipitó con sulfato de amonio saturado al 40%, se dejó en agitación constante en un baño de hielo y después durante toda la noche a 4°C, se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos a 4°C, se lavó el pellet mediante centrifugación 3 veces con una solución de sulfato de amonio saturado al 33% y se resuspendió en solución salina al 0.9 g/L de NaCl. Finalmente, con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de impurezas, las inmunoglobulinas obtenidas se dializaron frente a Tris 10mM pH 8.5 durante toda la noche y después se realizaron dos cambios del Tris 10mM cada dos horas.

#### **6.2.3.2 Purificación de IgG péptido-específica**

La purificación de IgGs que reconocen péptidos seleccionados, se realizó por cromatografía de afinidad mediante la unión del anticuerpo de interés a un péptido inmovilizado en una resina. Para ello se preparó una columna de Sefarosa 4B funcionalizada con Bromuro de Cianógeno (CNBr), activándose con 1mL de HCl (1mM), posteriormente se acopló 1 mg de péptido de interés en bicarbonato de sodio (0.1M pH 8.3), a continuación, para bloquear sitios libres de unión a aminas la resina se trató con Tris HCl (0.1M pH 8.0) y se realizaron 3 ciclos de lavado alternando los buffers de acetato de sodio (0.1M pH 4) y Tris HCl (0.1M pH 8.0), por

último, se adiciona bicarbonato de sodio (pH 8.3) y a continuación, se dejó pasar la muestra que contenía la IgG por la columna más dos lavados con PBS 1x, cada uno de 100 µL recogiendo el primer pase para eliminar la IgG no retenida. Posteriormente la fracción retenida en la columna, que corresponde a la inmunoglobulina de interés, se eluyó con glicina al 0.1M (pH 2.7 - 3) y se recolectó en tubos eppendorf con Tris HCl 0.1M para evitar la desnaturalización del anticuerpo (80). Las gammaglobulinas se concentraron en Amicon (membrana 100.000 NMWL, Da) por centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C.

#### **6.2.3.2.1 Aproximación experimental ELISAs**

A partir de 8 donantes seleccionados de la base de datos de la FIDIC, fueron obtenidos sueros en los cuales se verificó la presencia de anticuerpos que reconocían péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de la micobacteria los cuales presentaron epítopes B de acuerdo con la predicción realizada en el BepiPred 2.0. Para este estudio se contó con los consentimientos informados de cada uno de los donantes reclutados, los cuales autorizan el uso de las muestras con fines investigativos (formato disponible de acuerdo con requerimientos). Se utilizó posteriormente, el inmunoensayo ELISA en el que, antígenos peptídicos y el lisado de *Mtb* H37Rv se inmovilizaron en cajas de 96 pozos fondo redondo a una concentración de 10 µg/mL en PBS y se incubaron a 37°C durante dos horas, se descartó el contenido de los pozos y se realizaron tres lavados con solución de lavado con Tween 20 en PBS y dos enjuagues con agua destilada, se secaron los pozos y se adiciona 200µL de solución de bloqueo (Tween 20 y leche descremada al 5% en PBS ) bloqueando así los sitios libres y evitando uniones inespecíficas, se incubó a 37°C durante 2 horas, se descartó el contenido de los pozos y se lavó nuevamente, después se adiciona 100µL de anticuerpo primario (sueros de donantes) en una dilución 1:100, se incubó durante 2 horas a 37°C y se lavó, posteriormente se adiciona el anticuerpo secundario (Anti Human IgG – conjugado con peroxidasa) en una dilución 1:10000, se incubó durante 1 hora a 37°C, se lavó y después se reveló adicionando solución de revelado KPL, finalmente se detiene la reacción adicionando 50 µL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y se procede a realizar la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm.

#### **6.2.3.2.2 Aproximación experimental Dot Blot**

Se evaluó el reconocimiento de las inmunoglobulinas por Dot Blot en el cual utilizando una membrana de nitrocelulosa, los antígenos (lisado de *Mtb* H37Rv/péptido) se dispusieron a una cantidad de 5 µL por pozo y se incubaron a 37°C por 10 minutos, se realizaron 4 lavados con Tween al 0,5 en PBS con agitación constante por 3 minutos y se bloquearon los sitios de unión libres (Tween al 0,5% y leche descremada al 10%) durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación constante, se lavó y se adicionó la inmunoglobulina en una dilución de 1:5000. Luego de incubar durante 10 minutos a 37°C, se realizaron 3 ciclos de lavado, se agregó el anticuerpo secundario (anti-humano conjugado con fosfatasa) en dilución 1:5000, se incubó durante 1 hora a 37°C y se reveló con Kit de sustrato Vector® VIP, peroxidasa (HRP) - (SK-4600) añadiendo 10 µL de cada componente en 1 mL de agua destilada dando como positivo un color púrpura en los pozos (81).

#### **6.2.4 Evaluación de la función efectora de inmunoglobulinas que reconocen péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv**

##### **6.2.4.1 Macrófagos**

##### **6.2.3.4.1.2 Ensayo de inhibición de la entrada de *Mtb* H37Rv en macrófagos, mediado por IgG**

Los ensayos con macrófagos derivados de monocitos U937 (ATTC CRL-2367) se realizaron por triplicado. El ensayo en presencia de inmunoglobulinas que reconocen péptidos consistió en colocar  $1 \times 10^5$  células en placas de 48 pozos (Greiner bio-one CELLSTAR®) e incubarlas durante 2 h, a 4°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se infectaron con *Mtb* H37Rv GFP a 1:5 multiplicidad de infección (MOI).

Los ensayos en presencia de anticuerpos implican la preincubación de las micobacterias durante 1h a 37°C en agitación constante con las IgGs aisladas que reconocen cada antígeno peptídico. Los macrófagos se infectaron con estas micobacterias pre incubadas, se permitió el contacto por 12 horas a 37°C y luego se lavaron con PBS para eliminar las micobacterias extracelulares. Se fijaron durante la noche a 4°C con una solución de paraformaldehído-glutaraldehído (4% y 0,25% respectivamente) en PBS . Luego se utilizó la citometría de flujo para analizar la inhibición de entrada de la micobacteria a las células U937, utilizando un citómetro

BD FACSCanto II para leer 10,000 eventos por pozo. Se utilizaron células incubadas con micobacterias sin ningún tipo de inhibidor como control de la infección y este valor se tomó como 100% de infección para calcular el porcentaje de inhibición en presencia de los diferentes inhibidores (anticuerpos purificados).

#### **6.2.4.2 Neutrófilos**

##### **6.2.4.2.1 Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica**

Se obtuvieron 10 mL de sangre periférica de los 8 donantes, en tubos heparinizados para luego centrifugar a 2800 rpm durante 10 minutos y tomar la fracción del *Buffy-coat*, la cual fue resuspendida en PBS 1x hasta alcanzar un volumen de 10 mL; posteriormente, se mezclaron con Ficoll-Histopaque en proporción 2:1 y fueron centrifugados a 550 g durante 30 minutos, con el fin de extraer la capa intermedia entre los eritrocitos y Ficoll-Histopaque donde se encuentran los PMN con algunos glóbulos rojos; dicha capa fue resuspendida en PBS y para eliminar la cantidad presente de Ficoll-Histopaque, se realizaron 2 lavados a 1800 rpm durante 5 minutos a 20 °C. Se eliminó la contaminación de glóbulos rojos adicionando 5 mL de buffer de lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,5 M,  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, EDTA 0,01 M y 100 mL de agua destilada para buffer 10X) durante 10 minutos; luego se realizaron 2 lavados con PBS a 1800 rpm durante 5 minutos a 20 °C y se resuspendieron los PMN en 3 mL de RPMI con Suero bovino al 10%, se realizó conteo en cámara de Neubauer y se verificó su viabilidad para luego disponer en caja de 96 pozos 150.000 células/pozo (82).

##### **6.2.4.2.2 Ensayo de invasión en neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv, mediado por IgG**

Se incubaron  $1 \times 10^8$  *Mtb* H37Rv con 30  $\mu\text{l}$  de los anticuerpos péptido-específicos a 37°C durante 2 horas en agitación continua, para obtener la micobacteria opsonizada. Considerando una multiplicidad de infección (MOI) 1:5 relación neutrófilos-micobacteria, el cual se adoptó después de evaluar diferentes MOIs (1:5, 1:10 y 1:15). La micobacteria pre-opsonizada se puso en contacto con  $1 \times 10^5$  neutrófilos por pozo en cajas de 96 y se permitió la fagocitosis por 18 horas a 37°C en atmósfera de  $\text{CO}_2$ . Transcurrido este tiempo, se marcaron los neutrófilos con Annexin V BioLegend 1,0  $\mu\text{l}$  y Propidium Iodide BioLegend 0,4  $\mu\text{l}$  por pozo y se incubaron durante 15 minutos a 4°C. Para descartar la micobacteria no fagocitada,

se pasaron las muestras a tubos eppendorf de 0.6 mL y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, las células se fijaron con paraformaldehído-glutaraldehído (4% y 0.5%).

