



ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOMODULADOR DE ANTÍGENOS PEPTÍDICOS PROVENIENTES DE *Mycobacterium tuberculosis* COMO HERRAMIENTA EN LA BÚSQUEDA DE UNA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS

Claudia Marcela Gamboa Hernández

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá, Mayo 2021



ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOMODULADOR DE ANTÍGENOS PEPTÍDICOS PROVENIENTES DE *Mycobacterium tuberculosis* COMO HERRAMIENTA EN LA BÚSQUEDA DE UNA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS

Christian David Sánchez Barinas, Msc
Asesor externo - FIDIC
Edith del Carmen Hernández, Msc
Asesora interna - UCMC

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá, Mayo 2021

CONTENIDO

1. Introducción
2. Antecedentes
3. Objetivos
4. Metodología y resultados
5. Conclusiones

TUBERCULOSIS

Orden:
Actinomycetales

Familia:
Mycobacteriaceae

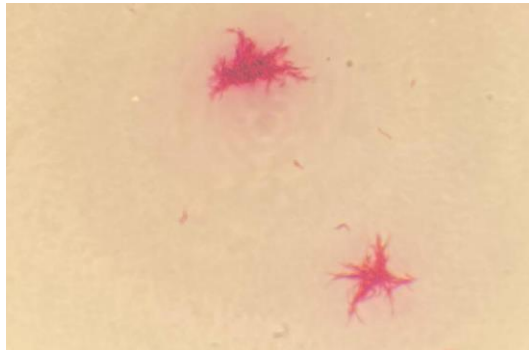
M. tuberculosis
M. canetti
M. africanum
M. bovis
M. microtti
M. caprae
M. pinnipedii
M. mungi
M. orygis

Aerobios

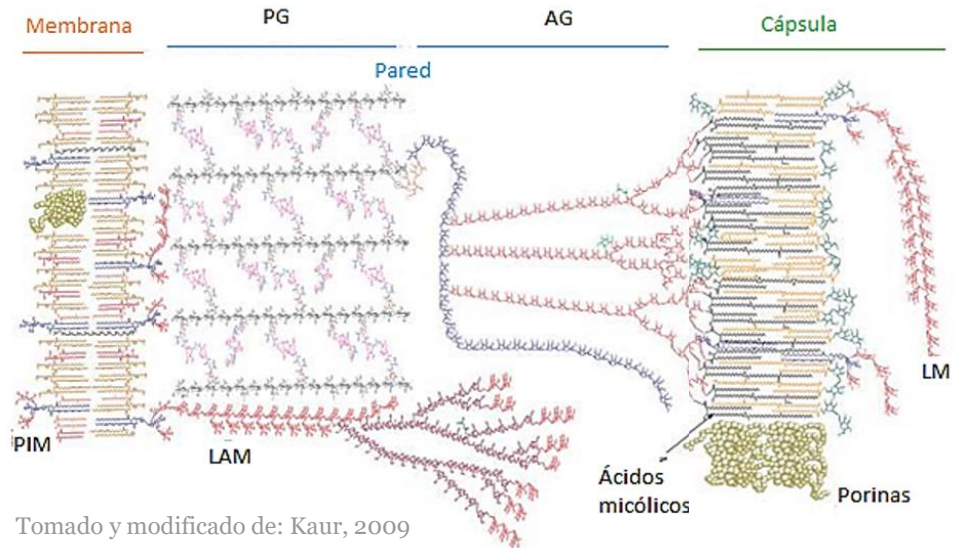
Inmóviles

No esporulados

BAAR



- Coinfección VIH
- TB-MDR
- TB-XDR
- Inmunosupresión



Tomado y modificado de: Kaur, 2009

TUBERCULOSIS

LATENCIA

1/3 de la población

OMS

10 M casos

1.4 M muertes

OPS

22.900 muertes

289.000 casos

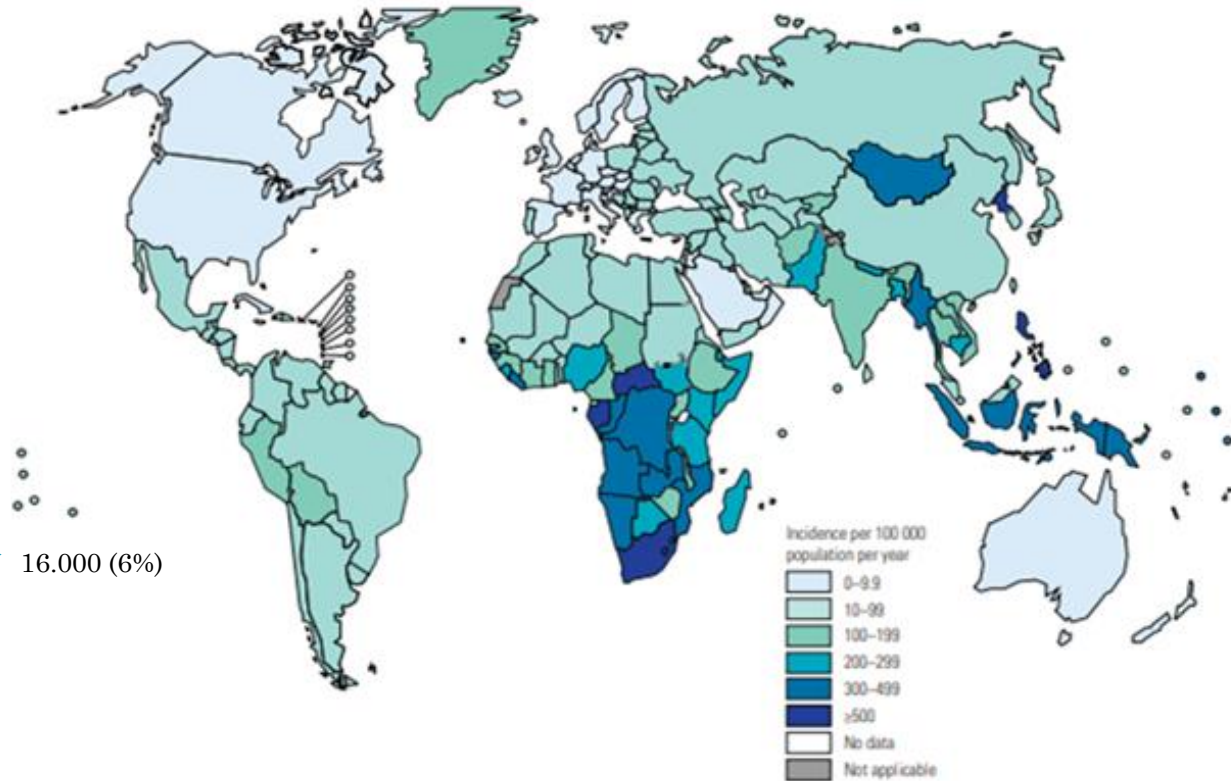
→ 16.000 (6%)

