



**APOPTOSIS DE NEUTRÓFILOS MEDIADA POR ANTICUERPOS DIRIGIDOS
CONTRA PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Mycobacterium tuberculosis*
H37Rv**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ 2019**



**APOPTOSIS DE NEUTRÓFILOS MEDIADA POR ANTICUERPOS DIRIGIDOS
CONTRA PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Mycobacterium tuberculosis*
H37Rv**

**ESTUDIANTE
ANGIE PAOLA ALFONSO ALFONSO**

**ASESORA INTERNA
SUSAN LORENA CASTRO MOLINA MSc.
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**ASESORA EXTERNA
MARY LILIÁN CARABALÍ ISAJAR MSc.
FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ 2019**

Dedicatoria

A mi familia por su amor y apoyo incondicional, porque gracias al esfuerzo de ellos he podido llevar a cabo las metas que me propongo día a día y porque sin ellos no podría ser la persona que actualmente soy, con grandes sueños por realizar.

Agradecimientos

A mis padres, mi abuela y mis hermanos por el apoyo y la motivación pese a cada una de las dificultades.

A mis amigos y futuros colegas que hicieron de esta la mejor experiencia.

A cada uno de los docentes de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca que hicieron parte de mi formación integral y profesional, además de enseñarme todas las cosas maravillosas de mi carrera profesional que va dar inicio a los frutos de mi vida.

A mis asesoras Mary y Susan por el apoyo, sugerencias y comentarios que fueron importantes para terminar el proyecto de grado y que contribuyeron en mi formación profesional y personal.

A FIDIC en especial al grupo de Tuberculosis, a la doctora Marisol por darme la oportunidad de ser parte del grupo de investigación y adquirir nuevos conocimientos, a mis compañeros de laboratorio Jonathan, Christian y Camila por sus risas y enseñanzas.

Tabla de contenido

1.	Resumen.....	13
2.	Introducción	14
3.	Objetivos	16
3.1.	Objetivo general.....	16
3.2.	Objetivos específicos	16
4.	Antecedentes.....	17
5.	Marco Teórico.....	19
5.1.	Generalidades de la tuberculosis.....	19
5.2.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> y el complejo MTB	20
5.3.	Epidemiología de la tuberculosis	21
5.4.	Diagnóstico de la tuberculosis	23
5.4.1.	Criterio bacteriológico	24
5.4.2.	Criterio histopatológico	24
5.4.3.	Criterio tuberculínico y prueba QuantiFERON	25
5.5.	Tratamiento para la TB	25
5.6.	Respuesta inmune innata ante <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
5.6.1.	Células epiteliales alveolares	27
5.6.2.	Macrófagos	28
5.6.3.	Células dendríticas (DCs)	29
5.6.4.	Células asesinas naturales (NKs).....	29
5.6.5.	Neutrófilos	30
5.7.	Respuesta inmune adaptativa ante <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
5.7.1.	Linfocitos T (LT)	31
5.7.2.	Linfocitos B (LB).....	32
5.8.	Desarrollo de vacunas contra la tuberculosis.....	33
6.	Metodología	35
6.1.	Diseño metodológico	35
6.1.1.	Tipo de investigación.....	35
6.1.2.	Universo.....	35

6.1.3.	Población.....	35
6.1.4.	Muestra	35
6.2.	Técnicas y procedimientos.....	36
6.2.1.	Selección de péptidos.....	36
6.2.1.1.	Aproximación bioinformática.....	36
6.2.1.2.	Aproximación experimental.....	37
6.2.1.2.1.	Obtención de sueros de Donantes	37
6.2.1.2.2.	Búsqueda de anticuerpos IgGs afines a péptidos con epítopes B	37
6.2.2.	Obtención de plasmas para purificación de inmunoglobulina G que reconocen péptidos seleccionados.....	38
6.2.2.1.	Purificación de IgG.....	38
6.2.2.2.	Purificación de IgG péptido-específica.....	38
6.2.3.	Ensayos de fagocitosis en neutrófilos mediada por anticuerpos.....	39
6.2.3.1.	Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica	39
6.2.3.2.	Ensayo de opsonofagocitosis	40
6.2.3.2.1.	Cultivo de <i>Mtb</i> H37Rv	40
6.2.3.2.2.	Opsonofagocitosis de <i>Mtb</i> H37Rv	40
6.2.4.	Procesamiento y análisis de datos.....	41
7.	Resultados.....	42
7.1.	Selección de péptidos provenientes de proteínas de la envoltura de <i>Mtb</i> H37Rv	42
7.2.	Purificación de inmunoglobulina G que reconocen péptidos específicos	45
7.3.	Apoptosis de neutrófilos	47
8.	Discusión	53
9.	Conclusiones	57
10.	Recomendaciones	58
11.	Referencias	59
12.	Anexos	66

Índice de figuras

Figura 1. Pared micobacteriana.....	21
Figura 2. Tasas de incidencia a nivel mundial estimadas durante el 2017 para TB.....	22
Figura 3. Tasas de incidencia de TB en Colombia estimadas en el 2018.....	23
Figura 4. Resumen metodológico para evaluar la apoptosis en neutrófilos infectados por <i>Mtb</i> H37Rv.....	36
Figura 5. Reconocimiento de sueros provenientes de donantes frente a péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de <i>Mtb</i> H37Rv.....	45
Figura 6. Aislamiento y purificación de IgG que reconocen péptidos seleccionados.....	46
Figura 7. Análisis de neutrófilos aislados de sangre periférica.....	48
Figura 8. Estandarización MOI de infección y tinción de neutrófilos infectados.....	49
Figura 9. Neutrófilos en apoptosis.....	50
Figura 10. Muerte celular de neutrófilos infectados con <i>Mtb</i> H37Rv pre-opsonizada con IgG péptidos-específicos.....	51
Figura 11. Fagocitosis y apoptosis de neutrófilos con <i>Mtb</i> H37Rv pre-opsonizada.....	52

Índice de tablas

Tabla 1. Síntomas de la TB extrapulmonar.....	20
Tabla 2. Informe de resultados en la baciloscopia.....	24
Tabla 3. Predicción de epítopes B en péptidos provenientes de proteínas presentes en la envoltura de <i>Mtb</i> H37Rv.....	43
Tabla 4. Cuantificación de Inmunoglobulinas purificadas.....	47

Abreviaturas

ATP: Trifosfato de adenosina del inglés

Adenosine Triphosphate

A549: Células humanas de epitelio alveolar tipo II

BAAR: Bacilo Ácido Alcohol resistente

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

BCIP: del inglés *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate*

Bcl-2: del inglés *B-Cell Lymphoma 2*

BSA: Albumina de suero bovino del inglés *Bovine Serum Albumin*

BSL-2: Nivel de bioseguridad 2 del inglés *Biosafety Level-2*

CD: Cúmulo de diferenciación del inglés *Cluster Differentiation*

CLR: Receptor de lectina tipo C del inglés *C-Type Lectin Receptor*

CNBr: Bromuro de cianógeno del inglés *Cyanogen Bomide*

DCs: Células dendríticas del inglés *Dendritic Cell*

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas del inglés *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

Fab: Fragmento de unión a antígeno del inglés *fragment antigen-binding*

Fc: Fragmento cristalizante del inglés *fragment crystallizable*

FcR: Receptor del fragmento cristalizante del inglés *fragment crystallizable receptors*

FIDIC: Fundación Instituto de Inmunología de Colombia.