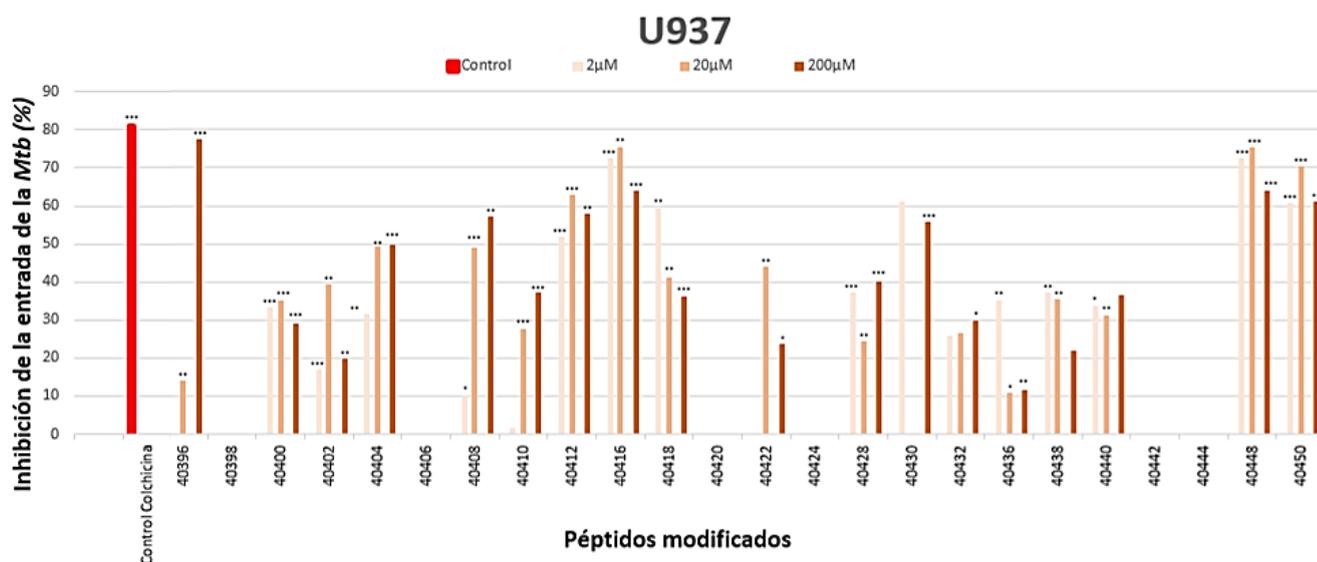
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Inhibición de la entrada de *Mtb* H37Rv por péptidos nativos y modificados a macrófagos U937

Teniendo en cuenta que los péptidos nativos estudiados en ensayos preliminares (Figura 1 - anexos) tienen la capacidad de inhibir la entrada de la micobacteria, siendo este uno de los criterios para la selección de las secuencias candidatas a vacuna antituberculosa según la metodología de FIDIC; se evaluó si los péptidos modificados podrían inhibir la entrada del patógeno a células diana de igual manera para ampliar el rango de selección de los péptidos proporcionados por la FIDIC a partir de los que se obtendrían los anticuerpos péptido-específicos. En la figura 6 se observa la capacidad que tienen los péptidos modificados a diferentes concentraciones, para inhibir la entrada de la micobacteria a los macrófagos U937; se consideraron porcentajes de inhibición mayores a un 10% dado que estos representan diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control de invasión usado en el ensayo ( $P > 0.05$ ).

Los péptidos con un porcentaje de inhibición mayor al 10% corresponden a las secuencias 40396, 40400, 40402, 40404, 40408, 40410, 40412, 40416, 40418, 40422, 40428, 40430, 40432, 40436, 40438, 40440, 40448, 40450. Lo cual muestra que un 75% de los péptidos analizados inhibieron la entrada de la micobacteria a los macrófagos, que como se mencionó anteriormente es una característica fundamental para la metodología de selección de candidatos en la FIDIC. Entre los péptidos con capacidad de inhibición se encuentran la mayoría de los nativos y la mayoría de los modificados; así el 25% de los péptidos modificados restantes que no presentaron inhibición y aquellos que presentaban cambios significativos en sus secuencias respecto a los nativos, no fueron incluidos en los ensayos posteriores junto a su contraparte nativa, así como aquellos a excepción de algunos que fueron

usados como controles.



**Figura 6.** Evaluación de la capacidad inhibitoria de péptidos modificados. Se determinó la inhibición de la entrada de *Mtb* a macrófagos U937 mediada por los péptidos modificados en concentraciones de 2 uM, 20 uM y 200 uM; en rojo control de colchicina (70,93%). Los resultados de la prueba *t-Student*, están representados por los asteriscos sobre cada barra \* $\leq 0.05$ , \*\* $\leq 0.01$  y \*\*\* $\leq 0.001$ .

## 7.2 Selección de péptidos derivados de proteínas de la envoltura de *Mtb* H37Rv

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición, se seleccionaron 48 secuencias peptídicas entre nativas y modificadas de 15 proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv (Tabla 3), con el objetivo de identificar regiones que pudieran ser reconocidas por anticuerpos; para esto, se evaluaron epítopes B los cuales presentaron una longitud de 5 hasta 17 aminoácidos. Las secuencias de los péptidos modificados presentaron de igual forma epítopes B lo cual sugiere que a pesar de las modificaciones en sus aminoácidos aún presentan regiones para ser reconocidas como epítopes B.

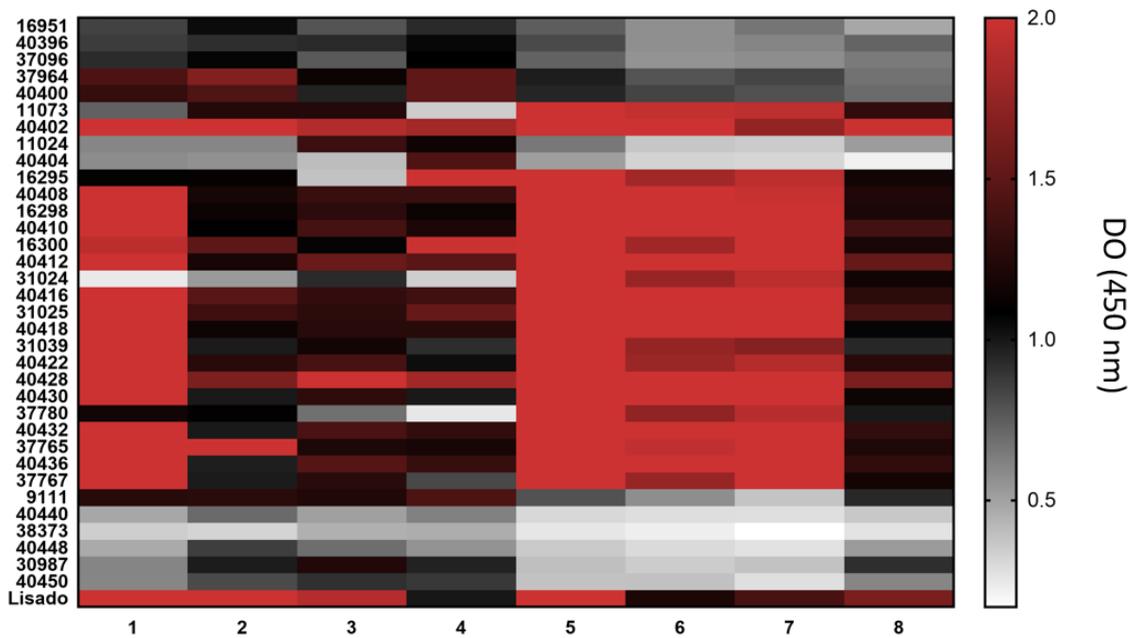
**Tabla 3.** Enfoque bioinformático para caracterizar antígenos candidatos. Se muestran las secuencias nativas de los péptidos seleccionados seguidas de sus secuencias modificadas; las secuencias naranjas corresponden a los péptidos nativos, los cuales fueron sintetizados a partir de las secuencias de proteínas de la



25				C				C						
24				G		C		G		C		C		C
23				Y		G		A		G		G		G
22		C		A		I		S		S		Q		N
21		G	Y	L		Y		S		K	Y	R		G
20	L	L	A	Q	I	F	V	L	Y	Q	S	T	E	A
19	P	P	L	A	Y	D	D	S	Y	D	R	G	K	G
18	E	E	E	A	F	R	T	S	S	P	V	K	N	L
17	A	A	A	S	D	L	V	G	P	Y	T	Q	I	N
16	A	A	A	A	R	S	A	F	L	Y	A	D	R	S
15	P	P	G	P	L	A	A	P	S	S	T	A	N	K
14	A	A	A	S	S	P	G	Q	I	P	V	Q	G	L
13	P	P	P	S	A	S	L	L	N	L	N	L	A	N
12	T	T	S	W	P	T	S	R	I	S	S	S	G	D
11	T	S	S	T	A	P	Y	T	N	L	P	P	L	L
10	A	A	W	L	T	S	G	N	Y	N	I	G	N	P
9	D	D	T	P	D	S	P	P	A	L	A	S	D	K
8	V	F	L	P	G	F	P	T	P	N	T	N	I	Y
7	T	S	P	A	S	A	V	S	D	Y	G	T	I	P
6	T	T	P	V	R	Q	L	N	S	A	S	R	P	G
5	A	A	A	N	V	F	R	A	M	P	N	M	D	A
4	K	K	V	A	A	G	T	M	Q	D	L	H	G	G
3	P	P	N	G	Y	A	N	S	I	S	R	A	N	L
2	V	G	A	G	G	G	P	G	Q	G	M	G	K	G
1	Y	C	G	C	A	C	C	C	T	C	H	C	Y	C
Position	37765	40436	37767	40438	9111	40440	30960	40442	36827	40444	38373	40448	30987	40450
	Rv1911c			Rv2004c			Rv2301		Rv1980c		Rv3494c		Rv679c	

### 7.3 Evaluación del reconocimiento de péptidos nativos y modificados a partir de inmunoglobulinas presentes en suero humano

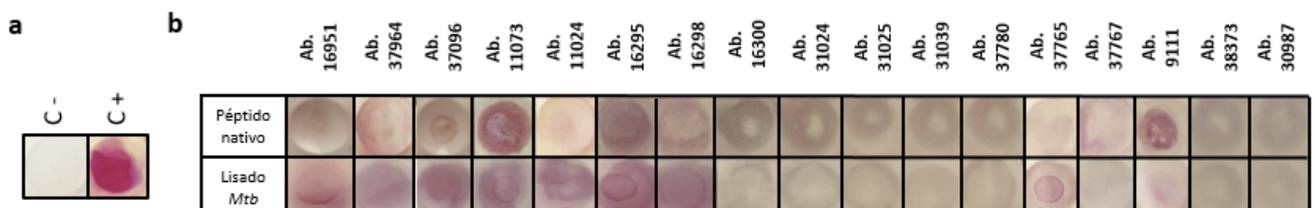
A partir de la predicción de epítopes B, se analizó en los sueros de cada donante la capacidad que tienen sus anticuerpos para reconocer secuencias peptídicas nativas y modificadas a través de ensayos de ELISA (figura 7); en ésta se evaluó la absorbancia obtenida respecto al reconocimiento de cada secuencia peptídica, dado que la concentración de anticuerpos que reconocen las secuencias es directamente proporcional a la absorbancia obtenida. De tal forma, aquellos resultados con mayor absorbancia (DO 1.0 - 2.0 nm) sugieren una mayor cantidad de inmunoglobulinas presentes en el suero del donante, que reconocen las diferentes secuencias estudiadas. En general como se observaba en la predicción de epítopes B, donde no se perdieron estas secuencias al modificar los péptidos, aquí también se observa el reconocimiento por parte de los donantes hacia los péptidos nativos y modificados, por lo tanto se puede continuar con la extracción de los anticuerpos.