INS / SIVIGILA

Semana 38 - 2020

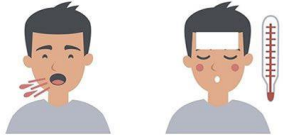
8.182 casos

Incidenia de 14,8



DIAGNÓSTICO DE TB

Criterio clínico



Hemoptisis

Fiebre



Escalofrío



Pérdida de peso



Tos crónica

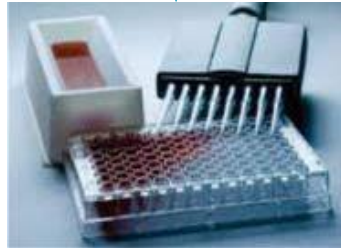


Hiporexia

Criterio inmunológico

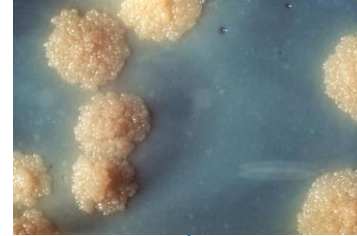


www.lopezcorrea.com/2017/index.php?option=com_content&view=article&id=2030:aplic

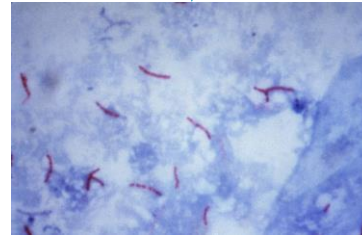


www.medigraphic.com/pdfs/neumo/nt-2015/nt153g.pdf

Criterio microbiológico



es.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis



es.wikipedia.org/wiki/Baciloscopia

Criterio molecular

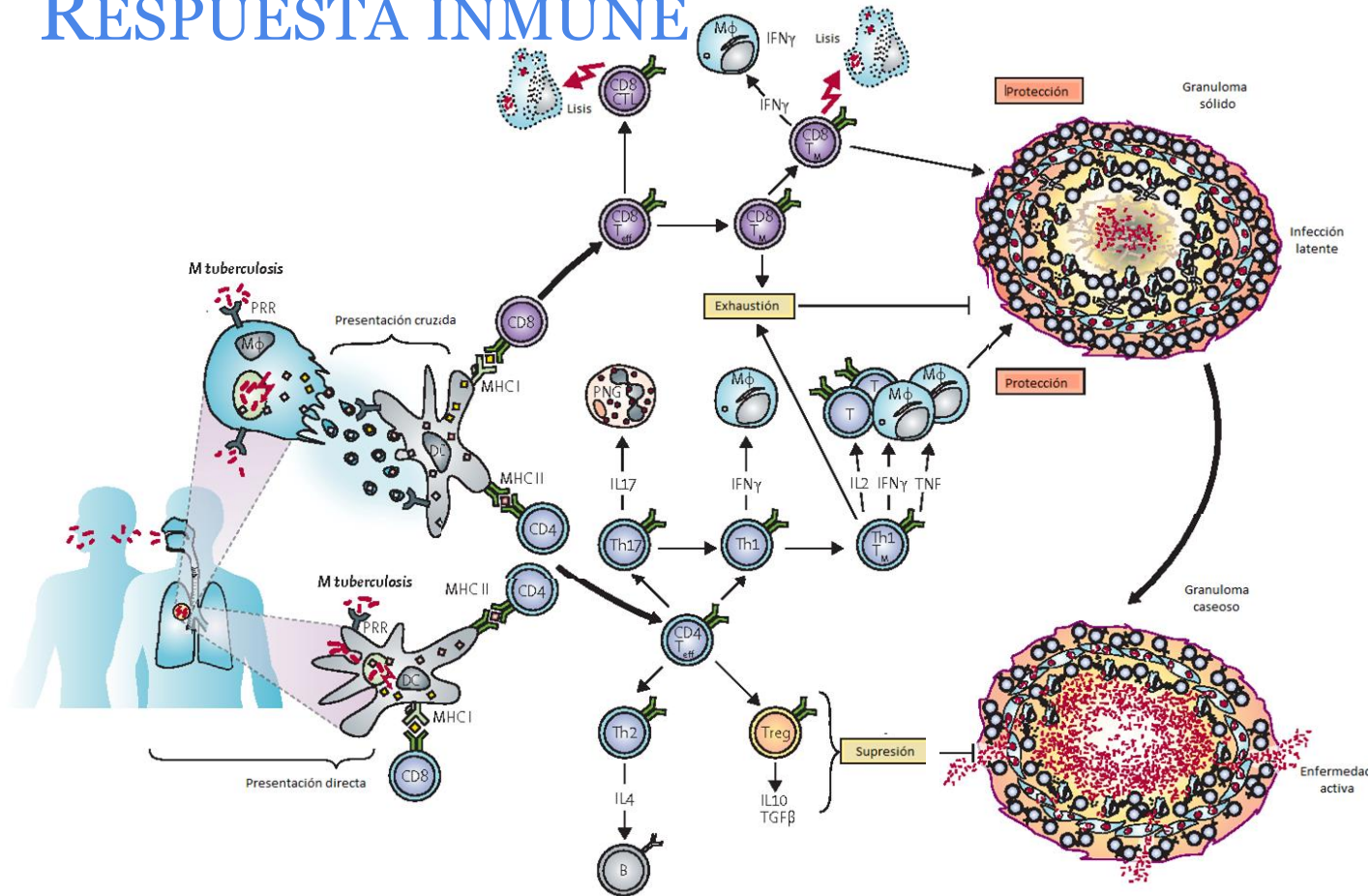


patagoniad.com/2018/03/24/nuevo-equipo-de-biologia-molecular/




rpoB

Especificidad

RESPUESTA INMUNE



Memoria efectora

- T_{SCM} 
- T_{CM} 
- T_{EM} 

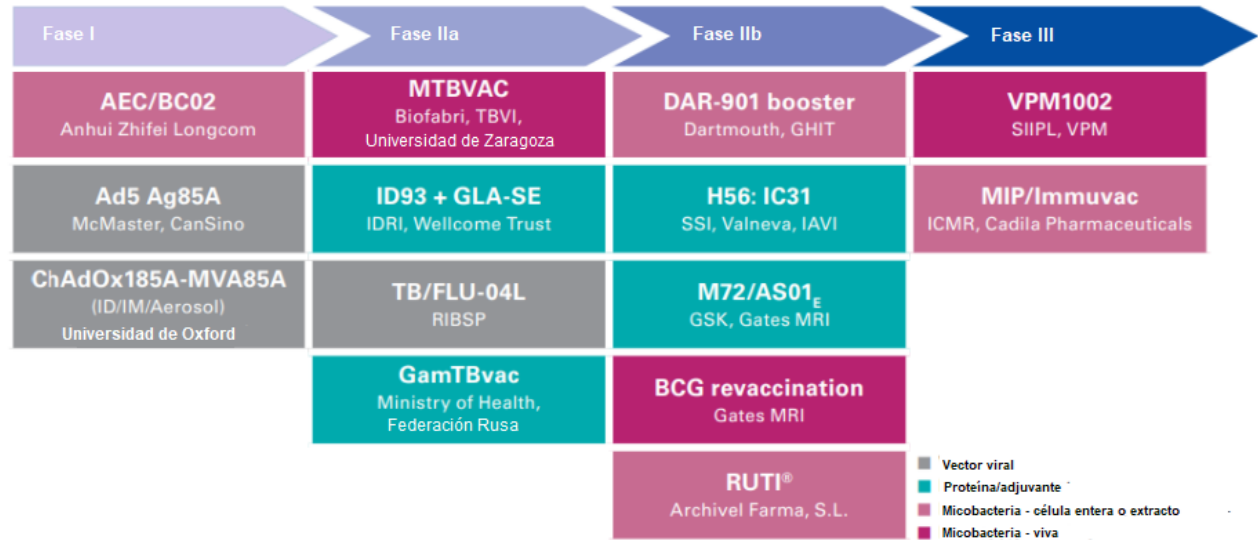
CANDIDATOS VACUNALES



BCG

Protección para la TB pulmonar en adultos tiene una variabilidad en la eficiencia de 0 – 80%

Gupta UD et al. Current status of TB vaccines. Vaccine 2007



WHO. 2020.