GFP: Proteína verde fluorescente del inglés *Green Fluorescent Protein*

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos del inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1 del inglés *Intercellular Adhesion Molecule*

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

INF- γ : Interferón gamma

LB: Linfocito B

LT: Linfocito T

Mcl-1: del inglés *Myeloid Cell Leukemia-1*

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad del inglés *Major Histocompatibility Complex*

MIP: Proteína inflamatoria de macrófagos del inglés *Macrophage Inflammatory Proteins*

MMPs: Metaloproteinasas del inglés *Matrix Metalloproteinases*

MOI: Multiplicidad de infección

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

NBT: del inglés *Nitro Blue Tetrazolium*

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos del inglés *Neutrophil Extracellular Traps*

NKs: Asesinas naturales del inglés *Natural Killer*

NLR: Receptor tipo Nod del inglés *Nod-Like receptor*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa del inglés *Polymerase Chain Reaction*

PE: Ficoeritrina del inglés *Phycoerythrin*

PMN: Polimorfonuclear

PRRs: Receptor de reconocimiento de patrones del inglés *Pattern Recognition Receptor*

QTF: QuantiFERON

ROS: Especies reactivas de oxígeno del inglés *Reactive Oxygen Species*

SIVIGILA: Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública

TB: Tuberculosis

TBA: Tuberculosis Activa

TBL: Tuberculosis Latente

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta del inglés *Transforming Growth Factor Beta*

Th1: Linfocito T ayudador 1

Th17: Linfocito T ayudador 17

TLR: Receptores tipo Toll del inglés *Toll-Like Receptor*

TMB: Tetrametilbencidina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa del inglés *Tumor Necrosis factor alpha*

U937: Macrófagos humanos derivados de monocitos

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana



APOPTOSIS DE NEUTRÓFILOS MEDIADA POR ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

1. Resumen

Los neutrófilos son células de la inmunidad innata que predominan en pacientes con tuberculosis activa, estos polimorfonucleares mediante la apoptosis, pueden contribuir en la resolución de la infección sin ocasionar daño en el tejido pulmonar, favorecer la presentación antigénica e inducir la producción de citoquinas proinflamatorias, para contrarrestar el crecimiento micobacteriano; sin embargo, los factores de patogenicidad y virulencia que posee *Mycobacterium tuberculosis*, pueden producir otras formas de muerte celular que ocasionan daño tisular y favorecen la inflamación exacerbada. La apoptosis puede ser inducida por fagocitosis que se lleva a cabo cuando los antígenos se encuentran unidos a anticuerpos (opsonofagocitosis), este fenómeno no se ha descrito en procesos infecciosos relacionados con *Mycobacterium* y considerando la importancia de este tipo de muerte celular como parte de una respuesta inmune protectora, es necesario evaluar anticuerpos que promuevan este tipo de muerte programada. En este sentido, se planteó el siguiente trabajo, evaluar si la opsonofagocitosis con IgGs que reconocen antígenos de la micobacteria, puede mediar la apoptosis de neutrófilos, por consiguiente, se seleccionaron y aislaron inmunoglobulinas G, que reconocieron 9 secuencias peptídicas presentes en diferentes proteínas de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Se encontró que la opsonofagocitosis con los anticuerpos péptidos-específicos 37964, 37765, 31107, 16300 y 38373 aumentaron la apoptosis en los polimorfonucleares, lo cual podría indicar que algunas inmunoglobulinas, posiblemente pueden mediar la apoptosis en estas células, de forma que los péptidos que son reconocidos y para los cuales se aislaron las IgGs, probablemente pueden favorecer de alguna forma la generación de una respuesta inmune protectora.

Palabras clave: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, neutrófilos, anticuerpos, apoptosis.

2. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), esta patología puede ser controlada por hospederos inmunocompetentes, pero aun así, el 5 al 10% de las personas que están en contacto con la bacteria desarrollan la fase activa de la enfermedad; no obstante, se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, ya que ha causado la muerte de 1.6 millones de personas en el último año y afecta alrededor de 10 millones ^{1, 2}. En Colombia, a través del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) se notificaron para el 2018, 14.338 casos de TB pulmonar y diseminada, cifras que se han alcanzado por falta de cobertura en salud, la multirresistencia a fármacos y la carencia de una vacuna efectiva ³. Aunque actualmente se cuenta con la vacuna denominada BCG (*Mycobacterium bovis*, Bacillus de Calmette-Guérin), ésta tiene un efecto protector contra la TB meníngea y miliar en niños, pero no previene la infección pulmonar primaria, ni evita la reactivación de la infección pulmonar latente en adultos, además el mal uso de los fármacos antituberculosos ha traído con ello la aparición de cepas micobacterianas multidrogo-resistentes ². Por lo tanto, es necesario buscar nuevas metodologías que contribuyan a la erradicación de la enfermedad, siendo la vacunación la alternativa más eficiente según la OMS (Organización Mundial de la Salud) ².

Contar con una vacuna que genere respuesta inmune protectora es de vital importancia, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia- FIDIC, con el objetivo de aportar al desarrollo de una vacuna sintética contra la TB, ha buscado antígenos peptídicos provenientes de proteínas de superficie de *Mtb* H37Rv, a los cuales se les evalúa la capacidad de unión específica y su papel en la entrada del microorganismo a células hospederas ⁴⁻²³. El siguiente paso, comprende determinar la capacidad de dichos antígenos para producir una respuesta inmune protectora.

En este sentido, se ha reportado que la infección por *Mtb* puede ser eliminada a partir de la respuesta inmune innata, gracias a la participación de células epiteliales, células dendríticas (DCs del inglés *Dendritic Cell*), macrófagos, células asesinas naturales (NKs, del inglés *Natural Killer*) y neutrófilos; estos últimos fagocitan el patógeno y controlan la infección reclutando células de la inmunidad innata y adaptativa, igualmente liberan citoquinas como interleucinas (IL-8, IL-6 IL-

1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α del inglés *Tumor Necrosis factor alpha*), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α , MIP-1 β del inglés *Macrophage Inflammatory Proteins*), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF del inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) y metaloproteinasas (MMPs del inglés *Matrix Metalloproteinases*), estímulos que contribuyen al control del crecimiento del patógeno²⁴⁻²⁶.