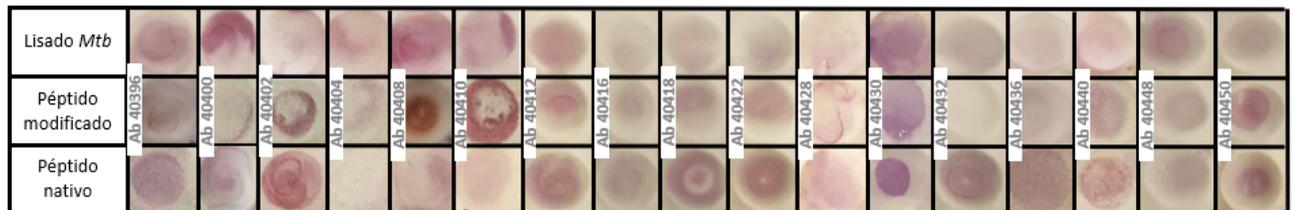
**Figura 7.** Reconocimiento de péptidos nativos y sus secuencias modificadas por sueros de los donantes reclutados. En el eje Y se encuentran los péptidos nativos, modificados y el control de reconocimiento que correspondió al lisado de *Mtb* H37Rv, en el eje X, la codificación empleada para identificar a los donantes que participaron en el estudio.

#### 7.4. Aislamiento de inmunoglobulinas IgG afines a peptídicos seleccionados

Una vez evidenciado el reconocimiento de los péptidos tanto nativos como modificados por parte de los anticuerpos presentes en el suero de cada donante; se realizó la extracción y purificación de anticuerpos específicos para cada secuencia peptídica; posterior a dicho proceso se observó mediante un Dot Blot, que el reconocimiento de las inmunoglobulinas obtenidas se mantuviese a lo largo desde el inicio hasta el final de la extracción y purificación, mostrando la eficiencia de este procedimiento (figura 8 y 9).



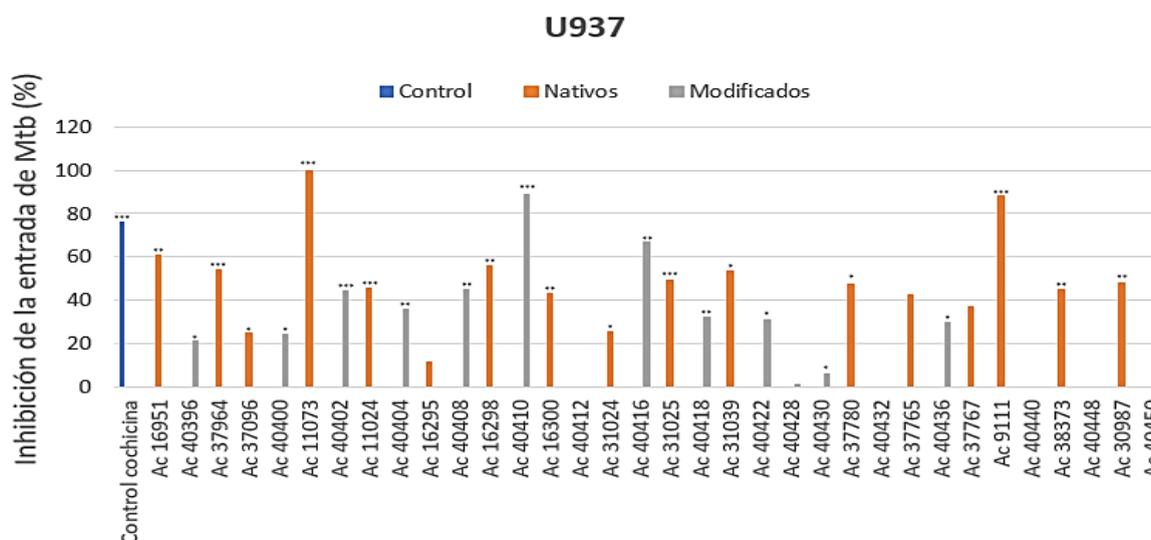
**Figura 8.** Dot blot del reconocimiento antigénico de IgGs péptido-específicas aisladas a partir de los sueros de donantes **(a)**. Control negativo BSA y control positivo lisado de *Mtb* H37Rv reconocido por IgG humana total. **(b)** IgG purificada específica para péptidos nativos que reconoce las secuencias nativas y el lisado de *Mtb* H37Rv.



**Figura 9.** Reconocimiento de inmunoglobulinas péptido-específicas de secuencias modificadas. Primero, se observa el reconocimiento del lisado *Mtb* H37Rv por IgG purificadas que reconocen específicamente los péptidos modificados, en segunda instancia se observa el reconocimiento de péptidos modificados por parte de IgGs purificadas específicas hacia los mismos. Por último, se evidencia el reconocimiento de las IgGs purificadas específicas de péptidos modificados, hacia las secuencias nativas de las cuales fueron derivados los péptidos modificados

### 7.5 Inhibición de la entrada de *Mtb* H37Rv por anticuerpos dirigidos a péptidos nativos y modificados a macrófagos U937

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la entrada de la micobacteria expuestos anteriormente; se evaluaron 34 anticuerpos específicos de péptidos, derivados de proteínas de la envoltura de *Mtb* H37Rv, en la inhibición de la micobacteria en macrófagos U937. El 8,82% de los anticuerpos analizados (Ac 11073, Ac 40410 y Ac 9111) inhibieron la entrada de la micobacteria a los macrófagos en un porcentaje superior al control, mostrando ser anticuerpos relevantes en este ensayo; adicionalmente, el 70,59% de los anticuerpos presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 10% (anticuerpos que reconocen los péptidos: 16951, 40396, 37964, 37096, 40400, 40402, 11024, 40404, 16295, 40408, 16298, 16300, 31024, 40416, 31025, 40418, 31039, 40422, 37780, 40440, 37765, 37767, 38373 y 30987), estableciendo la importancia de estos en el presente estudio.



**Figura 10.** Anticuerpos (Ac) que reconocen péptidos nativos (naranja) y modificados (grises) derivados de proteínas presentes en la envoltura de la *Mtb* H37Rv, inhiben la entrada de la micobacteria a macrófagos U937. El control positivo de inhibición se muestra en color azul. Los resultados de la prueba *t-Student*, están representados por los asteriscos sobre cada barra \* $\leq 0.05$ , \*\* $\leq 0.01$  y \*\*\* $\leq 0.001$ .

### 7.6 Muerte celular en Neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv, mediada por IgG

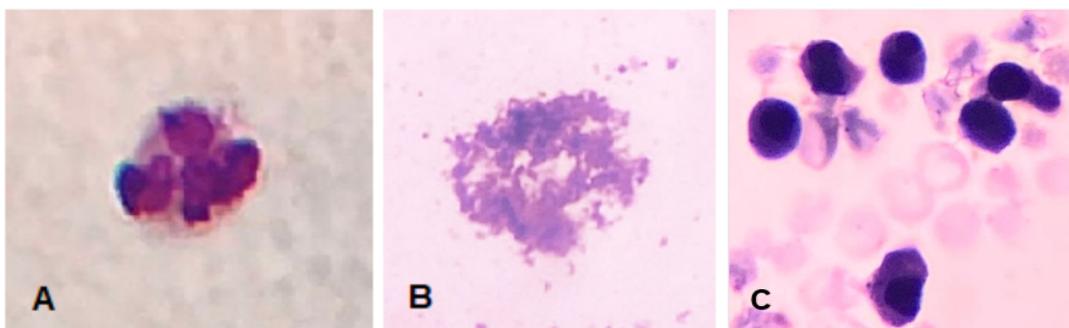
En relación a los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la entrada de la micobacteria, se realizó la evaluación de la función efectora de los anticuerpos empleados, en cuanto al tipo de muerte celular que inducían en neutrófilos humanos de 8 donantes tras entrar en contacto con la micobacteria pre opsonizada con los anticuerpos previamente extraídos y purificados; en este punto, haciendo uso de la citometría de flujo se analizaron la necrosis y la apoptosis producida en neutrófilos como los dos principales tipos de muerte celular en esta población, empleando como fluoróforos el Yoduro de propidio (IP) que interacciona con estructuras del ADN tras un proceso necrótico (87) y la Anexina V (AV) quién se une a la fosfatidil serina presente en la capa externa de las células que entran en apoptosis (88).

Para este procedimiento, se realizó la extracción de neutrófilos de cada donante los cuales fueron puestos en contacto con la micobacteria pre opsonizada de forma independiente con 34 anticuerpos específicos de secuencias nativas y modificadas. Se estableció para cada donante, un control específico de infección con la micobacteria sin pre opsonizar, el cual fue marcado con IP y AV para evidenciar los

porcentajes de necrosis y apoptosis presentados en condiciones normales de infección; a partir de esto, se estableció el punto de partida para definir si el anticuerpo con el que fue pre opsonizada la micobacteria aumenta o disminuye los porcentajes de necrosis y apoptosis en los neutrófilos de cada donante.

La tabla 4 resume los resultados que fueron obtenidos para este ensayo, a partir de los cuales se evidencia la función efectora que presentan los anticuerpos estudiados al formar inmunocomplejos e interactuar con neutrófilos humanos, promoviendo la muerte celular apoptótica y así mismo, reduciendo la muerte por necrosis que se genera en las condiciones normales de infección; como resultados complementarios, fue posible analizar morfológicamente los cambios generados a partir de los tratamientos a los que fueron expuestos los neutrófilos (figura 11), realizando un extendido teñido con tinción de Wright para su observación microscópica.

**Figura 11. Necrosis y apoptosis en neutrófilos humanos. (A)** Neutrófilo en condiciones normales a las 0 horas de incubación, con citoplasma rosado y núcleo multilobulado. **(B)** Neutrófilo necrótico obtenido después de 24 horas de incubación en condiciones normales de infección con *Mtb* H37Rv; se observa la liberación de los componentes intracelulares al exterior. **(C)** Neutrófilos apoptóticos obtenidos después de 24 horas de incubación con *Mtb* H37Rv pre opsonizada con anticuerpos que reconocen el péptido 40402; se observa la pérdida del núcleo multilobulado característico de los neutrófilos, la disminución del tamaño celular y la formación de cuerpos apoptóticos al interior de la célula que contienen el material intracelular condensado.