ANTECEDENTES



Metodología lógica,
racional y robusta en la
búsqueda de antígenos
peptídicos sintéticos

Ocampo M. 2014

1. Bioinformática

2. Presencia y transcripción

3. Síntesis de péptidos

4. Expresión y localización

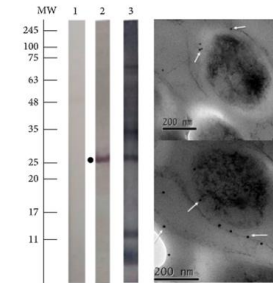
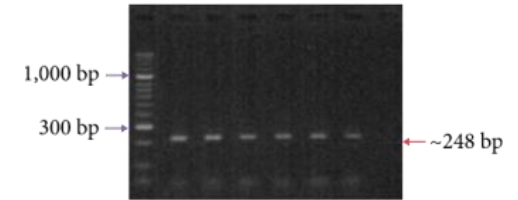
5. Ensayo receptor-ligando

6. Inhibición de entrada

7. Citotoxicidad

8. Antigenicidad

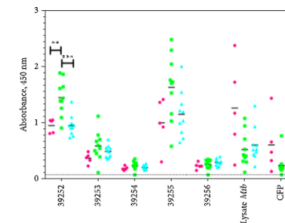
Sánchez-Barinas C. 2019



HABPs

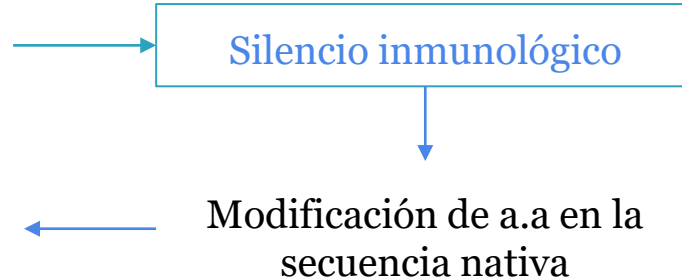
U937 (macrófagos)

A549 (epiteliales alveolares)





Ausencia en el reconocimiento de los péptidos por células del sistema inmune



Mejorar el reconocimiento de los Ag mediante el acople al CMH-II

Patarroyo ME. 2004

¿Cuál es la proliferación de PBMCs estimulados con péptidos sintéticos derivados de proteínas de superficie de *Mycobacterium tuberculosis*?

OBJETIVOS

Determinar a través de ensayos de linfoproliferación la respuesta inmune celular generada por péptidos sintéticos provenientes de *Mtb* en PBMCs.

- Identificar *in silico* las secuencias presentes en péptidos provenientes de *Mtb* que se presentan por el CMH-II en los alelos de DR β más frecuentes.
- Evaluar la expansión clonal *in vitro* inducida por péptidos sintéticos en PBMCs de pacientes clasificados con la prueba de PPD.
- Caracterizar la población de linfocitos T en estudio mediante la producción de citoquinas y la activación de factores de transcripción en la diferenciación de linfocitos ayudadores.

DONANTES Y PROTEÍNAS

Colciencias

Código donante	Alelos	Prueba diagnóstica
11	15:01 / 13:05	Negativo
12	15:03 / 03:01	Negativo
13	11:04 / 14:02	Positivo
15	14:02 / 07:11	Positivo
16	13:02 / 08:02	Positivo
17	04:05 / 04:11	Negativo
18	16:02 / 11:02	Negativo
19	01:01 / 11:04	Negativo
20	04:05 / 10:01	Negativo
21	04:04 / 08:02	Negativo
22	01:02 / 04:07	Negativo
23	04:07 / 07:01	Negativo
25	01:02 / 04:07	Positivo
26	13:03 / 04:07	Negativo
27	01:03 / 03:01	Positivo
28	03:01 / 04:02	Positivo
29	01:02 / 01:02	Negativo
30	01:02 / 15:01	Negativo

Los alelos resaltados en negrilla no son frecuentes a nivel mundial.

2005

Forero:
Rv2004c

2007

Plaza:
Rv2560

2008

Chapetón: Rv2707
Patarroyo: Rv1490

2010

Rodríguez: Rv1980c
Cifuentes: Rv0679c

2011

Cáceres:
Rv0180c

2012

Rodríguez: Rv0227c
Ocampo: Rv2301 y Rv3166c

2013

Ocampo:
Rv1268c

2014

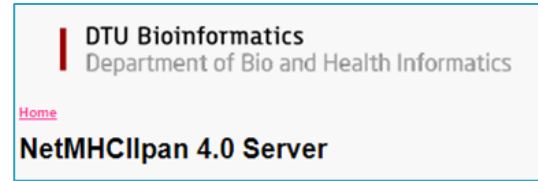
Ocampo:
Rv1411c,
Rv1911c y
Rv2270

Ocampo:
Rv3629

2015

Rodríguez:
Rv3494

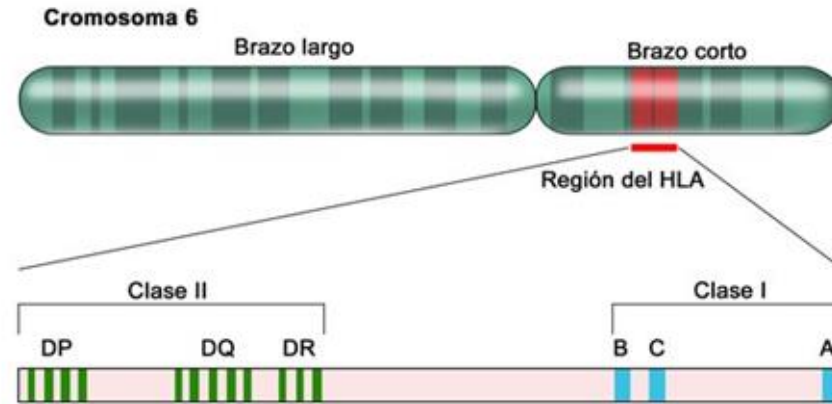
1. EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS PROVENIENTES DE *Mtb*



57 alelos frecuentes (DR β 1-3-4-5)

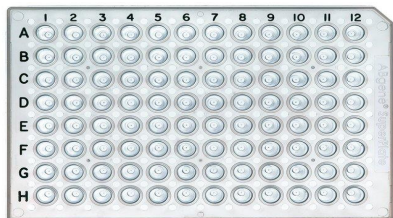
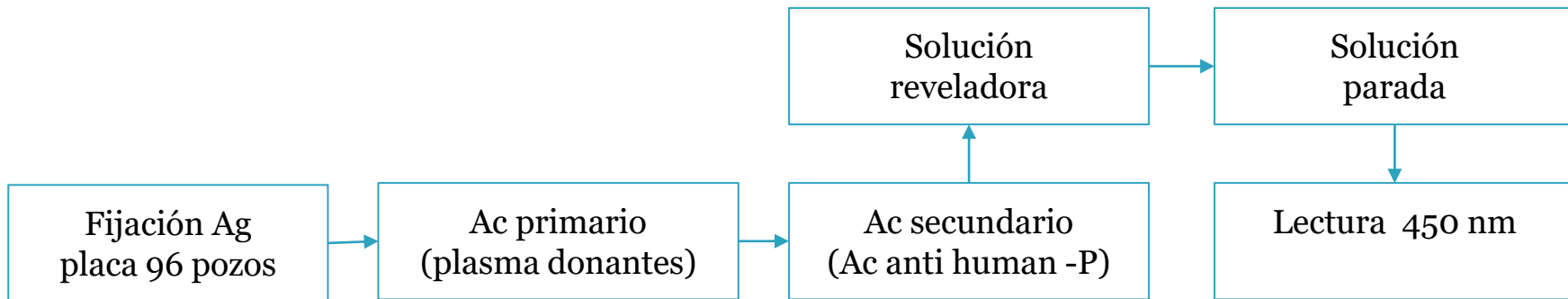
57 péptidos: 29 nativos y 28 modificados