Los neutrófilos tienen una vida media de aproximadamente 1 día y mueren por apoptosis, en procesos inflamatorios estos pueden extender su vida útil; no obstante, en algunos casos pueden morir por necrosis o por la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs del inglés *Neutrophil Extracellular Traps*) dependiendo de la virulencia del patógeno^{27,28}. Se ha encontrado que *Mtb* logra evadir los mecanismos antimicrobianos que poseen los neutrófilos, promoviendo en estos, necrosis y NETs, lo cual ocasiona el aumento del proceso inflamatorio y daño al tejido pulmonar, por la liberación de gránulos citotóxicos y proteolíticos^{26,29-31}.

La apoptosis resulta ser una alternativa para dar resolución a la infección sin ocasionar daño tisular y favorece la presentación de antígenos, mediante la producción de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células presentadoras de antígenos (eferocitosis); una de las formas de inducir la apoptosis, es a través de la formación de complejos inmunes (antígeno-anticuerpo)³².

Por otra parte, se ha evidenciado que las inmunoglobulinas (IgG e IgA), pueden regular mecanismos antimicrobianos en células de la inmunidad innata como, la producción de citoquinas inflamatorias, enzimas proteolíticas, agentes oxidativos y apoptosis; no obstante, durante la infección con *Mtb* solo se ha descrito que anticuerpos producidos durante la TB latente (TBL) y TB activa (TBA) aumentan la fagocitosis micobacteriana, en este sentido es relevante evaluar que otras funciones pueden ser mediadas por los anticuerpos que reconocen antígenos de *Mtb*^{33,34}.

Con el fin de contribuir al desarrollo de una vacuna contra la TB basada en péptidos derivados de proteínas de envoltura micobacteriana y como parte de la determinación de la inmunogenicidad de dichos candidatos a vacuna, se pretende evaluar el potencial de los anticuerpos que reconocen los péptidos mencionados, para inducir apoptosis en los neutrófilos, ya que este tipo de muerte celular controla el crecimiento bacteriano y no genera daño en el tejido pulmonar, de tal manera ello apoya la generación de una respuesta inmune protectora frente a TB^{27,28}.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar la apoptosis de neutrófilos infectados por *Mtb* H37Rv durante la fagocitosis mediada por IgGs específica a antígenos de la envoltura micobacteriana.

3.2. Objetivos específicos

- Seleccionar péptidos provenientes de proteínas de la envoltura de *Mtb* H37Rv que sean antigénicos mediante el uso de herramientas bioinformáticas e inmunoensayos.
- Aislar anticuerpos IgGs que reconocen antígenos peptídicos de *Mtb* H37Rv en sangre periférica.
- Evaluar el porcentaje de apoptosis en neutrófilos mediante por la formación del complejo antígeno-anticuerpo.

4. Antecedentes

La TB es una enfermedad infecciosa que, se transmite desde una persona con TB activa mediante aerosoles que contienen microorganismos viables ³⁵. Una vez *Mtb* llega a los pulmones, la infección se puede resolver espontáneamente o contener mediante el desarrollo de una respuesta inmune, mediada por la participación de células residentes del pulmón como macrófagos, neutrófilos, DCs, NKs y linfocitos, que darán paso a la formación del granuloma, con el fin de secuestrar, aislar y eliminar a *Mtb*; sin embargo, el granuloma puede deshacerse liberando la micobacteria y dando paso a la forma activa de la enfermedad ^{36,37}.

Entre las células inmunes mencionadas anteriormente, se encuentran los PMN como los neutrófilos que liberan citoquinas, quimiocinas, NETs e inducen muerte celular por fagocitosis, generando cuerpos residuales que expresan en la membrana fosfatidilserina para ser, reconocidos por receptores de macrófagos (fagocitos presentadores de antígenos), que activan LT CD4⁺ e influyen en la respuesta inmune adaptativa ^{25,28}. No obstante, se ha reportado que durante la infección con *Mtb* los neutrófilos no pueden eliminar al patógeno debido a la necrosis que este produce, siendo una respuesta antimicrobiana ineficiente ³⁸.

También, se ha evidenciado la disminución de la capacidad fagocítica de los neutrófilos cuando hay infección por *Mtb*, utilizando *E. coli* como modelo patógeno y una cepa de *Mtb* H37Rv se evaluó la fagocitosis con neutrófilos de donantes sanos y pacientes con TB pulmonar, al comparar la actividad fagocítica, se obtuvo que este proceso fue menor en individuos con TB ³⁹. Es así que se ha recomendado un estudio que abarque ensayos de fagocitosis por medio de opsonización, para evaluar la contribución de los anticuerpos ³⁹.

Respecto a los anticuerpos, se ha descrito que las IgA e IgG estimulan funciones antimicrobianas en los neutrófilos durante la infección bacteriana, como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *Reactive Oxygen Species*), enzimas líticas, quimioatrayentes y liberación de NETs, todas estas asociadas a la activación de receptores de la fracción cristalizante (FcR del inglés *fragment crystallizable receptor*) de los neutrófilos, como CD64 (CD del inglés *Cluster Differentiation*) (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c (FcγRIIc), CD16b (FcγRIIIb), CD89 (FcαRI), CD23 (FcεRII) y el FcR neonatal (FcRn) ^{34,40}. La activación de los

receptores Fc γ , favorece la capacidad de desencadenar respuestas celulares mediante diferentes mecanismos. Gamberale *et al*³² determinaron la capacidad que tienen los receptores Fc γ de los neutrófilos para inducir apoptosis, para ello emplearon diferentes inmunocomplejos y obtuvieron que los PMN incubados con complejos antígeno-anticuerpo ayudaron a desencadenar apoptosis en comparación a controles, también se evaluó la inhibición del receptor Fc γ RII, hallando que, había una disminución notable en este tipo de muerte celular, lo que respalda un papel crítico de Fc γ RII en la apoptosis de neutrófilos.

Teniendo en cuenta que la fagocitosis y muerte celular de neutrófilos puede ser mediada por los anticuerpos a través de los FcR, es importante contar con antígenos candidatos a vacuna que generen una respuesta inmune humoral que contribuya a contrarrestar la micobacteria. En este sentido FIDIC desde el 2004, en el desarrollo de una vacuna sintética, se ha enfocado en la búsqueda de antígenos presentes en la envoltura de *Mtb* que participan en la interacción patógeno-hospedero⁴⁻²³. Para ello, se emplea una metodología que comprende desde una aproximación bioinformática, la posible ubicación de proteínas putativas en la envoltura del microorganismo, seguido de verificación de la presencia y transcripción del gen que codifique para la proteína de interés, tras lo cual se realiza la síntesis de secuencias peptídicas de 20 aminoácidos que cubren la secuencia de la proteína⁴⁻²³. Posteriormente se identifican cuáles de estos péptidos presentan alta capacidad de unión a células U937 (macrófagos derivados de monocitos) y A549 (células epiteliales alveolares tipo II) y por último se evalúa el rol de los péptidos en la entrada del bacilo a estas células, evidenciándose que la interacción dada entre célula-péptido puede inhibir la entrada de *Mtb*⁴⁻²³.