AC	DONANTE															
	1		2		3		4		5		6		7		8	
	NEC Ctrl (8,52)	APOP Ctrl (23,70)	NEC Ctrl (8,70)	APOP Ctrl (6,37)	NEC Ctrl (2,55)	APOP Ctrl (1,32)	NEC Ctrl (10,50)	APOP Ctrl (1,51)	NEC Ctrl (28,10)	APOP Ctrl (3,92)	NEC Ctrl (11,70)	APOP Ctrl (7,60)	NEC Ctrl (18,30)	APOP Ctrl (3,80)	NEC Ctrl (13,70)	APOP Ctrl (2,32)
16951	4,31**	11,60***	31,35***	0,93**	2,79	10,60***	1,06***	2,94***	17,50**	9,96**	10,30***	24,55***	47,30***	17,75***	3,42***	7,51***
40396	5,10**	14,50***	6,69*	0,29***	1,31***	9,74**	1,80***	1,31*	30,10***	19,50***	17,10***	16,40***	13,20***	4,96*	6,42***	13,20***
37964	3,81*	20,15	6,87*	1,27*	2,76	13,40***	29,55***	13,35**	3,94***	11,90**	18,00***	13,70	1,93***	31,70***	3,59**	3,66**
37096	3,74***	49,50***	14,25**	2,81***	5,68*	10,35***	1,50**	2,06**	12,21*	7,78	8,63***	6,15**	2,91**	7,45***	24,35	3,29
40400	3,18**	57,80***	2,96**	3,12***	1,71*	28,55***	3,62**	3,97***	10,70***	8,33**	8,69	19,60***	5,00***	46,35***	3,86***	6,54***
11073	6,85*	13,85**	27,05***	2,43***	17,9**	8,43*	2,93***	4,56**	33,70***	1,97*	8,41**	17,35**	15,90***	6,51**	10,56*	3,14
40402	5,49**	14,45**	45,15***	1,28***	1,63*	13,25***	3,72***	5,17**	36,00***	11,60**	7,08**	22,00**	26,50***	9,37**	7,19***	7,05***
11024	3,10**	28,40*	18,85**	0,32***	3,10	29,01**	1,18***	4,49**	37,80***	15,80***	13,08	27,00*	21,45	15,85***	4,67***	7,25***
40404	4,17*	14,40***	34,60**	1,28***	36,10**	32,40***	2,21***	2,49**	15,30***	17,10***	17,65**	14,25	14,40**	21,20***	1,69***	9,88***
16295	6,83	8,85**	21,50***	1,17***	27,45***	16,15***	1,91***	13,80**	36,70***	6,00*	18,80**	24,50**	5,68**	4,26	2,39***	17,30***
40408	5,18**	19,00**	16,60**	1,71***	10,08**	30,40***	2,30**	1,91**	40,50***	19,50***	7,40**	21,95**	4,73**	17,15*	4,00**	3,87**
16298	2,27**	15,20***	9,37	1,11***	9,62*	20,30***	13,30*	3,46***	25,20	11,25***	4,89*	18,85	4,84**	10,30**	2,76***	2,08**
40410	2,68**	10,84***	16,20**	0,88**	1,68**	16,20**	16,25*	2,33**	45,65***	6,78*	6,96	14,55**	1,71***	2,82*	1,25***	7,98***
16300	3,26***	23,65	7,90	2,45	2,26**	15,95***	0,26***	1,98*	14,75***	47,70***	13,30	18,05	8,56**	13,00***	5,41***	6,25***
40412	4,86***	28,30**	1,50**	0,56***	1,20**	8,20*	1,63***	5,00***	5,00***	11,90**	7,69*	9,68**	16,30	10,37***	0,64***	2,67*
31024	10,50***	39,55**	4,89**	2,06***	1,57*	12,5***	0,80***	2,32*	14,10***	6,21*	15,55*	21,20**	12,20**	2,03*	1,88***	2,06*
40416	2,89*	33,40**	8,77	1,50***	2,42	0,94	1,69***	3,98**	15,90***	4,77*	7,55***	30,75**	22,55**	50,35**	21,25**	5,08**
31025	1,24***	22,30**	7,12*	3,17***	2,08*	7,14*	1,20***	2,64*	12,45***	3,35	6,34***	25,10*	9,45***	20,20**	1,49***	4,24**
40418	5,98**	38,80***	36,65**	2,15**	2,81	14,3**	0,45***	1,92*	21,10***	1,87**	5,10***	12,05***	10,66**	16,95***	3,81***	9,47***
31039	3,05***	15,55**	20,30**	2,26***	2,01	9,53***	2,43***	5,18**	42,50**	2,28*	16,25*	11,80**	9,03***	32,50***	4,17***	6,57***
40422	8,74*	15,50**	4,60*	0,90***	3,25*	7,43**	1,34***	3,83**	29,70***	18,80***	23,35**	16,35**	7,91***	3,64	3,35***	9,70***
40428	6,13*	30,95**	4,31**	0,49***	1,64*	17,4***	22,60***	5,63***	10,45*	8,84*	6,82**	14,40**	10,80***	8,99**	1,60***	7,28***
40430	16,55	22,85	3,33**	0,65***	3,21	13,35***	21,00**	7,98**	43,65*	19,10***	11,32	13,95	3,23***	48,40**	1,31***	5,52*
37780	13,05**	20,80*	26,90***	1,07**	0,78*	17,7***	3,11***	11,8***	57,50*	4,97	2,86**	18,30*	3,91***	16,20***	13,05***	2,05
40432	6,30**	21,80	2,43**	0,94***	9,53***	32,6**	0,79***	2,26**	41,00***	2,48*	16,30**	16,35	11,95***	13,55**	6,36***	11,40***
37765	7,73*	15,50**	7,22*	1,92**	1,10**	7,98***	1,32***	2,29***	48,60***	2,28*	7,42***	42,50**	2,35***	15,45**	9,32***	2,29
40436	14,30*	13,70**	22,25*	0,74***	2,21	18,40***	0,51***	1,03***	21,20***	4,61	28,50***	6,78**	9,42**	0,23**	4,65***	5,07**
37767	4,88**	30,95*	14,95**	2,30***	0,76***	5,98*	0,71***	1,82*	22,80***	8,19**	15,50*	19,95*	6,64***	7,50**	64,10**	23,10***
9111	4,99***	25,75*	10,36*	6,24	1,16*	6,70***	0,37***	1,12***	25,50***	6,28*	7,47***	20,40*	14,10***	17,45**	13,50***	26,40***
40440	7,74**	32,20***	8,95	2,51***	1,79	20,70**	0,45***	0,53***	33,40***	2,24*	9,61**	7,53***	14,10***	4,26	13,70**	5,40**
38373	8,80	29,60**	2,83**	4,82*	1,11***	30,05***	16,10***	2,52	24,60***	3,15	8,25**	18,30**	17,30***	50,70**	4,48**	4,82*
40448	23,50**	19,30***	15,80**	1,66***	3,44**	24,4***	0,31***	1,30***	29,35	4,72	14,95**	18,40***	24,80**	34,20***	13,30***	10,54*
30987	7,05*	10,25***	4,09**	1,33***	0,83***	2,15*	22,15**	6,78**	23,20***	4,00	7,26*	4,39	6,05***	32,45**	8,33**	6,75***
40450	4,67*	41,10***	11,90	3,74***	2,56	1,05	2,96***	0,83***	19,60***	17,50***	8,36**	22,95***	27,30***	17,05*	5,02***	7,97***

**Tabla 4. Resultados de necrosis y apoptosis en neutrófilos humanos.** Se presenta para cada donante el porcentaje de necrosis y apoptosis obtenido en el control de infección y los porcentajes relacionados con cada anticuerpo utilizado. En azul se presentan los resultados en los que hubo una disminución del porcentaje de necrosis frente al control y en rojo en los que se generó un aumento en el porcentaje de apoptosis en comparación al control de infección. Las gráficas que comprenden a cada donante con los datos y valores específicos se relacionan en la sección de anexos (figura 2 - anexos). Los resultados de la prueba *t-Student*, están representados por los asteriscos en cada resultado \* $\leq 0.05$ , \*\* $\leq 0.01$  y \*\*\* $\leq 0.001$ .

Con base en los resultados obtenidos, es posible analizar la capacidad que presentan los anticuerpos IgG que reconocen péptidos nativos y modificados, para regular los fenómenos de apoptosis y necrosis, de forma positiva y negativa respectivamente. En cuanto a la muerte celular por apoptosis, se presentaron 5 variables diferentes relacionadas con el incremento de su porcentaje en neutrófilos, para las cuales el 14,7% de los anticuerpos estudiados (Ac 40400, Ac 11024, Ac

40412, Ac 40428 y Ac 37767), aumentaron la apoptosis en 7 de 8 donantes; el 38,2% de los anticuerpos (Ac 16951, Ac 37964, Ac 37096, Ac 40402, Ac 40404, Ac 16295, Ac 40408, Ac 16300, Ac 40416, Ac 40418, Ac 40430, Ac 9111 y Ac 38373) en 6 de 8 donantes; el 38,2% de los anticuerpos (Ac 40396, Ac 11073, Ac 16298, Ac 40410, Ac 31024, Ac 31025, Ac 31039, Ac 40422, Ac 37780, Ac 40432, Ac 40448, Ac 30987 y Ac 40450) en 5 de 8 donantes; el 5,4% de los anticuerpos (Ac 37765 y Ac 40440) en 4 de 8 donantes; y el 2,94% (Ac 40436) de los anticuerpos en 3 de 8 donantes; mostrando una tendencia en aumento de la muerte celular por apoptosis a expensas de anticuerpos IgG específicos para secuencias peptídicas derivadas de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv.

Con relación a la muerte celular por necrosis, se evidenciaron 7 variables diferentes en cuanto a la disminución de su porcentaje en neutrófilos; en donde el 8,82% de los anticuerpos usados en el estudio (Ac 40400, Ac 40412 y Ac 31025), redujeron la necrosis en 8 de 8 donantes; el 14,7% de los anticuerpos (Ac 16300, Ac 40428, Ac 37765, Ac 30987 y Ac 9111), en 7 de 8 donantes; el 11,76% de los anticuerpos (Ac 40396, Ac 31024, Ac 40418 y Ac 38373) en 6 de 8 donantes; el 50% de los anticuerpos (Ac 16951, Ac 37964, Ac 37096, Ac 11073, Ac 40402, Ac 40404, Ac 40408, Ac 16298, Ac 40410, Ac 40416, Ac 31039, Ac 37780, Ac 40432, Ac 40436, Ac 37767, Ac 40440 y Ac 40450) en 5 de 8 donantes; el 8,82% de los anticuerpos (Ac 16295, Ac 40422 y Ac 40430) en 4 de 8 donantes, el 2,94% de los anticuerpos (Ac 11024) en 3 de 8 donantes; y el 2,94% (Ac 40448) en 2 de 8 donantes; resultados que indican una regulación negativa en el proceso de muerte por necrosis en neutrófilos humanos tras la interacción de estos con anticuerpos IgG específicos para secuencias peptídicas derivadas de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv.