%RANK
Sin unión: >10
U. débil: 2.1-10
U. fuerte: <2

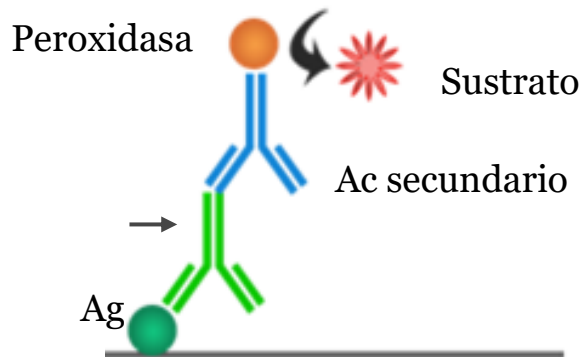


National Cancer Institute. 2012

2. EVALUACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD DE LOS PÉPTIDOS



40 antígenos **triplicado**
(22 nativas
18 modificadas)

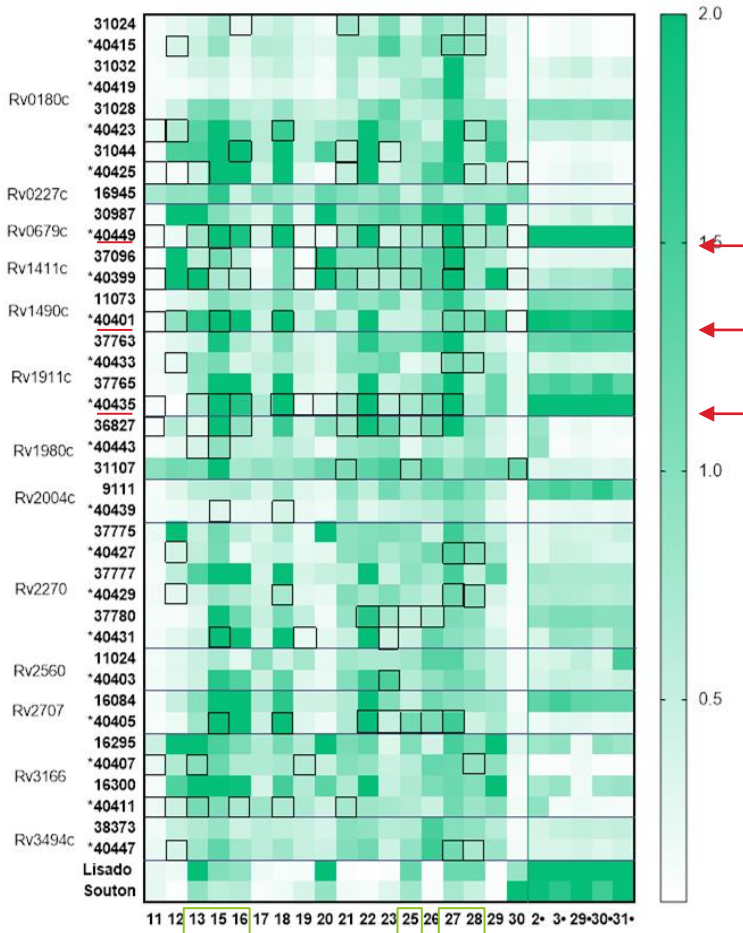


ELISA INDIRECTO



MultiSkán
GO

EVALUACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD DE LOS PÉPTIDOS



- TBA
- TBL / PPD +
- Sanos / PPD -

Lisado
Souton

PPD- vs TBA: 31024*, 31044*, 16295***, 40449**, 11073* y 40401*, 40435**, 31107*** y 40443*; 40407**, 16300*, 40411**

PPD+ vs TBA: 40425*, 16295**, 30987*, 31107***, 9111**, 40439*, 40427*, 40405, 40447**

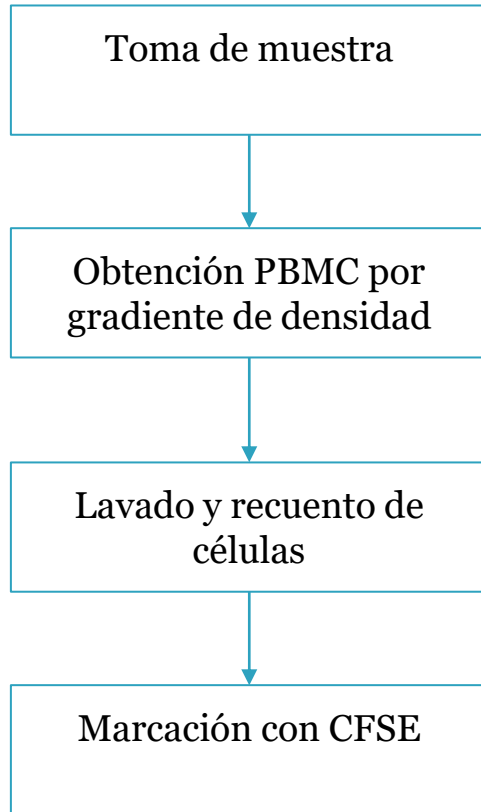
PPD-/PPD+: 9111*, 40439*, 40427*, 38373* y 40447**

OBJETIVOS

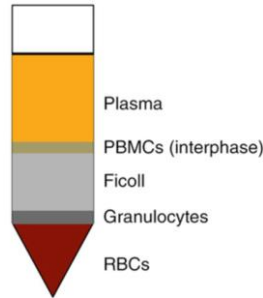
Determinar a través de ensayos de linfoproliferación la respuesta inmune celular generada por péptidos sintéticos provenientes de *Mtb* en PBMCs.

- Identificar *in silico* las secuencias presentes en péptidos provenientes de *Mtb* que se presentan por el CMH-II en los alelos de DR β más frecuentes.
- Evaluar la expansión clonal *in vitro* inducida por péptidos sintéticos en PBMCs de pacientes clasificados con la prueba de PPD.
- Caracterizar la población de linfocitos T en estudio mediante la producción de citoquinas y la activación de factores de transcripción en la diferenciación de linfocitos ayudadores.