Finalmente, respecto al desarrollo de vacunas contra tuberculosis, Méndez-Samperio⁴¹ destaca la importancia de los neutrófilos para inducir respuesta inmune durante la vacunación, pues estas células participan en la inducción del perfil linfocito T (LT) ayudador (Th1) con producción de interferón gamma (IFN- γ), TNF- α , IL-12 y un perfil LT ayudador 17 (Th17) secretando IL-17. En el modelo murino, se ha visto que la participación de los neutrófilos, genera una respuesta protectora contra *Mtb* y que el agotamiento de los PMN inhibe la activación de Th1 y Th17, evidenciándose un aumento en la progresión de la enfermedad.

5. Marco Teórico

5.1. Generalidades de la tuberculosis

La TB ha afectado a la humanidad desde hace más de 150 millones de años, los primeros grandes avances científicos comenzaron a finales del siglo XVIII gracias a la observación clínica de pacientes, permitiendo que para el 24 de marzo de 1882 Robert Koch, médico y microbiólogo fuera el primero en aislar el bacilo tuberculoso, posteriormente descubrió una tinción especial para evaluar su presencia, elaboró medios de cultivo para su crecimiento e inyectó productos del bacilo en un animal previamente sensibilizado, lo que hoy en día, es la base de la reacción de hipersensibilidad retardada tipo IV, la cual corresponde a la induración observada en la prueba de tuberculina ^{35, 42}. En 1943 se dio a conocer el primer antibiótico contra la micobacteria, conocido como estreptomycin, derivado de *Streptomyces griseum* ^{35, 42}.

Cuando *Mtb* ingresa por vía aérea, se ubica en las partes altas y posteriores de los pulmones donde hay mayor ventilación; no obstante, también pueden afectar otras zonas, viajando por el torrente sanguíneo o linfoide ³⁵. El primer contacto con el bacilo, puede resultar en una resolución espontánea de infección, dar paso a la TBL o producirse la fase activa de la enfermedad que cursa sólo entre el 5-10% de las personas que entran en contacto con la micobacteria ^{35, 43}.

La manifestación clínica de la TB inicialmente es asintomática, pero si el hospedero es susceptible a la infección, el cuadro clínico dependerá del sitio que esté afectando. La TB pulmonar cursa con una sintomatología característica de fiebre, escalofríos, debilidad, fatiga, tos severa, hemoptisis, pérdida de peso y sudores nocturnos, no obstante la TB extrapulmonar puede asociarse a diversas patologías, debido a los diferentes órganos que puede llegar a afectar (Tabla 1) ⁴⁴.

Tabla 1. Síntomas de la TB extrapulmonar

SITIO DE INFECCIÓN	SINTOMATOLOGÍA
Ganglios linfáticos	Linfadenitis
Líquido pleural	Puede ser asintomática, pero en ocasiones cursa con la misma sintomatología de TB pulmonar y dolor torácico.
Sistema nervioso central	Meningitis (cefalea, fiebre, déficit neurológico), tuberculomas o abscesos cerebrales.
Huesos	Enfermedad de Pott (dolor en la columna), dolor en los huesos largos y osteomielitis.
Peritoneo	Dolor abdominal, fiebre, pérdida de peso, diarrea, ascitis, hepatomegalia y esplenomegalia.
Genitourinaria	Disuria, hematuria, inflamación pélvica y masas epididimales.
Corazón	Dolor torácico, tos, disnea, taquicardia, cardiomegalia y frotamiento de pericardio.

Modificado de *Diagnosis and treatment of tuberculosis: latest developments and future priorities*, 2017 ⁴⁴.

5.2. *Mycobacterium tuberculosis* y el complejo MTB

Mtb es una bacteria intracelular, aerobia estricta perteneciente a la familia *Mycobacteriaceae*, es un bacilo ácido alcohol resistente y tiene una longitud aproximada de 1 a 4 micras ⁴⁵. Su pared celular está compuesta por una capa externa y una interna, la capa externa contiene ácidos micólicos hidrófobos, que limita la entrada de los nutrientes y le confiere su lenta capacidad de crecimiento, además posee biomoléculas de manosa, lipomanano, lipoarabinomanano y manoglicoproteína, su capa interna está compuesta por arabinogalactano, fosfatidilmioinositol manósidos y peptidoglicano (Figura 1) ⁴⁶.

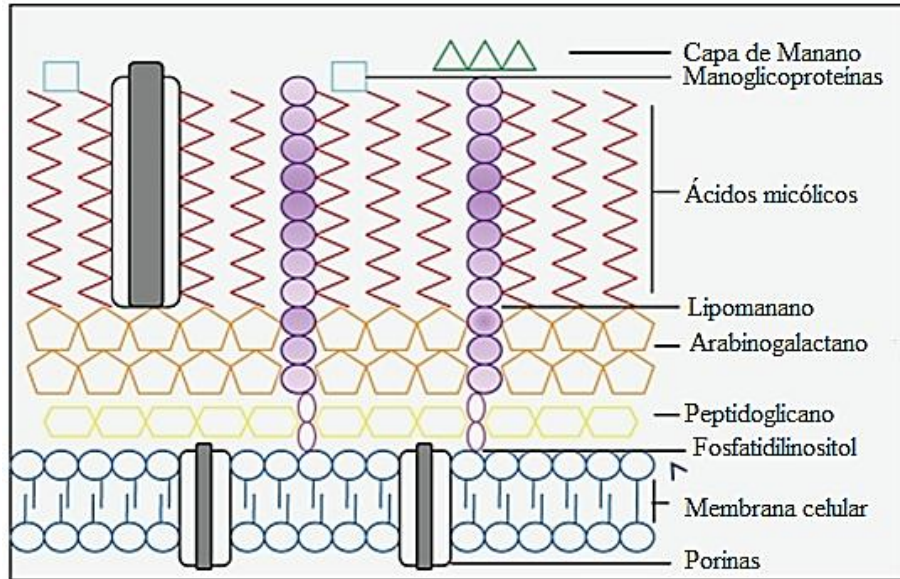


Figura 1. Pared micobacteriana. Modificado de *Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis*, 2011 ⁴⁶.

El complejo MTB es un grupo de especies genéticamente similares, que causan TB en animales y humanos, entre estas se encuentran *Mtb*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* y *M. caprae*. *Mtb* es el más importante debido a que ha causado la gran mayoría de los casos por TB en humanos, *M. bovis* afecta a humanos a través de leche contaminada proveniente de bovinos domésticos o salvajes y cabras, por otra parte *M. africanum* y *M. canetti* son responsables de un mínimo de casos en pacientes africanos, *M. microti* produce TB en roedores y está asociado a casos en pacientes inmunosuprimidos, *M. pinnipedi* origina la enfermedad en focas y *M. caprae* afecta a cabras ^{35, 47}.