Finalmente, se destacan los anticuerpos específicos de los péptidos 40400 y 40412 quienes representan el 5,88% de los anticuerpos utilizados; por su capacidad para de forma simultánea incrementar la apoptosis y la necrosis en las poblaciones celulares en el 87,5% de los donantes.

## 8. DISCUSIÓN

El estudio de la respuesta inmune humoral y celular en la TB sigue siendo un tema actual de relevancia que busca ofrecer manejo para el control y resolución de la patología. En principio, los macrófagos han sido la población con mayor importancia en la investigación de la inmunopatología de la TB; sin embargo, el papel de diferentes componentes del sistema inmune como neutrófilos y anticuerpos no está ampliamente descrito, aún cuando se ha visto que hacen parte de la respuesta inmune frente a la infección por Mtb.

Respecto a la respuesta por anticuerpos se ha observado que estos pueden presentar distintos perfiles efectoros, lo cual podría ayudar a modular la patogénesis desarrollada por Mtb (83); dichos perfiles efectoros se relacionan con la capacidad de las inmunoglobulinas para prevenir la unión del microorganismo a la célula hospedera a razón de su interacción con los receptores presentes en la célula, la neutralización del microorganismo previa a la unión evitando el contacto con las células hospedera, la inducción de poros en las membranas del patógeno desencadenando la muerte celular, la interrupción del metabolismo microbiano y la neutralización intracelular lo que puede afectar el desarrollo del ciclo de vida infeccioso (84).

Considerando las funciones descritas para las inmunoglobulinas frente a la infección por Mtb, se evaluó cuál podría ser la posible función efectora *in vitro* de anticuerpos IgG específicos de secuencias peptídicas nativas y modificadas derivadas de proteínas presentes en la envoltura de Mtb, que podrían considerarse como candidatas a formar parte de una vacuna antituberculosa; teniendo en cuenta que los anticuerpos IgG muestran una presencia predominante durante un proceso inflamatorio como en la fase aguda de la tuberculosis pulmonar según Zimmermann N, *et al.* (85).

En primer lugar, fue necesario seleccionar las secuencias peptídicas que serían el punto de partida para el desarrollo del presente estudio; con este fin, se tuvo en

cuenta sus características como HABPS y también su capacidad para inhibir la entrada de la micobacteria a células diana, características encontradas en los péptidos nativos, no obstante se desconocía si los péptidos modificados a partir de ellos, también poseen dicha capacidad. Por lo tanto, se procedió a evaluar in vitro la inhibición de la entrada de Mtb a células hospederas por parte de las secuencias modificadas.

A partir de ensayos preliminares con péptidos nativos a diferentes concentraciones, se observó que el 95,8 % de dichos péptidos inhiben la entrada de Mtb a macrófagos U937 (figura 1 - anexos); teniendo en cuenta estos resultados, se realizaron ensayos de inhibición con péptidos modificados esperando resultados similares a los obtenidos para las secuencias nativas homólogas, observándose que efectivamente el 75% de los péptidos modificados inhiben la entrada de la micobacteria a las células diana (figura 6) de igual manera a los resultados mostrados por Ocampo M, *et al.* (86), evidenciando así la importancia incluir dichos péptidos en el desarrollo de los ensayos posteriores; la inhibición presentada por los péptidos podría estar relacionada a la capacidad que tienen para ocupar el sitio de interacción de la micobacteria con la célula diana evitando así su ingreso, lo cual sugiere que dichos péptidos posiblemente forman parte de estructuras importantes en la micobacteria que intervienen en el proceso de infección; por lo cual es importante obtener anticuerpos específicos de dichas secuencias y evaluar su posible función efectora en células infectadas.

Posterior a los ensayos de inhibición, se realizó el análisis *in silico* de las secuencias peptídicas nativas y modificadas para identificar la presencia de epitopes B, los cuales pudieran ser reconocidos por inmunoglobulinas estableciendo el punto de partida para el aislamiento de anticuerpos específicos de cada secuencia a partir de sueros de donantes. Los resultados presentados en la tabla 3, muestran la presencia de epítopes B en los péptidos tanto nativos como modificados, en los cuales se conservó este determinante antigénico aún cuando sus secuencias fueron modificadas tal como lo presentó Alfonso P. (87) para el 2019 en péptidos nativos, lo cual hacía factible que a partir de los péptidos seleccionados fuera posible obtener de anticuerpos péptido-específicos. Una vez relacionados los resultados mencionados; se excluyeron los péptidos modificados que no inhibieron la entrada

de la micobacteria y por consiguiente su homólogo nativo. Respecto al análisis de los ensayos se piensa que la falta de inhibición se debió a cambios estructurales significativos en las secuencias aminoacídicas, al analizar las secuencias se observó que donde se modificaban más de 5 aminoácidos con respecto a las secuencias de los péptidos nativos ya no se producía inhibición.

Teniendo en cuenta que Alfonso P. demuestra la presencia de inmunoglobulinas G en el suero de pacientes que no han estado en contacto con *Mtb*, las cuales son capaces de reconocer algunas secuencias peptídicas derivadas de la envoltura de *Mtb* H37Rv (87), se quiso evidenciar el reconocimiento de los epítopes B por parte de las inmunoglobulinas presentes en el suero de los 8 donantes seleccionados en el presente estudio, empleando la técnica de ELISA. Los resultados obtenidos dan cuenta de los resultados presentados por Alfonso P. (87) en el año 2019, observando la presencia de inmunoglobulinas capaces de reconocer las secuencias 34 peptídicas estudiadas (figura 7); de acuerdo a dicho resultado, se procedió a aislar los anticuerpos péptido-específicos para determinar su función en relación al el ingreso de *Mtb* a los macrófagos U937 como sucedía en los ensayos de inhibición presentados con los péptidos anteriormente descritos.

Seguido al aislamiento por cromatografía de afinidad, fue posible comprobar a través de la metodología de Dot Blot que la funcionalidad de los anticuerpos se conservaba, al evidenciarse el reconocimiento de las IgGs dirigidas a los péptidos nativos y modificados (figura 8 y 9), mostrando que los anticuerpos específicos de péptidos nativos reconocieron su secuencia peptídica así como al lisado de *Mtb* H37Rv y que así mismo, los anticuerpos específicos de péptidos modificados reconocieron el lisado de *Mtb* H37Rv, su respectivo péptido modificado y además su homólogo nativo; es por tanto que, es posible establecer que esta técnica de aislamiento, es un procedimiento que permite conservar las características propias de los anticuerpos tras ser aislados, con el fin de ser empleados en el estudio de sus funciones efectivas para el presente trabajo tal como lo demostraba Alfonso P. (87).

Después de determinar la capacidad de reconocer antígenos de las IgGs péptido-específicas purificadas, se hizo un primer acercamiento a la evaluación de

su función efectora al analizarse en ensayos de inhibición de la entrada de Mtb a células diana, mostrando que un 79,41% de dichas inmunoglobulinas inhiben la entrada de la micobacteria (figura 10); adicionalmente, los anticuerpos específicos de péptidos nativos presentan mayor porcentaje de inhibición en comparación a los anticuerpos específicos de péptidos modificados, resultado significativo que podría estar asociado a los cambios estructurales que se generan en los péptidos modificados; no obstante, se observa que un gran porcentaje de anticuerpos específicos de péptidos modificados inhiben la entrada de la micobacteria. Por otra parte, aunque en este trabajo se planteó evaluar la capacidad de inhibir la entrada del patógeno a las células hospederas mediada por anticuerpos, también se ha descrito que la fagocitosis de microorganismos mediada por IgGs, puede eliminar más eficientemente la micobacteria al interior de la célula infectada, lo cual se debería probar en futuros trabajos (83).

Es importante mencionar que la patogenicidad de los microorganismos depende de su interacción con receptores específicos en las células diana para permitir su ingreso y llevar a cabo su ciclo de vida en el espacio intracelular como en el caso de Mtb; por lo tanto, evitar el proceso de interacción patógeno - receptor es clave para la protección del hospedero lo que impide el desarrollo de una patología más grave, haciendo que el microorganismo quede expuesto a procesos de inmovilización, paralización y desestabilización reduciendo su capacidad infecciosa al evitar su contacto con los receptores celulares que dan inicio a su ciclo de vida (84).

Adicionalmente, en relación a la respuesta inmune humoral en TB, Lu et al., en el 2016 (83) establecieron que células con receptores Fc abundan en los granulomas de donantes con TB, lo cual sugiere que anticuerpos presentes en el sitio de infección podrían desempeñar un papel importante durante la respuesta antimicrobiana al ser reconocidos por las células allí presentes, ya que se ha observado que los anticuerpos pueden mejorar el control de Mtb por parte de los macrófagos humanos al generar una mayor fusión fagolisosomal, la activación del inflammasoma y consecuentemente una menor carga bacteriana in vitro (83, 88); además, Eklund *et al.* (89) y Carlsson *et al.* (90), han demostrado que la activación del inflammasoma está relacionada con el control bacteriano (89, 90).

Se ha demostrado que las inmunoglobulinas en la tuberculosis pueden desempeñar funciones efectoras neutralizantes u opsonizantes que contribuyen a la resolución de la patología. Por su parte, la función neutralizante se ha atribuido a inmunoglobulinas A que reconocen estructuras antigénicas como el LAM y HBHA mientras que, la función opsonizante que está relacionada con control intracelular de la micobacteria, se ha descrito en inmunoglobulinas G que reconocen estructuras antigénicas de la micobacteria; sin embargo las IgG que reconocen LAM y HBHA por su parte, no confieren ningún tipo de protección facilitando incluso la infección de las células diana (83, 85). Zimmerman N, et al y Lenette L, et al (83, 85) han realizado investigaciones que en la evaluación efectora de los anticuerpos, las cuales ofrecen un acercamiento al papel que podrían desempeñar estas estructuras en el desarrollo de la patología; sin embargo, es importante aclarar que los resultados generados tras dichos ensayos, se han enfocado en estructuras antigénicas de origen no peptídico presentes en la micobacteria, por lo cual se evidencia la relevancia de evaluar la función efectora de anticuerpos que reconocen estructuras antigénicas peptídicas como en el presente proyecto con el fin de aportar información significativa a este tema poco abordado.