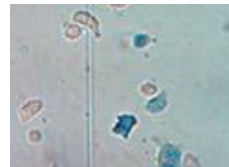
3. DETERMINACIÓN DE EXPANSIÓN CLONAL DE LINFOCITOS



amilab.cl/vacutainer/



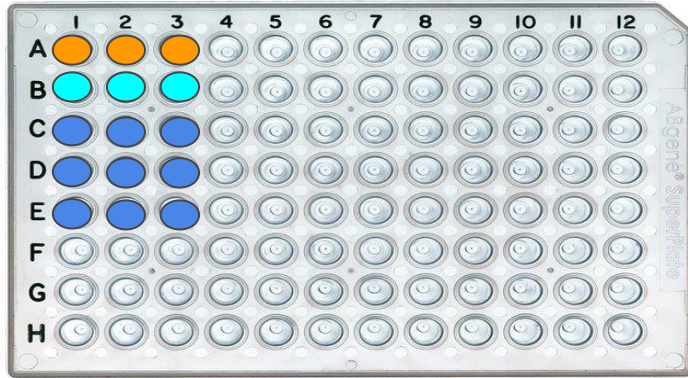
www.researchgate.net/figure/Ficol-l-paque-layers-after-centrifugation-



www.researchgate.net/figure/Figura-1-Determinacion-de-viabilidad-de

Código donante	PBMC/20 mL sangre total	% Viabilidad
11	20.937.500	92
12	18.525.000	90
13	18.637.500	91
15	17.400.000	89
16	21.500.000	93
17	16.337.500	88
18	17.100.000	90
19	18.800.000	90
20	16.500.000	88
21	23.450.000	92
22	17.700.000	89
23	20.550.000	90
25	19.700.000	91
26	22.525.000	93
27	21.412.500	90
28	15.860.000	86
29	21.450.000	91
30	16.545.000	90