5.3. Epidemiología de la tuberculosis

Para el año 2017, se reportaron 10 millones de casos por tuberculosis a nivel mundial, siendo la población masculina la más afectada ². El 87% de estos abarcan 30 países, siendo India (27%), China (9%), Indonesia (8%), Filipinas (6%), Pakistán (5%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) y Sudáfrica (3%) los países más afectados a nivel mundial (Figura 2) ². El 9% de los casos se

presentaron en personas coinfectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), siendo los países de la región Africana los que tienen mayor tasa de coinfección con VIH ². Para este mismo año se estimó un total de 1,3 millones de muertes por TB entre personas VIH negativas y adicional a esto 300.000 muertes entre personas VIH positivas ².

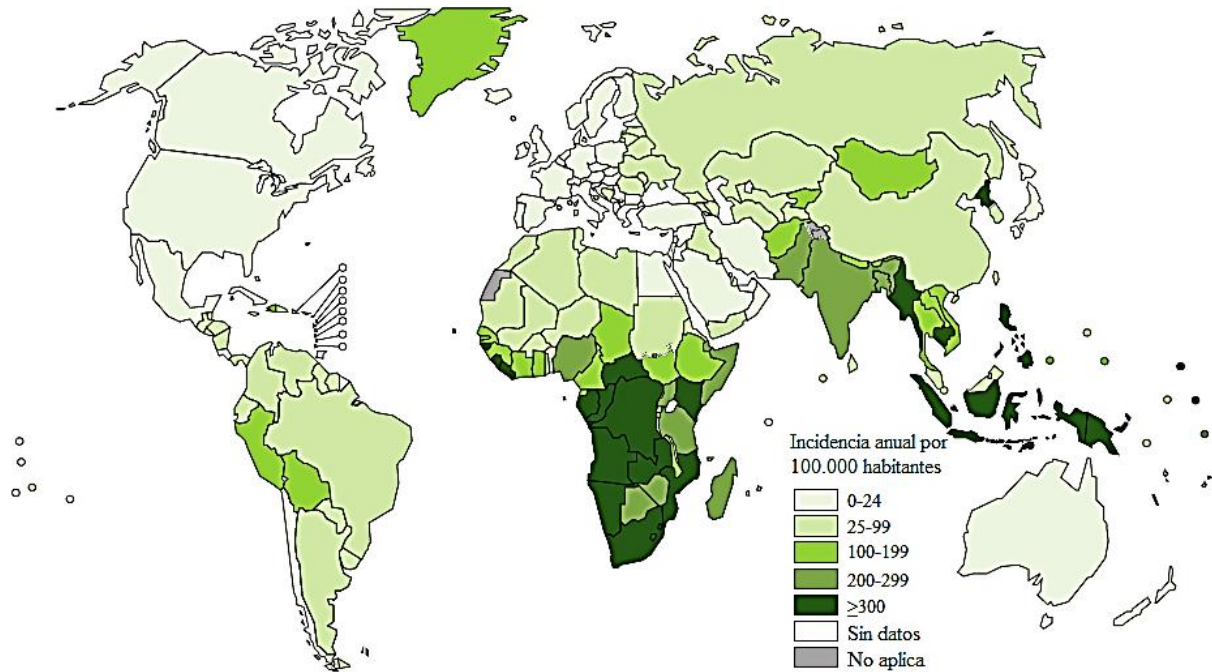


Figura 2. Tasas de incidencia a nivel mundial estimadas durante el 2017 para TB. Modificado de *Global Tuberculosis Report* ².

La tasa de incidencia en Colombia durante el 2017 fue de 26,3 casos por cada 100.000 habitantes (Figura 2), reportándose al SIVIGILA, un total de 16.000 casos entre TB pulmonar (82.6%) y extrapulmonar (17.4%) ³. Para el 2018 se reportó 14.338 casos de TB siendo Amazonas, Guainía, Risaralda, Barranquilla, Meta, Arauca y Casanare los territorios con mayor tasa de incidencia (Figura 3) ³.

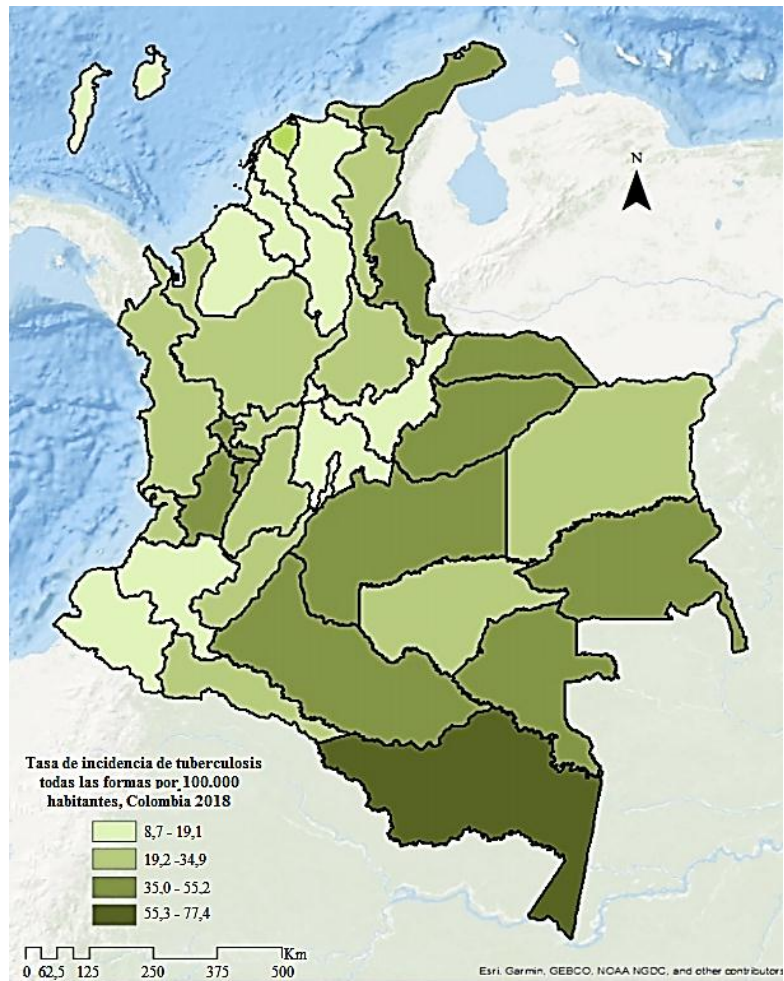


Figura 3. Tasas de incidencia de TB en Colombia estimadas en el 2018. Modificado del Instituto Nacional de Salud ³.

La resistencia a fármacos sigue siendo un obstáculo para el control de la TB, los países más afectados por micobacterias resistentes a antibióticos son China, India y la Federación Rusa².

5.4. Diagnóstico de la tuberculosis

El diagnóstico de la TB depende de criterios bacteriológicos, histopatológicos, clínicos, epidemiológicos, tuberculínicos y radiológicos; no obstante, los criterios bacteriológicos e

histopatológicos son parámetros confirmatorios del diagnóstico e indicativo para iniciar un tratamiento ⁴⁸.