De acuerdo con lo mencionado y teniendo en cuenta los resultados del presente proyecto, se observa la inhibición de la entrada de Mtb a macrófagos tras la pre incubación del patógeno con anticuerpos IgG péptido-específicos (figura 10), destacando la importancia que tendrían los péptidos estudiados al formar parte de un modelo de vacuna antituberculosa, los cuales permitirían la obtención de anticuerpos péptido-específicos quienes contribuirían posiblemente al control y resolución de la patología; adicionalmente, los resultados presentados aportan nueva información en la evaluación de la función efectora de anticuerpos en la TB, mostrando que IgGs específicas de péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de la micobacteria, cuentan con actividad neutralizante frente a Mtb lo cual permitiría un mayor control de la infección y el desarrollo de la patología.

Ahora bien, se sabe que en la infección por Mtb los neutrófilos juegan un papel fundamental siendo parte de las células de la inmunidad innata como primera respuesta a la infección; la micobacteria es capaz de inducir necrosis en los neutrófilos como mecanismo de evasión de la respuesta inmune a expensas de la

producción de ROS extracelular; además de esto, la liberación de los componentes internalizados de los neutrófilos al exterior, y la acumulación de esta población necrótica en el tejido desencadena una serie de reacciones desfavorables que conducen a una inflamación crónica en la zona afectada siendo en la mayoría de los casos la fuente de los síntomas y la gravedad de la infección (72, 91).

La interacción directa sin mediadores entre Mtb y los neutrófilos es por tanto, poco beneficiosa durante el transcurso de la infección, en la tabla 4 se evidencia este fenómeno donde los controles de neutrófilos infectados con Mtb sin ningún tipo de tratamiento presentaron un mayor porcentaje de necrosis que apoptosis para la mayoría de los donantes tal como ha sido descrito por Hilda J, et al. y Dallenga T, et al (72, 91). Es muy poco lo que se describe en la literatura sobre el papel de los neutrófilos y su muerte celular en el desarrollo de la TB; sin embargo, la apoptosis de neutrófilos, establece un mejor panorama durante el control y la resolución de la patología, ya que minimiza la afectación de los tejidos a expensas de la liberación de componentes celulares al exterior como sucede en la necrosis y además, puede llegar a propiciar la esferocitosis a través del cual los macrófagos son capaces de fagocitar cuerpos apoptóticos de neutrófilos infectados contribuyendo a la presentación antigénica, al control de la micobacteria intracelular en macrófagos infectados y así al control de la enfermedad (37, 39, 91).

Alfonso P (87) para el año 2019 demostró la capacidad que tenían anticuerpos péptido-específicos para inducir apoptosis en neutrófilos a partir de un análisis microscópico de esta población tras entrar en contacto con Mtb H37Rv pre incubada con anticuerpos; de acuerdo con esto, se tomaron sus resultados como punto de partida para el presente proyecto, ampliando el rango de anticuerpos péptido-específicos a evaluar así como de la cantidad donantes incluidos en el proceso, y además implementando la citometría de flujo para el análisis con el fin de aumentar la sensibilidad en el estudio. Los anticuerpos previamente evaluados con macrófagos, se emplearon para el análisis de su función efectora a nivel de los neutrófilos con relación a la muerte celular que podría desencadenarse en esta población celular tras la interacción con la Fc de las inmunoglobulinas G purificadas las cuales se encontraban en contacto con la micobacteria; los resultados obtenidos en este análisis determinaron que el 52,9% de los anticuerpos péptido-específicos

incluidos en este estudio, incrementan el porcentaje de apoptosis en un 75% de la población; adicionalmente, se observó que el 35,28% de los anticuerpos disminuyen el porcentaje de necrosis en el 75% de los donantes, y que los anticuerpos específicos de los péptidos 40400 y 40412 disminuyen significativamente el porcentaje de necrosis en el 100% de los donantes y simultáneamente, aumentan el porcentaje de apoptosis en el 87,5% de la población, sin presentarse predominio alguno entre los resultados relacionados con las secuencias peptídicas nativas o modificadas.

Estos resultados complementan los resultados presentados por Alfonso P en el 2019 (87), demostrando la capacidad *in vitro* de anticuerpos péptido-específicos que reconocen péptidos nativos y modificados, para inducir apoptosis en neutrófilos y además reducir el porcentaje de necrosis que se obtiene en un proceso de infección normal, siendo este último dato, un nuevo acercamiento a la descripción de la función efectora de los anticuerpos en poblaciones celulares que hacen parte de la respuesta inmune contra Mtb.

Teniendo en cuenta que, el reconocimiento de la fracción Fc de anticuerpos IgG que están presentes en inmunocomplejos insolubles puede desencadenar en neutrófilos un proceso apoptótico, es importante identificar anticuerpos específicos contra Mtb que durante la infección generen inmunocomplejos insolubles, promoviendo así la apoptosis de neutrófilos a expensas de la vía de señalización intracelular PI3K $\beta$ / $\delta$ -Cdc42-Pak-Mek-Erk (9, 10, 73, 75); dicha reacción se genera en los neutrófilos de los donantes estudiados como se muestra en la tabla 4, en los que se observa la capacidad de los anticuerpos utilizados en el presente estudio para inducir la apoptosis en esta población celular.

Se ha visto que la misma fracción Fc de anticuerpos IgG que induce apoptosis en neutrófilos como ya se mencionó, presenta también diferentes características a nivel estructural en cuanto a las cadenas pesadas de la región constante y las estructuras encargadas de establecer la unión entre la Fc y la región variable de la inmunoglobulina, describiendo 4 subclases de IgG además de los procesos de glicosilación que atraviesa dicha fracción, afectando significativamente el reconocimiento de dichos anticuerpos por parte de los receptores presentes en cada

célula del sistema inmune y por lo tanto, la función efectora que puedan desencadenar los anticuerpos en cada individuo (92, 93), lo que podría explicar la variación de los resultados obtenidos en los neutrófilos de cada donante.

En consecuencia, de acuerdo con los resultados observados a lo largo del presente trabajo, se destacan los péptidos 31025, 9111 y 40400 y los anticuerpos específicos de dichas secuencias, por su capacidad de inhibir la entrada de la micobacteria y además reducir el porcentaje de necrosis en neutrófilos que se genera en condiciones normales de infección y aumentar el porcentaje de apoptosis en la mayoría de la población estudiada. Resultados que aportan información acerca de la importancia que podrían tener los péptidos mencionados para formar parte de una vacuna contra la TB, con posibilidad de conferir al hospedero una respuesta protectora a través de la inmunidad humoral frente a *Mtb*, que genere un mejor panorama contra el desarrollo de la infección.

## **9. CONCLUSIONES**

Inmunoglobulinas de tipo G dirigidas contra secuencias peptídicas presentan función efectora neutralizante frente a *Mtb* en macrófagos U937.

IgGs péptido específicas son capaces de promover la apoptosis y disminuir la necrosis en neutrófilos infectados, lo cual podría establecer un mejor panorama durante la infección.

Los anticuerpos dirigidos contra los péptidos 16951, 11073, 40410, 40416 y 9111 presentan los mayores porcentajes de inhibición de la entrada de la micobacteria a macrófagos U937.

Se destacan los péptidos 9111, 11073 y 40400 que además de inhibir la entrada de la *Mtb* a macrófagos, disminuye la necrosis y aumentan la apoptosis en neutrófilos, cumpliendo con las características evaluadas en el presente estudio que podrían conferir protección frente a *Mtb*.

## **10. RECOMENDACIONES**

Incrementar el número de individuos reclutados con el fin de determinar el comportamiento de los anticuerpos como se evaluó en el presente estudio, para fortalecer estadísticamente los resultados encontrados.

Se sugiere utilizar macrófagos derivados de PBMCs en ensayos de inhibición de la entrada de *Mtb* a macrófagos U937, mediado por péptidos e inmunoglobulinas IgG que reconocen péptidos nativos y modificados, con el propósito de evidenciar el comportamiento de los anticuerpos con células de línea primaria y ver si éste varía.

Determinar las subclases de IgG que se presentan tras la purificación de inmunoglobulinas utilizadas en el ensayo, ya que se conoce que interfieren en la función efectora que puede desencadenar un anticuerpo en una población celular; además aportaría información para relacionar sí realmente la subclase de IgG influyó en la variabilidad de los resultados obtenidos.

Se recomienda estudiar la fracción Fc de los anticuerpos empleados en el estudio, con el fin de establecer la variabilidad en las glicosilaciones, dado que en anteriores reportes se ha logrado demostrar que el patrón de las mismas puede afectar las funciones efectoras de las inmunoglobulinas, que a su vez pudieron influenciar los resultados obtenidos.

Evaluar la vía apoptótica que se desencadena en los neutrófilos tras la exposición a la micobacteria pre-opsonizada relacionada con las caspasas implícitas en el proceso, así como la vía no canónica PI3K $\beta$ / $\delta$ -Cdc42-Pak-Mek-Erk.

## 11. REFERENCIAS

- (1) Arévalo M. Informe Tuberculosis Primer Semestre Año 2020. Secretaría de Salud [Internet]. 2020 [citado 21 abril 2021]; 1 - 12
- (2) MinSalud. Informe de Evento Tuberculosis. 2021.
- (3) WHO. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. WHO [Internet]. 2013 [cited 21 April 2021]. 979; 1- 50
- (4) Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Araujo Z. Respuesta de inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar: Revisión. Invest. clín [Internet]. 2005 [citado 21 Abril 2021]; 46( 4 ): 391-412
- (5) Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Fernández de Larrea C, Rivas-Santiago B. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. Revisión. Invest clín [Internet]. 2008 [citado 21 Abril 2021]; 49 (3): 411-441.
- (6) García-Sancho C. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. Rev Inst Nal Enf Resp Mex [Internet]. 2001 [citado 21 Abril 2021]; 14 (2): 114-128.
- (7) Liu C, Liu H, Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. Cellular & Molecular Immunology [Internet]. 2017 [cited 21 April 2021]; 14 (12): 963-975.
- (8) Lyadova I. Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way?. Mediators of Inflammation [Internet]. 2017 [cited 21 April 2021]; 2017: 1-11
- (9) Yam J, García L, Sánchez L. Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular. Gaceta Med de Mex [Internet]. 2012 [citado 21 Abril 2021]; 148 (1): 68-75
- (10) Geering B, Simon H. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. Cell Death & Differentiation [Internet]. 2011 [cited 21 April 2021];18(9):1457-1469.
- (11) Rijnink W, Ottenhoff T, Joosten S. B-Cells and Antibodies as Contributors to Effector Immune Responses in Tuberculosis. Frontiers in Immunology [Internet]. 2021 [cited 21 April 2021];12.
- (12) Garcia J, Puentes A, Rodriguez L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2536 protein implicated in specific binding to human cell lines. Protein Sci. 2005; 14: 2236-45.
- (13) Forero M, Puentes A, Cortes J, et al. Identifying putative *Mycobacterium tuberculosis* Rv2004c protein sequences that bind specifically to U937 macrophages and A549 epithelial cells. Protein Sci. 2005; 14: 2767-80.
- (14) Vera-Bravo R, Torres E, Valbuena JJ, et al. Characterising *Mycobacterium tuberculosis* Rv1510c protein and determining its sequences that specifically bind to two target cell lines Biochem Biophys Res Commun. 2005; 332: 771-81.
- (15) Patarroyo MA, Curtidor H, Plaza DF, et al. Peptides derived from the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1490 surface protein implicated in inhibition of epithelial cell entry: potential vaccine candidates? Vaccine. 2008; 26: 4387-95.
- (16) Plaza DF, Curtidor H, Patarroyo MA, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* membrane protein Rv2560--biochemical and functional studies. FEBS J. 2007; 274: 6352-64.
- (17) Patarroyo MA, Plaza DF, Ocampo M, et al. Functional characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv2969c membrane protein. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 372: 935-40.