DETERMINACIÓN DE EXPANSIÓN CLONAL DE LINFOCITOS

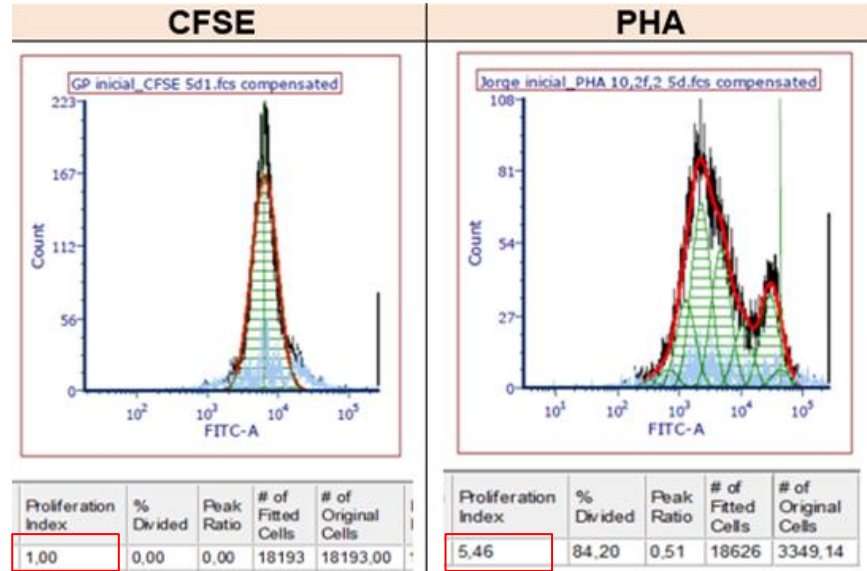


- CFSE
- PHA 10 µg/ml
- Péptido 100 µg/ml

Triplicado



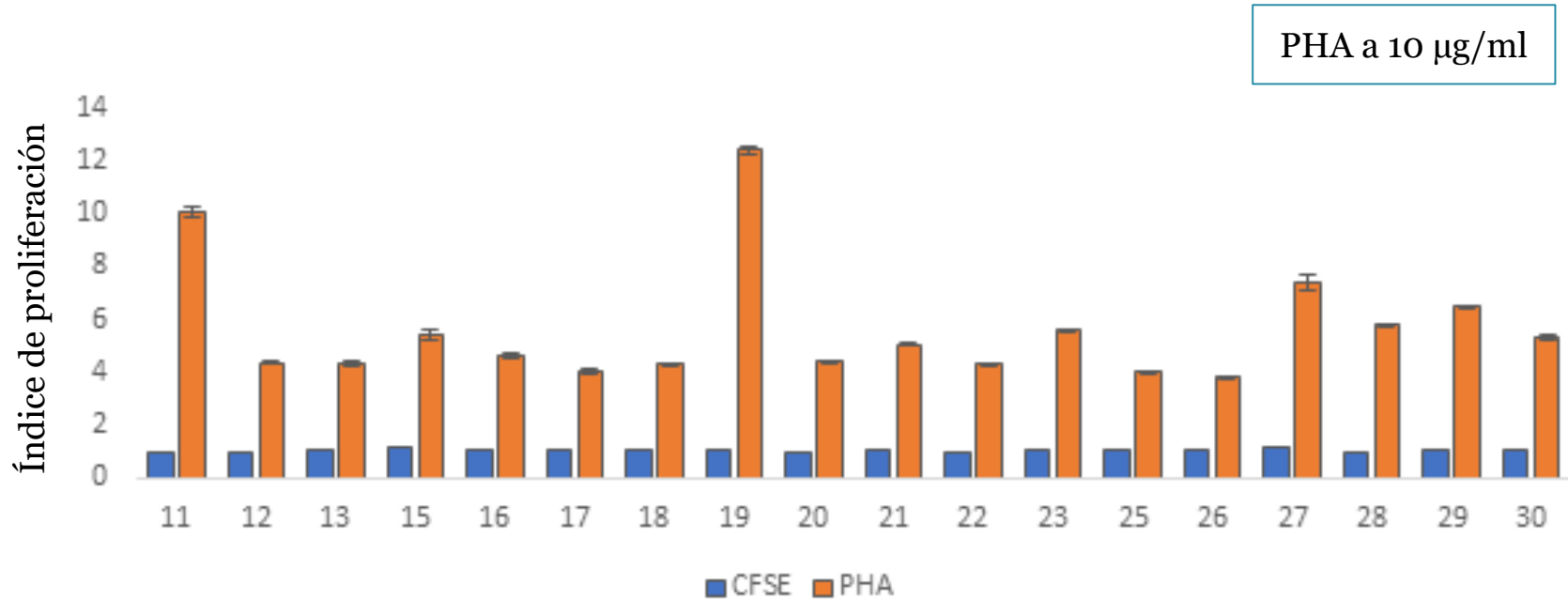
IP: >1.7



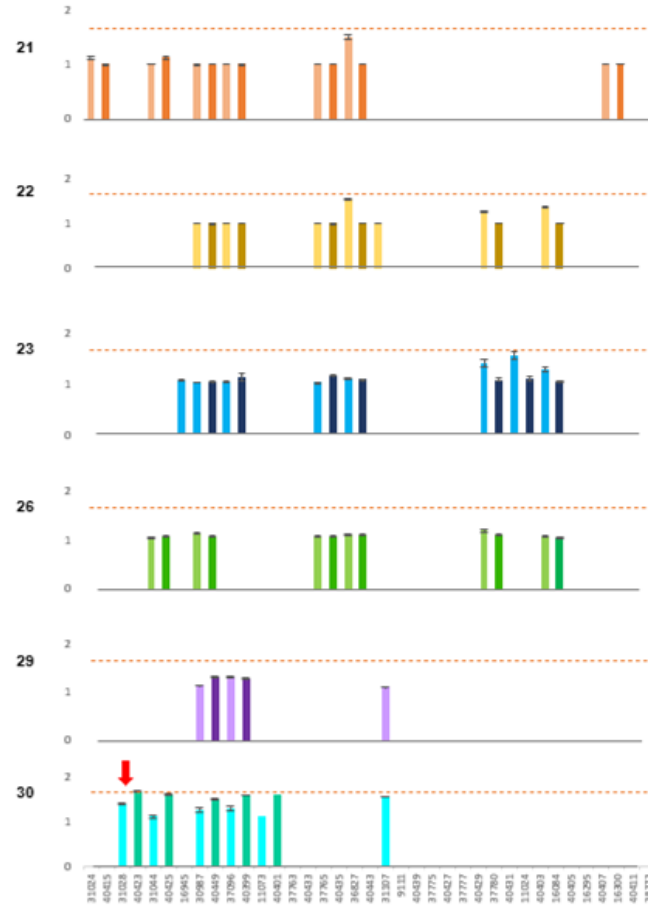
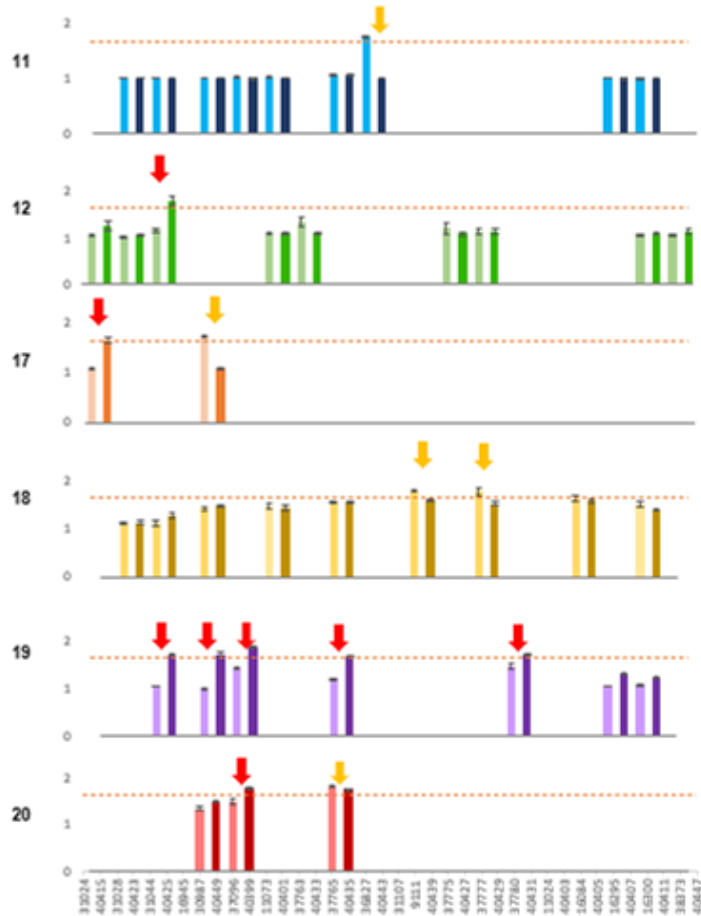
<https://denovosoftware.com/>

FACS - DIVA Canto II

DETERMINACIÓN DE EXPANSIÓN CLONAL DE LINFOCITOS



DETERMINACIÓN DE EXPANSIÓN CLONAL DE LINFOCITOS

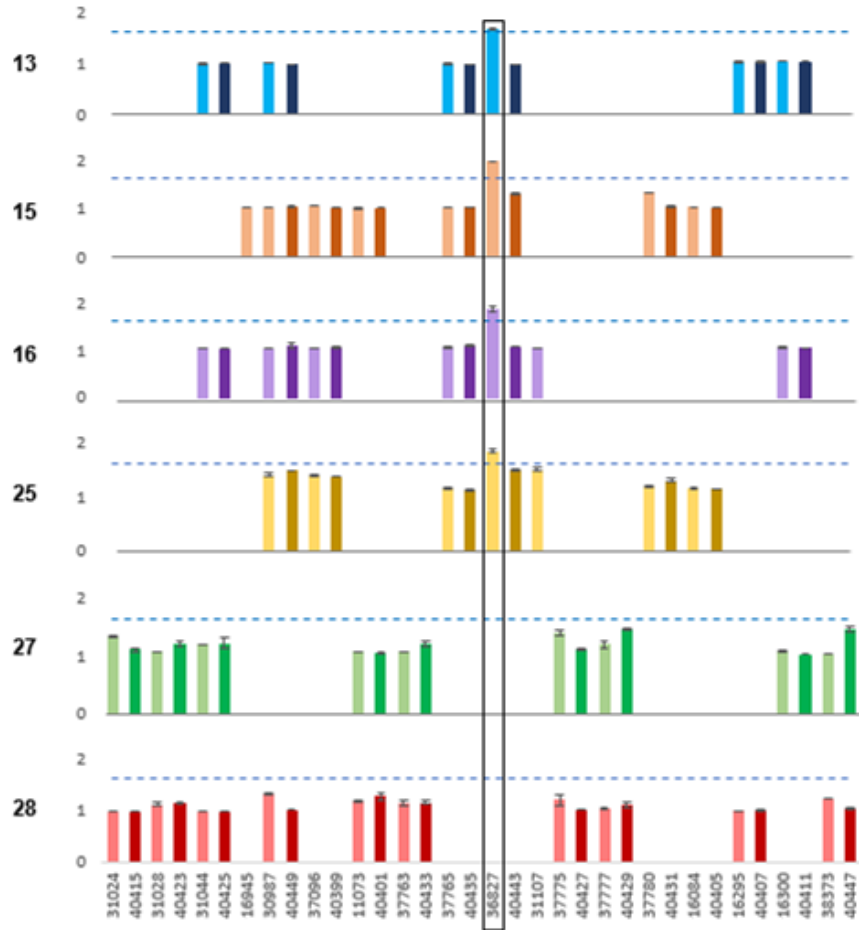


**PPD
negativo**

- 30987
- 37765
- 36827
- 9111
- 3777

- 40399*
- 40425*
- 40435*
- 40415
- 40431
- 40423
- 40449

DETERMINACIÓN DE EXPANSIÓN CLONAL DE LINFOCITOS



PPD positiva

Rv1980c:36827

Método diagnóstico temprano para pacientes con TBA asintomáticos

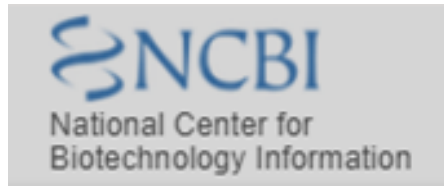
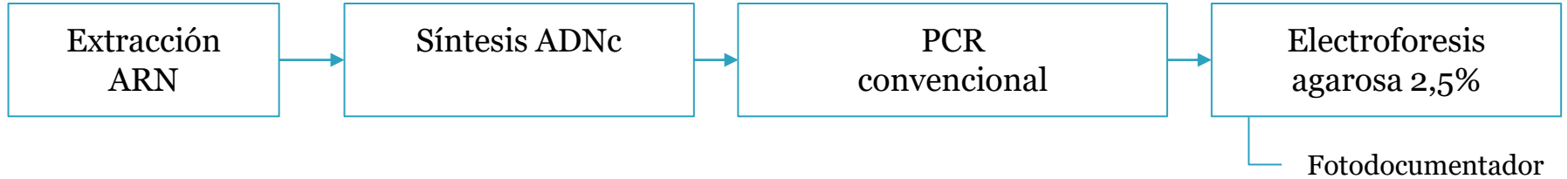
Nakamura RM, Velmonte MA, Kawajiri K, Ang CF, Frias et al.

OBJETIVOS

Determinar a través de ensayos de linfoproliferación la respuesta inmune celular generada por péptidos sintéticos provenientes de *Mtb* en PBMCs.

- Identificar *in silico* las secuencias presentes en péptidos provenientes de *Mtb* que se presentan por el CMH-II en los alelos de DR β más frecuentes.
- Evaluar la expansión clonal *in vitro* inducida por péptidos sintéticos en PBMCs de pacientes clasificados con la prueba de PPD.
- Caracterizar la población de linfocitos T en estudio mediante la producción de citoquinas y la activación de factores de transcripción en la diferenciación de linfocitos ayudadores.