5.4.1. Criterio bacteriológico

El criterio bacteriológico se realiza por medio de baciloscopia, cultivo y pruebas moleculares que confirmen la presencia de alguna de las especies del complejo MTB. La baciloscopia reporta el grado de infección de acuerdo a lo establecido por la OMS (Tabla 2), el examen tiene una duración de 3 días, que consiste en evidenciar por microscopía bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) mediante la coloración de Ziehl Neelsen, Kinyoun o auramina-rodamina. Posteriormente se realiza cultivo y se precisan 21 días para evidenciar el crecimiento bacteriano, actualmente se cuentan con medios a base de huevo (Ogawa-Kudoh, Lowenstein-Jensen), medios sintéticos (Middlebrook 7H10 y Middlebrook 7H9) y caldos con sensores de crecimiento (MGIT y MB/BacT). Después se realiza una fenotipificación del microorganismo causal, a través de la identificación de la proteína MPT64 o técnicas de PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*), y se reporta diagnóstico ^{49, 50}.

Tabla 2. Informe de resultados en la baciloscopia

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	Nº exacto de bacilos en 100 campos
Se observan de 10 a 99 BAAR en 100 campos observados	Positivo (+)
Se observan de 1 a 10 BAAR en 50 campos observados	Positivo (++)
Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados	Positivo (+++)

Tomado de Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, 2008 ⁵⁰.

5.4.2. Criterio histopatológico

El criterio histopatológico está comprendido por la biopsia de cualquier tejido que evidencie la presencia de granulomas con necrosis de caseificación activo y un Ziehl Neelsen positivo, este criterio debe correlacionarse con el resultado bacteriológico, de lo contrario se considera como un caso probable hasta que pueda ser confirmado por cultivo ⁴⁸⁻⁵⁰. El criterio clínico se presenta de acuerdo a la sintomatología y el criterio epidemiológico ve la posibilidad de haber estado en contacto con un individuo bacilífero ⁴⁸.

5.4.3. Criterio tuberculínico y prueba QuantiFERON

El diagnóstico puede ayudarse de los criterios tuberculínicos mediante la prueba cutánea de la tuberculina, que consiste en la inoculación intradérmica de un derivado de proteína purificada, una persona que tiene inmunidad celular a estos antígenos, reacciona con una induración en el sitio de aplicación que aparece de 48 a 72 h después ⁵¹. Por otra parte, también se puede realizar la prueba de QuantiFERON, un análisis de sangre completa basado en un ensayo inmunoenzimático ELISA (del inglés *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), que mide la liberación de IFN- γ por parte de LT, como respuesta a antígenos específicos del complejo MTB (ESAT-6, CFP-10 y TB7.7) el resultado informa la cuantificación de IFN- γ en unidades internacionales ⁵¹. El criterio radiológico es una prueba útil para constatar tuberculosis pulmonar junto con pruebas bacteriológicas o histopatológicas positivas ⁴⁸.

5.5. Tratamiento para la TB

El tratamiento para la TB consiste en la administración de diversos antibióticos de amplio espectro, por un periodo de entre 6 y 12 meses con un estricto seguimiento para evitar la resistencia a los múltiples fármacos; a pesar de su efectividad, los medicamentos que se administran pueden ser hepatotóxicos y pueden generar problemas renales y metabólicos ^{2, 52}.

Los antibióticos que se administran durante el tratamiento, comprenden fármacos de primera línea como isoniacida, rifampicina, estreptomina, etambutol y pirazinamida ^{2, 52}. Cuando hay

resistencia a los medicamentos de primera elección, se procede a realizar el tratamiento con medicina de segunda línea entre los que se encuentran fluoroquinolonas, capreomicina, protionamida, etionamida, kanamicina, rifabutina, ácido paraaminosalicílico, cicloserina, clofazimina y macrólidos ^{2,52}.

5.6. Respuesta inmune innata ante *Mycobacterium tuberculosis*

Al inhalar aerosoles que contienen bacilos viables, las barreras de la mucosa (células ciliadas, caliciformes y serosas) que se encuentran en el tracto respiratorio, interactúan con estas partículas externas, controlando el ingreso de agentes extraños, estas células secretan sustancias antimicrobianas en el fluido mucoso como son mucinas, defensinas, lisozima, óxido nítrico, entre otros ⁵³. Las defensinas pueden actuar sobre la envoltura de las micobacterias para matar directamente al bacilo y el tejido linfoide asociado a mucosas ayuda aglutinar invasores por la secreción de IgA, para facilitar su eliminación por medio de movimientos mucociliares ⁵³.

Una vez *Mtb* logra escapar de las barreras de la mucosa y llega a los alvéolos, la primera respuesta es ejercida por células residentes como las epiteliales alveolares, histiocitos y mastocitos, las cuales promueven el reclutamiento de células de la inmunidad innata, por la liberación de citoquinas quimioatrayentes y moléculas de adhesión; al reclutar células como macrófagos, DCs, NKs y neutrófilos, contribuyen en la formación del granuloma con el fin de eliminar y controlar el crecimiento micobacteriano ⁵⁴⁻⁵⁶.

Las células de la inmunidad innata llegan al sitio de infección y sensan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*), por medio de receptores que reconocen patrones (PRRs del inglés *Pattern Recognition Receptor*) como los tipo Toll (TLR del inglés *Toll-Like Receptor*), receptores tipo Nod (NLR del inglés *Nod-Like Receptor*) y receptores de lectina tipo C (CLR del inglés *C-Type Lectin Receptor*) ⁵⁴. Estas células a través de funciones que involucran la fagocitosis, autofagia, apoptosis y activación del inflamasoma, generan mecanismos de defensa que eliminan el bacilo, pero también puede constituirse en un ambiente ideal para la supervivencia de *Mtb* ⁵⁴.

La fagocitosis es un mecanismo de defensa celular que elimina a los microorganismos invasores, pero *Mtb* puede inhibir la maduración del fagosoma, es decir, no permite que se fusione la vesícula endocítica con el lisosoma, permitiendo que la micobacteria no esté expuesta a hidrolasas lisosomales, pH ácido y otros componentes bactericidas ⁵⁴. La autofagia es un proceso que involucra el reciclaje de los componentes citoplasmáticos dañados, proteínas y patógenos intracelulares, se caracteriza al igual que la fagocitosis por la formación de autofagosomas, que llegan al lisosoma y se degradan sin generar daño celular, pero se ha observado que *Mtb* puede inhibir la formación de autofagosomas, por consiguiente se vuelve un nicho ideal para su multiplicación o supervivencia, por otra parte, la apoptosis regula la respuesta inmune adaptativa, por medio de la eferocitosis, proceso que involucra a macrófagos y DCs, que reconocen cuerpos apoptóticos, sin embargo la micobacteria puede inducir necrosis, limitando la presentación de antígenos ⁵⁴. De otro modo, la activación del inflammasoma conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18 y posteriormente conduce a piroptosis, la cual termina en necrosis celular, aumentando el proceso inflamatorio ⁵⁴.