- (18) Cifuentes DP, Ocampo M, Curtidor H, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0679c protein sequences involved in host-cell infection: potential TB vaccine candidate antigen. BMC Microbiol. 2010; 10: 109.
- (19) Caceres SM, Ocampo M, Arevalo-Pinzon G, Jimenez RA, Patarroyo ME and Patarroyo MA. The *Mycobacterium tuberculosis* membrane protein Rv0180c: Evaluation of peptide sequences implicated in mycobacterial invasion of two human cell lines. Peptides. 2011; 32: 1-10.
- (20) Ocampo M, Aristizábal-Ramírez D, Rodríguez DM, et al. The role of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3166c protein-derived high-activity binding peptides in inhibiting invasion of human cell lines. Protein Engineering, Design and Selection. 2012; 25: 235-42.
- (21) Ocampo M, Rodriguez DM, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo MA and Patarroyo ME. Peptides derived from *Mycobacterium tuberculosis* Rv2301 protein are involved in invasion to human epithelial cells and macrophages. Amino Acids. 2012; 42: 2067-77.
- (22) Ocampo M, Rodriguez DC, Rodriguez J, et al. Rv1268c protein peptide inhibiting *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv entry to target cells. Bioorg Med Chem. 2013; 21: 6650-6.
- (23) Rodriguez DC, Ocampo M, Varela Y, Curtidor H, Patarroyo MA and Patarroyo ME. Mce4F *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides can inhibit invasion of human cell lines. Pathog Dis. 2015; 73.
- (24) Rodríguez DM, Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo ME and Patarroyo MA. *Mycobacterium tuberculosis* surface protein Rv0227c contains high activity binding peptides which inhibit cell invasion. Biol Chem. 2012; 38: 208–16.
- (25) Rodriguez DC, Ocampo M, Reyes C, et al. Cell-Peptide Specific Interaction Can Inhibit *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Infection. J Cell Biochem. 2016; 117: 946-58.
- (26) Diaz DP, Ocampo M, Varela Y, Curtidor H, Patarroyo MA and Patarroyo ME. Identifying and characterising PPE7 (Rv0354c) high activity binding peptides and their role in inhibiting cell invasion. Mol Cell Biochem. 2017; 430: 149-60.
- (27) Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo MA and Patarroyo ME. Specific interaction between *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein-derived peptides and target cells inhibits mycobacterial entry in vitro. Chem Biol Drug Des. 2014; 84: 626-41.
- (28) Rodríguez DM, Vizcaíno C, Ocampo M, et al. Peptides from the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1980c protein involved in human cell infection: insights into new synthetic subunit vaccine candidates. Biol Chem. 2010; 391: 207-2017.
- (29) Sanchez-Barinas CD, Ocampo M, Vanegas M, Castaneda-Ramirez JJ, Patarroyo MA and Patarroyo ME. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv LpqG Protein Peptides Can Inhibit Mycobacterial Entry through Specific Interactions. Molecules. 2018; 23.
- (30) Chapeton-Montes JA, Plaza DF, Curtidor H, et al. Characterizing the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2707 protein and determining its sequences which specifically bind to two human cell lines. Protein Sci. 2008; 17: 342–51.
- (31) Carabali-Isajar ML, Ocampo M, Rodriguez DC, et al. Towards designing a synthetic antituberculosis vaccine: The Rv3587c peptide inhibits mycobacterial entry to host cells. Bioorg Med Chem. 2018; 26: 2401-9.

- (32) Curtidor H, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Avances recientes en el desarrollo de una vacuna antipalúdica sintetizada químicamente. *Experto. Opin. Biol. El r.* , 15 ( 11 ) ( 2015 ) , pp. 1,567 mil - 1581.
- (33) Patarroyo ME, Patarroyo MA, Pabon L, Curtidor H, Poloche LA. Estructuras proteicas inductoras de protección inmunitaria (IMPIPS) contra la malaria: las armas necesarias para vencer a Ulises Vacuna, 33 ( 52 ) ( 2015 ) , págs. 7525 – 7537
- (34) Garcia-Rodriguez, K.M., Bini, E.I., Gamboa-Domínguez, A. et al. Differential mast cell numbers and characteristics in human tuberculosis pulmonary lesions. *Sci Rep [Internet]*. 2021 [cited 30 March 2022]; 10687 (11): 1 - 9.
- (35) DHEDA K, SCHWANDER S, ZHU B, van ZYL-SMIT R, ZHANG Y. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology [Internet]*. 2010 [cited 21 April 2021]; 15(3):433-450.
- (36) Dallenga T, Schaible U. Neutrophils in tuberculosis – first line of defense or booster of disease and targets for host directed therapy?. *Pathogens and Disease [Internet]*. 2016 [cited 21 April 2021]; ftw012.
- (37) Tan B, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa M *et al.* Macrophages Acquire Neutrophil Granules for Antimicrobial Activity against Intracellular Pathogens. *The Journal of Immunology [Internet]*. 2006 [cited 21 April 2021]; 177(3): 1864-1871.
- (38) Martineau A, Newton S, Wilkinson K, Kampmann B, Hall B, Nawroly N et al. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *Journal of Clinical Investigation [Internet]*. 2007 [cited 21 April 2021]; 117(7): 1988-1994.
- (39) Andersson A, Larsson M, Stendahl O, Blomgran R. Efferocytosis of Apoptotic Neutrophils Enhances Control of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-Coinfected Macrophages in a Myeloperoxidase-Dependent Manner. *Journal of Innate Immunity [Internet]*. 2019 [cited 21 April 2021];12(3):235-247.
- (40) Perskvist N, Long M, Stendahl O, Zheng L. *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Apoptosis in Human Neutrophils by Activating Caspase-3 and Altering Expression of Bax/Bcl-xL Via an Oxygen-Dependent Pathway. *The Journal of Immunology [Internet]*. 2002 [cited 21 April 2021]; 168 (12): 6358-6365.
- (41) Alemán M, Schierloh P, de la Barrera S, Musella R, Saab M, Baldini M et al. *Mycobacterium tuberculosis* Triggers Apoptosis in Peripheral Neutrophils Involving Toll-Like Receptor 2 and p38 Mitogen Protein Kinase in Tuberculosis Patients. *Infection and Immunity [Internet]*. 2004 [cited 21 April 2021]; 72 (9): 5150-5158.
- (42) Ottonello L, Frumento G, Arduino N, Dapino P, Tortolina G, Dallegri F. Immune complex stimulation of neutrophil apoptosis: investigating the involvement of oxidative and nonoxidative pathways. *Free Radical Biology and Medicine [Internet]*. 2001 [cited 21 April 2021]; 30(2): 161-169.
- (43) Vermeren S, Karmakar U, Rossi A. Immune complex-induced neutrophil functions: A focus on cell death. *European Journal of Clinical Investigation [Internet]*. 2018 [cited 21 April 2021]; 48:e12948.