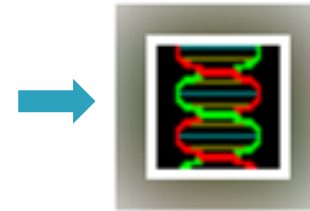
4. IDENTIFICACIÓN LINAJES DE LINFOCITOS TH



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

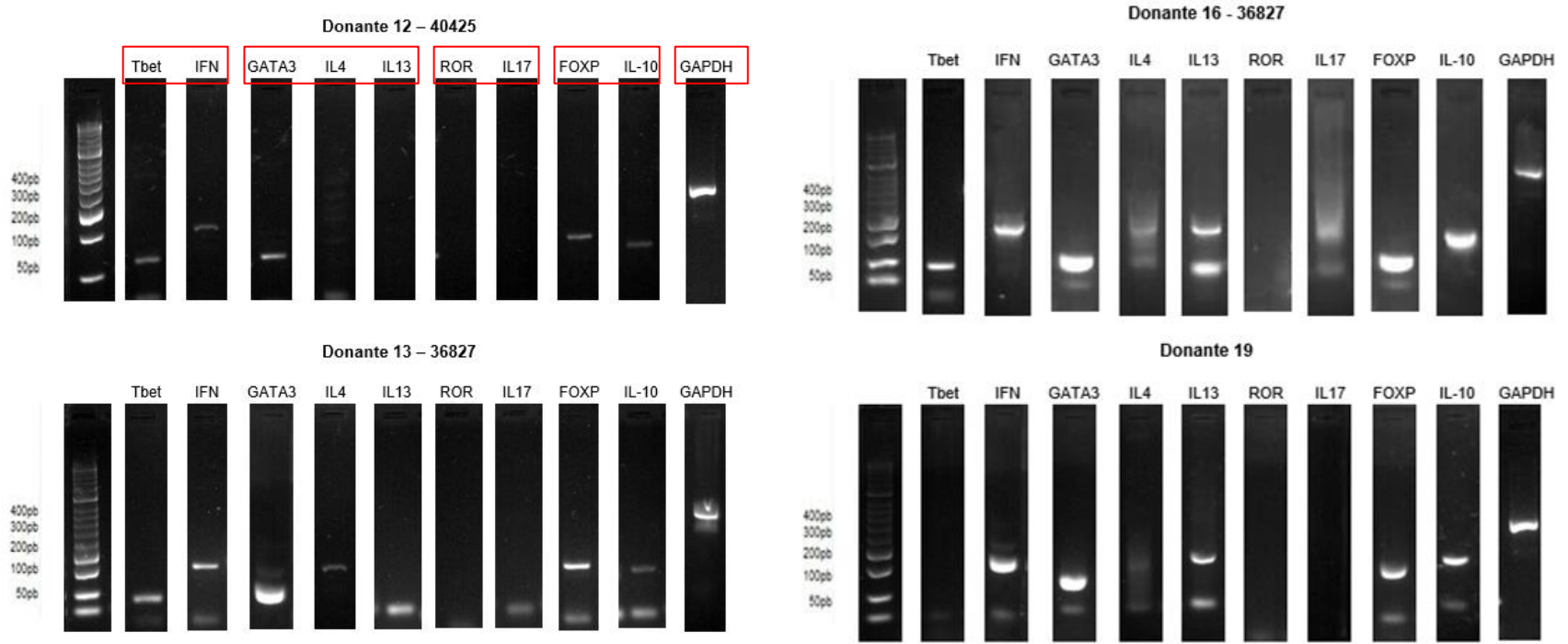


GeneRunner

<http://www.generunner.net/Al>

t-bet	GATA3	RORt	FOXP3	Bcl6	BLIMP1	IFN	IL-4	IL-13	IL-17A	IL-10	IL-21	GAPDH
110 pb	125 pb	114 pb	181 pb	178 pb	242 pb	204 pb	190 pb	202 pb	167 pb	172 pb	265 pb	496 pb

IDENTIFICACIÓN DE LINAJES DE LINFOCITOS TH



Th1 en 100%

Th2 en 88%

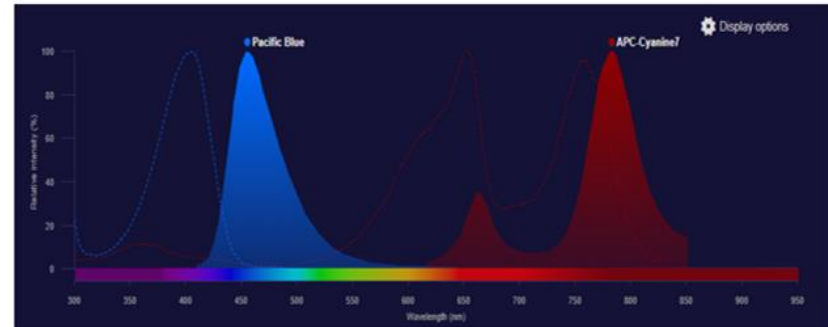
Th17 en 44%

T_{reg} en 88%

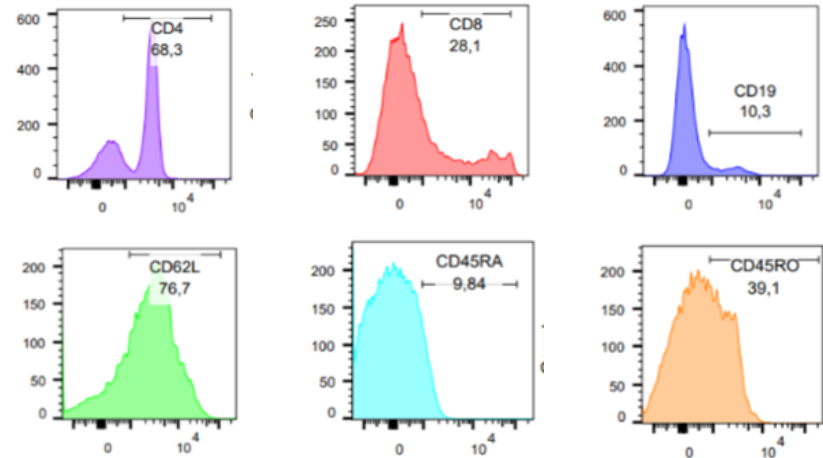
Tf en 0%

5. EVALUACIÓN MEMORIA INMUNOLÓGICA

	Fluoróforos	Célula a identificar
CD4	Pacific blue	Linfocitos ayudadores
CD8	APC (Alofococianina)	Linfocitos citotóxicos
CD19	APC.Cy7	Linfocitos B
CD62L	FITC	Linfocitos de memoria
CD45RA	Alexa Fluor 700	Linfocitos inmaduros
CD45RO	PE (ficoeritrina)	Linfocitos maduros