5.6.1. Células epiteliales alveolares

Las células epiteliales no son células de la inmunidad innata ni adaptativa, no obstante al encontrarse en el sitio de la infección, contribuyen al generar una respuesta inmunológica contra el bacilo ⁵⁴. *Mtb* llega a los sacos alveolares, y se deposita en células tipo I y tipo II, las primeras son encargadas del intercambio gaseoso y las segundas interactúan con el bacilo por el reconocimiento de PAMPs ⁵⁴. Las células tipo II no son fagocitos profesionales, pero la micobacteria puede ingresar a estas y conducir a una respuesta adaptativa mediante la eferocitosis por parte de los macrófagos residentes o de lo contrario, las células epiteliales pueden resguardar el bacilo, ofreciéndoles un ambiente favorable para su multiplicación y en consecuencia se evade la respuesta inmune ^{56, 57}.

Por otra parte, estas células producen biomoléculas relevantes en la inmunidad innata como proteínas del complemento, péptidos antimicrobianos, hidrolasas y lípidos surfactantes que ayudan al reclutamiento de células, fagocitosis y destrucción microbiana ⁵⁶. Secretan quimiocinas que contribuyen a la migración de células de la inmunidad innata, entre estas se encuentran CCL-2,

CCL-5, MMP-9 y GM-CSF, para el reclutamiento de macrófagos; el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β del inglés *Transforming Growth Factor Beta*), promueve la migración de monocitos, macrófagos; IL-8, CXCL-5 favorece el reclutamiento de monocitos, DCs, Linfocitos CD4⁺, neutrófilos y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1 del inglés *Intercellular Adhesion Molecule*) facilita la adhesión entre células alveolares ⁵⁶.

Además, el epitelio alveolar participa en la inducción de la respuesta inmune adaptativa por la expresión del MHC-I y II y la secreción de IFN- γ e IL-8, que promueve el reclutamiento de LT con el perfil Th1, importantes para la formación del granuloma ⁵⁶.

5.6.2. Macrófagos

Los macrófagos poseen mecanismos bactericidas como la producción de ROS, acidificación de fagosomas, autofagia, entre otras ^{54, 58}. Los macrófagos alveolares son las primeras células en fagocitar a *Mtb* por el reconocimiento de PAMPs, esto promueve el reclutamiento de otros macrófagos y la liberación de citoquinas pro inflamatorias como IFN- γ , IL-12, IL-1 β y MIP-1 α ⁵⁴. Estos fagocitos, tienen dos tipos de poblaciones M1 y M2 inducidos por señales del microambiente, los M1 son estimulados por antígenos microbianos (lipopolisacáridos), IFN- γ , TNF α y GM-CSF, son efectores contra patógenos intracelulares, producen citoquinas inmunoestimuladoras y son eficientes en la presentación de antígenos; en cambio la diferenciación a M2 es promovida por IL-4, IL-3, IL-10 y TGF- β , son presentadoras de antígenos ineficientes y supresores de la respuestas Th1, no obstante, estas poblaciones celulares son importantes en el balance entre una patología exacerbada y control del crecimiento micobacteriano ⁵⁴.

Durante la infección con *Mtb* se pueden reclutar macrófagos derivados de monocitos similares a los M2, células supresoras mieloides las cuales suprimen las respuestas de LT por IL-10, TGF- β y macrófagos espumosos que median la fagocitosis y generan mayor secreción de TGF- β ²⁵. Estas poblaciones de macrófagos ayudan en la formación y mantenimiento del granuloma tuberculoso ²⁵.

5.6.3. Células dendríticas (DCs)

Las DCs son células fagocíticas que reconocen PAMPs de *Mtb* y al igual que los macrófagos dan paso a la inmunidad adaptativa por la presentación de antígenos, mediante el MHC-I (CD8⁺) y MHC-II (CD4⁺)⁵⁷. Estas células secretan citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 e IL-12 en tejidos periféricos e interiorizan microorganismos a partir de diferentes mecanismos, por medio de PRR, macropinocitosis y endocitosis⁵⁹.

Las DCs derivadas de monocitos durante la infección con *Mtb* generan mayor producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, que contribuyen a la presentación de antígenos⁵⁹. Las células inmaduras que se encuentran en tejido pulmonar están listas para la captación y procesamiento de antígenos micobacterianos, posterior a la interacción con el patógeno, maduran y migran a tejido linfoide para estimular LT vírgenes, se ha evidenciado que *Mtb* puede inhibir la maduración de DCs, generando en éstas una expresión reducida de la integrina- β , una capacidad reducida de migración e induce a la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10^{54, 59}.

5.6.4. Células asesinas naturales (NKs)

Las NKs son linfocitos granulares con capacidad citolítica para lisar células infectadas con *Mtb* y reducir el crecimiento intracelular bacteriano, la función citotóxica está regulada por receptores de citotoxicidad natural de las NK (NKp30, NKp44 y NKp46) y receptores inhibitorios, que se localizan en la superficie de la membrana celular^{54, 60}. Estas células controlan el crecimiento micobacteriano de una forma directa e indirecta, la primera es dada por la producción de INF- γ , TNF- α e IL-22, la liberación de gránulos tóxicos que contienen perforina, granzima y mediante ligandos de superficie eliminan bacterias y células infectadas por vía apoptótica; la segunda, es generada por la activación de NADPH-oxidasa en macrófagos y otras células inmunitarias que conducen a la eliminación del microorganismo⁶⁰.

5.6.5. Neutrófilos

Los neutrófilos son las primeras células en infiltrarse desde el torrente sanguíneo hasta el pulmón, el proceso de migración desde los vasos sanguíneos hasta el tejido pulmonar, es generado por la liberación de citoquinas quimioatrayentes CXCL-1 y CXCL-8 producidas por células residentes del pulmón, como macrófagos, células alveolares y epiteliales ²⁴. El neutrófilo controla el crecimiento micobacteriano mediante la liberación de NETs y la fagocitosis micobacteriana por el reconocimiento de PAMPs ⁶¹. Al igual que otras células de la inmunidad innata son una fuente de citoquinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL20, CCL2, TNF- α , MIP-1 α - MIP-1 β , GM-CSF y MMPs que contribuyen al reclutamiento de células de la inmunidad innata, activación de linfocitos T perfil Th1 y Th17 y la formación del granuloma, con todo, la presencia de IFN- γ puede inhibir la activación de los neutrófilos y así mismo disminuir la producción de estas citoquinas ^{24, 25, 41}.

Generalmente la muerte celular de los neutrófilos se realiza mediante vías como la apoptosis (muerte celular programada tipo I), autofagia (muerte celular tipo II) y NETosis ²⁸. Durante la infección con *Mtb* se ha reportado que este induce a necrosis, generando un aumento en la producción de ROS que no tolera la célula, causando daños en moléculas importantes como lípidos, proteínas y ADN, que conducen a una muerte celular traumática caracterizada por el aumento del volumen celular, la liberación de patrones moleculares asociados al daño, ácido úrico, proteínas de choque térmico, componentes intracelulares, entre ellos orgánulos y microorganismos fagocitados ^{38, 62, 63}.