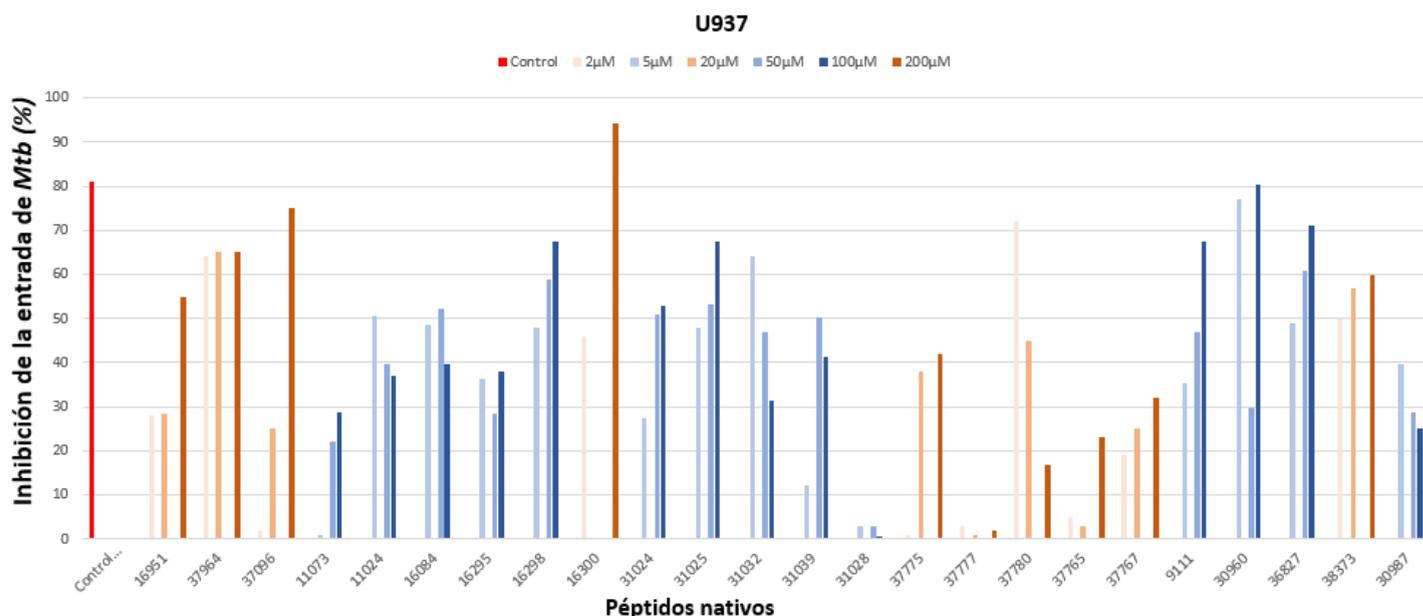
- (44) Cartes J. Breve Historia de la Tuberculosis. Rev Med de Costa Rica y Centroamerica LXX [Internet]. 2021 [cited 23 April 2021]; 605:145 - 150.
- (45) Frieden T, Lerner B, Rutherford B. Lessons from the 1800s: tuberculosis control in the new millennium. The Lancet [Internet]. 2000 [cited 21 April 2021]; 355 (9209): 1088-1092.
- (46) Cabello F. Tuberculosis, 3ra edición. Rev. méd. Chile [Internet]. 2011 [citado 21 Abril 2021]; 139( 5 ): 681-682
- (47) Cummings K. Tuberculosis Control: Challenges of an Ancient and Ongoing Epidemic. Public Health Reports [Internet]. 2007 [cited 21 April 2021];122(5):683-692
- (48) Lozano J, Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. Rev Offarm [Internet]. 2002 [cited 21 April 2021]; 21 (8): 102 – 110
- (49) O'Garra A, Redford P, McNab F, Bloom C, Wilkinson R, Berry M. The Immune Response in Tuberculosis. Annual Review of Immunology [Internet]. 2013 [cited 21 April 2021]; 31 (1): 475-527
- (50) Domínguez Del Valle F. J., Fernández B., Pérez de las Casas M., Marín B., Bermejo C.. Clínica y radiología de la tuberculosis torácica. Anales Sis San Navarra [Internet]. 2007 [citado 21 Abril 2021]; 30( Suppl 2 ): 33-48.
- (51) Calvo J, Bernal M. Tuberculosis. Diagnóstico y tratamiento. Neumosur [Internet]. [cited 21 April 2021]; 43: 487 - 497.
- (52) Pérez J. Patrones inmunopatológicos de la tuberculosis en pacientes con compromiso de la respuesta inmune celular. MedUNAB [Internet], 2006 [citado 21 Abril 2021]: 9(3), 221-229.
- (53) Kumar K, Kon O. Diagnosis and treatment of tuberculosis: latest developments and future priorities. Annals of Research Hospitals [Internet]. 2017 [cited 21 April 2021];1 (37):1-15
- (54) Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten L, Netea M, Van Crevel R. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical and Developmental Immunology [Internet]. 2011 [cited 21 April 2021]; 2011:1-12.
- (55) Kaur D, Guerin M, Škovierová H, Brennan P, Jackson M. Chapter 2 Biogenesis of the Cell Wall and Other Glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. Advances in Applied Microbiology [Internet]. 2009 [cited 21 April 2021]; 23-78.
- (56) Fox K, Kirwan D, Whittington A, Krishnan N, Robertson B, Gilman R et al. Platelets Regulate Pulmonary Inflammation and Tissue Destruction in Tuberculosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine [Internet]. 2018 [cited 21 April 2021]; 198(2): 245-255
- (57) Romero M, Ritacco V, López B, Alemán M. Papel de los  $\alpha$ -glucanos de la cápsula del *Mycobacterium tuberculosis* en la inducción del estallido respiratorio en células del sistema inmune. Academia Nacional de Uruguay [Internet]. 2010 [citado 21 Abril 2021]; 1 – 71
- (58) MA, Klepp LI, Gioffre A, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Virulence. 2013; 4: 3-66.
- (59) Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la tuberculosis. Anales Sis San Navarra [Internet]. 2007 [citado 21 Abril 2021]; 30( Suppl 2 ): 67-85
- (60) Bespiatykh D, Bespiatykh J, Mokrousov I, Shitikov E. A Comprehensive Map of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Regions of Difference. mSphere [Internet]. 2021 [cited 30 March 2022];6(4):e0053521.

- (61) Smith N, Kremer K, Inwald J, Dale J, Driscoll J, Gordon S et al. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Theoretical Biology* [Internet]. 2006 [cited 21 April 2021];239(2):220-22.
- (62) WHO. Global Tuberculosis Report. 2021
- (63) Instituto Nacional de Salud. Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública Tuberculosis Farmacorresistente. MinSalud [Internet]. 2020 [citado 21 Abril 2021]; versión 3: 2 - 31.
- (64) Yang H, Kruh-Garcia N, Dobos K. Purified protein derivatives of tuberculin — past, present, and future. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* [Internet]. 2012 [cited 21 April 2021]; 66(3):273-280.
- (65) CDC | TB | Hojas informativas - Pruebas de tuberculosis [Internet]. Cdc.gov. 2021 [cited 21 April 2021]
- (66) Ruiz-Manzano J, Blanquer R, Luis Calpe J, Caminero J, Caylà J, Domínguez J et al. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. *Archivos de Bronconeumología* [Internet]. 2008 [cited 21 April 2021];44(10):551-566.
- (67) Lu L, Smith M, Yu K, Luedemann C, Suscovich T, Grace P et al. IFN- $\gamma$ -independent immune markers of *Mycobacterium tuberculosis* exposure. *Nature Medicine* [Internet]. 2019 [cited 21 April 2021];25(6):977-987.
- (68) Llaca J, Florez A, Martínez M, Cantú P. La Baciloscopia y el Cultivo en el Diagnóstico de la Tuberculosis Extrapulmonar. *RESPYN* [Internet]. 2003 [citado 21 Abril 2021]; 4(3):1 - 6.
- (69) INCIENSA. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. *Gaceta* [Internet]. 2016 [citado 21 Abril 2021]: 1 - 84.
- (70) Salud O. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis: Normas y Guía Técnica. Parte I Baciloscopia [Internet]. Iris.paho.org. 2021 [citado 21 Abril 2021]
- (71) PAHO. Guía Nacional para el manejo de la Tuberculosis. PAHO [Internet]. 2018 [citado 21 Abril 2021]: 15 edición; 1 - 164.
- (72) Hilda J, Das S, Tripathy S, Hanna L. Role of neutrophils in tuberculosis: A bird's eye view. *Innate Immunity* [Internet]. 2019 [cited 21 April]; 26 (4): 240-247.
- (73) Chu, J. Y., Dransfield, I., Rossi, A. G., & Vermeren, S. Non-canonical PI3K-Cdc42-Pak-Mek-Erk Signaling Promotes Immune-Complex-Induced Apoptosis in Human Neutrophils. *Cell reports* [Internet]. 2016 [cited 30 March 2022]; 17(2), 374–386.
- (74) Vermeren S., Karmakar U., Rossi A. G. Immune complex-induced neutrophil functions: A focus on cell death
- (75) Karmakar, U., Chu, J.Y., Sundaram, K. *et al.* Immune complex-induced apoptosis and concurrent immune complex clearance are anti-inflammatory neutrophil functions. *Cell Death Dis* [Internet]. 2021 [cited 31 March 2022]; 1 - 13.
- (76) PAHO. Fases de desarrollo de una vacuna. [cited 30 March 2022]
- (77) Scanelles S. R., Albert G. J. El citoesqueleto: un componente fundamental en la arquitectura y en la fisiología celular [Internet]. 2016 [cited 21 April 2021]. 35(4):102-114.

- (78) Buccione, R., Orth, J. and McNiven, M.. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [Internet], 2004 [cited 30 March 2022]; 5 (8): pp.647-657.
- (79) BepiRed 2.0 BepiPred-2.0 [Internet]. Cbs.dtu.dk. 2021 [cited 23 April 2021].
- (80) Cytiva. CNBr-activated Sepharose 4B. 2020, p. 3-14.
- (81) Vector laboratories. Kit de sustrato Vector® VIP, peroxidasa (HRP) - (SK-4600). 2020.
- (82) Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97: 77-89
- (83) Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, *et al.* A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell* [Internet]. 2016 [cited 30 March 2022];167(2):433-443.e14.
- (84) Forthall D. Functions of Antibodies. *ASM Journals* [Internet]. 2014 [cited 30 march 2022]; 2(4): 1 - 17.
- (85) Zimmermann N, Thormann V, Hu B, *et al.* Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2016 [cited 23 May 2022]; 8 (11):1325-1339.
- (86) Ocampo M, Patarroyo MA, Vanegas M, Alba MP, Patarroyo ME. Functional, biochemical and 3D studies of *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides for an effective anti-tuberculosis vaccine. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 1 June 2022];40(2):117-45.
- (87) Alfonso P. Apoptosis de neutrófilos mediada por anticuerpos dirigidos contra péptidos derivados de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *UCMC* [Internet]. 2019 [citado 23 Mayo 2022].
- (88) Briken V, Ahlbrand SE and Shah S. *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell inflammasome: a complex relationship. *Front. Cell. Infect. Microbiol* [Internet]. 2013 [cited 30 March 2022]; 3: 62.
- (89) Eklund D., Welin A., Andersson H., Depti V, Söderkvist P., Stendahl O., Särndahl E., Lerm M. Human Gene Variants Linked to Enhanced NLRP3 Activity Limit Intramacrophage Growth of *Mycobacterium tuberculosis* [Internet]. (2014). [cited 30 March 2022]
- (90) Carlsson F., Kim J., Dumitru C., Barck K. H., Carano R. A., Sun M., Diehl L., Brown E. J. Host-Detrimental Rol of Esx-1-Mediated inflammasome Activation in Mycobacterial infection [Internet]. (2010). [cited 30 March 2022]
- (91) Dallenga T., Repnik U., Corleis B., Reimer R., Griffiths G. W., Schaible U. E. *M. tuberculosis*-Induced Necrosis of infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages [Internet]. (2017). [cited 30 March 2022]. V22,ISSUE4, P519-530.E3.
- (92) Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* [Internet]. 2014 [cited 30 march 2022]; 5:520.
- (93) Pincetic A., Bournazos S., DiLillo D., Maamary J., Wang T., Dahan R *et al.* Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2014 [cited 30 march 2022];15(8):707-16.

## 12. ANEXOS

**Figura 1 - Anexos. Inhibición de la entrada de *Mtb* H37Rv a macrófagos U937 mediada por péptidos nativos**



**Figura 2 - Anexos. Resultados de necrosis y apoptosis en neutrófilos humanos. A. Donante 1; B. Donante 2; C. Donante 3; D. Donante 4; E. Donante 5; F. Donante 6; G. Donante 7; H. Donante 8.**