<https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html#!/>

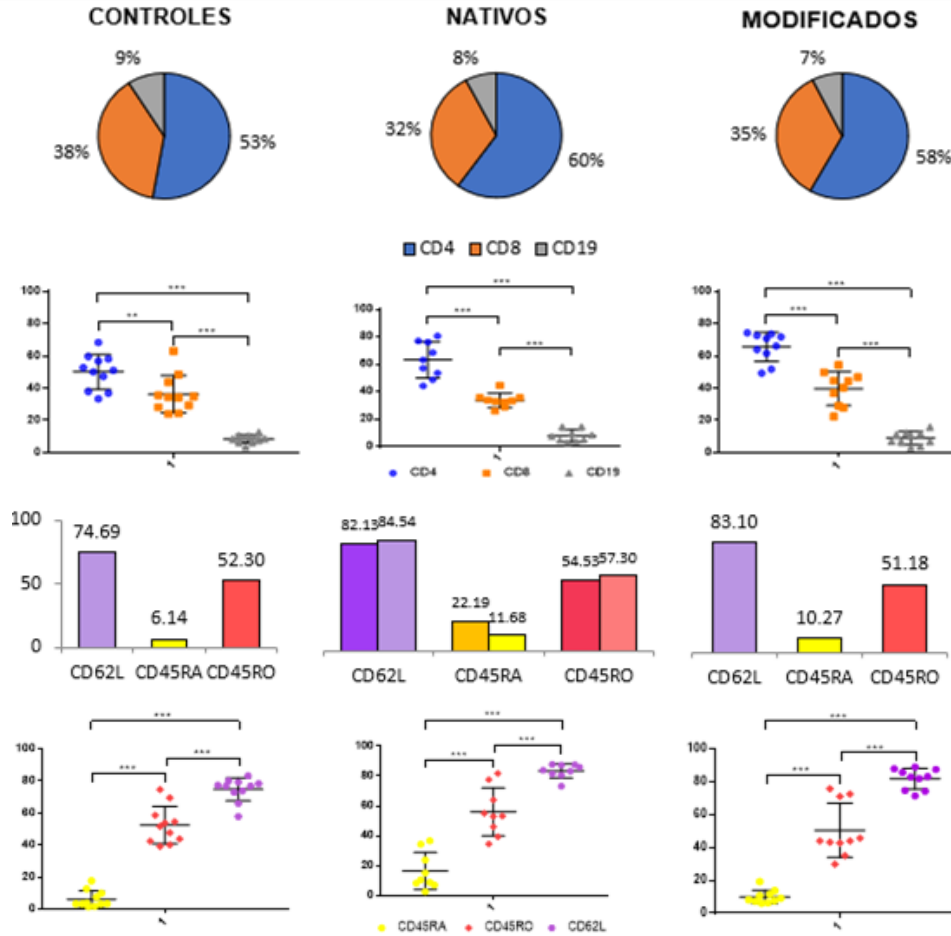


150.000
células



<https://www.flowjo.com/>

EVALUACIÓN MEMORIA INMUNOLÓGICA



Aumento CD4
Disminución CD8
y CD19

Rta. celular
tipo Th

Aumento CD62L,
CD45RA y
CD45RO

Memoria
central

CONCLUSIONES

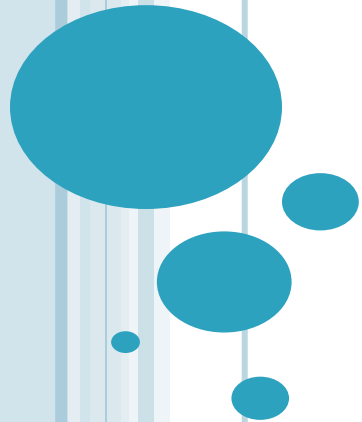
- De las 16 proteínas compuestas por 57 péptidos se observó que las secuencias peptídicas modificadas poseen mayor pronóstico de unión a los alelos de DR β más frecuentes a nivel mundial.
- La proliferación de linfocitos estimulados con péptidos modificados fue mayor en los donantes PPD negativo, donde se evidenció la proliferación de 7 péptidos de 5 proteínas evaluadas.
- El péptido 36827 (Rv1980c) presentó IP superior al umbral en todos los donantes PPD positivo que tienen unión alelo específica con la secuencia peptídica.
- La diferenciación de linfocitos después de la estimulación se representa principalmente por el linaje Th1, seguido por Th2 y T-reg.
- Las células de memoria presentes después de la proliferación son presuntivamente de tipo memoria central, importantes por su acción efectora en respuesta a la infección con *Mtb*.

PERSPECTIVAS

- Determinar la proliferación celular con el estímulo del péptido 36827 en una cohorte de donantes más grande para identificar su posible uso como técnica de diagnóstico.
- Identificar la linfoproliferación con el uso de péptidos modificados en donantes PPD negativo con el uso de CPA como macrófagos y dendríticas.
- Evaluar la presencia de anticuerpos después del estímulo con los péptidos para determinar el reconocimiento de estos antígenos y la participación del linaje Th2.
- Purificar linfocitos *naive* para confirmar la diferenciación de perfiles Th1, Th2 y Th17 que confirme la presencia de citoquinas para el control de la micobacteria.

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia, por el apoyo y amor a lo largo de estos años.
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por el proceso académico y formación que me dieron las bases para el desarrollo del trabajo.
- A la FIDIC por la financiación y soporte en la realización del trabajo de grado y a los compañeros del grupo Funcional de Tuberculosis quienes aportaron a mi proceso de aprendizaje.
- A mi asesor externo, Christian Sánchez por el acompañamiento, dedicación y formación en investigación.
- A la docente y asesora interna Edith Hernández por su contribución a lo largo del desarrollo del trabajo de grado.



¡MUCHAS GRACIAS!

BIBLIOGRAFÍA

- Organization WH. Global Tuberculosis Report. 2020.
- Moliva JI. TJ, Torrelles JB. Prospects in Mycobacterium bovis Bacille Calmette et Guérin (BCG) vaccine diversity and delivery: why does BCG fail to protect against tuberculosis? *Vaccine*. 2015;22; 33 (39):5035-41.
- Curtidor H. RC, Bermúdez A., Vanegas M., Varela Y., Patarroyo ME. Conserved Binding Regions Provide the Clue for Peptide-Based Vaccine Development: A Chemical Perspective. *Molecules*. 2017; 22:2199.
- Patarroyo ME. CG, Vargas LE., Rosas J. Structural modifications enable conserved peptides to fit into MHC molecules thus inducing protection against malaria. *Chembiochem Eur J Chem Biol*. 2004;5:1588–1593.
- Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *The Lancet*. 1995;346(8986):1339-45.
- Martino M. LL, Galli L. Immune Response to Mycobacterium tuberculosis: A Narrative Review. *Front Pediatr*. 2019.
- Sánchez-Barinas C. OM, Tabares L., Bermúdez M., Patarroyo MA., Patarroyo ME. Specific Binding Peptides from Rv3632: A Strategy for Blocking Mycobacterium tuberculosis to Target Cells? . *BioMed Research International*. 2019;1–13.
- Carabali-Isajar ML. OM, Rodríguez DC., Vanegas M., Curtidor H., Patarroyo MA., Patarroyo ME. Towards designing a synthetic antituberculosis vaccine: The Rv3587c peptide inhibits mycobacterial entry to host cells. *Elservier*. 2018;26 (9): 2401-2409.
- Sánchez-Barinas CD. Marisol O., Vanegas M. Mycobacterium tuberculosis H37Rv LpqG protein peptides can inhibit mycobacterial entry through specific interactions. *Molecules*. 2018;23(3).
- Zhu J. YH, Paul W. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-89.
- Sharma S. SM, Bose M. Mycobacterium tuberculosis infection of human monocyte- derived macrophages leads to apoptosis of T cells. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(3):226-34.
- Quah B. PC. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2049-56.
- Nakamura RM, Velmonte MA, Kawajiri K, Ang CF, Frias RA, Mendoza MT, Montoya JC, Honda I, Haga S, Toida I: MPB64 mycobacterial antigen: a new skin-test reagent through patch method for rapid diagnosis of active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998, 2(7):541-546.