La apoptosis es dependiente de trifosfato de adenosina (ATP del inglés *Adenosine Triphosphate*), se caracteriza por generar cambios estructurales y morfológicos en la célula como fragmentación del ADN, exposición de fosfatidilserina en la superficie de membrana, disminución en el volumen celular pero manteniendo la integridad de sus componentes internos y la formación de fragmentos celulares como los cuerpos apoptóticos, que son reconocidos por los macrófagos ⁶³⁻⁶⁵. Este tipo de muerte celular puede darse por una vía de señalización intrínseca (dependiente de caspasas e independiente de caspasas) y extrínseca que culmina en la activación de caspasas efectoras. La vía intrínseca dependiente de caspasa (1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 14) es activada por el citocromo C, proteína que es liberada por las mitocondrias, la vía intrínseca independiente de caspasa, se da por la activación de proteínas pro-apoptóticas, anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (del inglés *B-Cell*

Lymphoma 2) y la concentración de Mcl-1 (del inglés *Myeloid Cell Leukemia-1*)^{38, 63}. En cuanto a la activación de la apoptosis por vía extrínseca (ligando FAS), es inducido por la activación de receptores apoptóticos como TNF- α /FasL que desencadenan un complejo de señalización inductor de muerte, que conduce a la activación del NADPH oxidasa y la escisión de la caspasa 8⁶³. Así mismo, la fagocitosis de microorganismos opsonizados a través del complemento o los FcR provoca la activación de caspasa 8 mediada por ROS y posteriormente activación de la caspasa 3 llevando a apoptosis celular⁶³.

La NETosis ayuda a atrapar y eliminar patógenos, este proceso se ha descrito de dos maneras, la primera se relaciona con muerte celular y es dependiente de ROS, implica la ruptura de la envoltura nuclear y descondensación de la cromatina, con lo cual se liberan al medio extracelular histonas, elastasas y proteínas antimicrobianas; y la segunda, no produce muerte celular, siendo independiente de oxidantes e involucra la condensación de los núcleos, lo que genera la separación de las membranas nucleares externas e internas sin producir una ruptura en la membrana celular⁴⁰. No obstante, durante la liberación de gránulos antimicrobianos genera destrucción de células vecinas y la disrupción del tejido⁶¹.

5.7. Respuesta inmune adaptativa ante *Mycobacterium tuberculosis*

Las células presentadoras de antígeno como DCs y macrófagos infectados, migran desde el pulmón hasta los ganglios linfáticos, permitiendo dar inicio a la respuesta adaptativa a través de la presentación de antígenos proteicos de *Mtb*, por medio de moléculas del MHC a LT CD4⁺ (MHC-II) y CD8⁺ (MHC-I)^{37, 43}.

5.7.1. Linfocitos T (LT)

Los LT presentan subconjuntos de células que se distinguen por sus funciones, entre ellas se encuentran LT citotóxicos (CD8⁺) y LT ayudadores (CD4⁺), estas células son activadas en nódulos linfáticos y migran hasta el pulmón durante la respuesta inmune adaptativa, liberan citoquinas

como IFN- γ en tejido pulmonar y durante la formación del granuloma, producen una respuesta protectora frente a *Mtb* ^{37, 66}.

Los CD4⁺ se pueden diferenciar en Treg productoras de IL-10 y TGF- β que restringen la función de LT efectoras ⁶⁶. El perfil Th1, involucrado principalmente en la protección frente al patógeno, estimula la maduración y activación de granulocitos y liberan citoquinas como TNF- α , IFN- γ , IL-2, linfotoxina y GM-CSF ⁶⁶. El perfil Th2 produce IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, estas células actúan principalmente en infección por patógenos extracelulares y se ha evidenciado que suprimen la respuesta de Th1 ⁶⁶. Los LT perfil Th17 son productoras de IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23, la IL-17 recluta neutrófilos, monocitos y LT CD4⁺ productoras de IFN- γ ⁶⁶.

Los CD8⁺ liberan una variedad de citoquinas como IL-2, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α y TGF- β , son capaces de reconocer antígenos de *Mtb* por vía clásica (MHC-I) y no clásica, esta última se da por medio del reconocimiento de moléculas de antígeno leucocitario y glicolípidos asociados a moléculas CD1 ⁶⁷. Los CD8⁺ tienen funciones citolíticas, liberan gránulos que contienen perforina, granzima, granulicina e interactúan con células infectadas promoviendo la apoptosis de estas, por medio de los receptores de células T y el MHC-I ⁶⁷.

5.7.2. Linfocitos B (LB)

Las células B, reconocidas por su habilidad de producir y secretar anticuerpos, se activan por antígenos timo dependientes y timo independientes, la respuesta timo dependiente requiere de la participación de LT, por el contrario la respuesta timo independiente se genera por antígenos que activan directamente a LB ⁶⁸. Los LB activados pueden diferenciarse en células efectoras tipo 1 y tipo 2 (Be1 y Be2), las cuales producen distintas citoquinas; los Be1 tienen la capacidad de secretar citocinas como IFN- γ e IL-12 para estimular respuestas del perfil Th1 y los Be2 secretan IL-4 para estimular perfil Th2 ⁶⁹.

Por último, los anticuerpos producidos por los LB, se caracterizan por tener dos regiones, dos fragmentos de unión a antígeno (Fab del inglés *fragment antigen-binding*) y una Fc, pueden constituirse como monómeros, dímeros o pentámeros y regulan funciones efectoras de las células de la inmunidad innata mediante los FcR. Durante la formación de complejos inmunes, los

anticuerpos (IgM, IgG, IgA e IgD) neutralizan al patógeno y regulan actividades como la inhibición de la formación de biofilms, producción de enzimas líticas y quimioatrayentes, citotoxicidad, opsonofagocitosis, estallido oxidativo, degranulación y en neutrófilos las IgA promueven la NETosis^{34, 68-70}.

5.8. Desarrollo de vacunas contra la tuberculosis

Actualmente se cuenta con doce candidatos a vacuna contra la tuberculosis, los cuales se pueden clasificar por su objetivo de uso: terapéutico, refuerzo, post-exposición, reemplazo o complemento de la BCG². De los doce candidatos a vacuna, ocho se basan en proteínas asociadas a virulencia presentes en la micobacteria (Ad5 Ag85A, AEC/BC02, ChAdOx185A-MVA85A, H4:IC31, H56:IC31, ID93 + GLA-SE, M72/AS01E, TB/FLU-04L), dos utilizan extractos bacterianos (RUTI[®] y *Vaccae*TM), MTBVAC es una cepa atenuada y VPM1002 es una vacuna recombinante. Ad5 Ag85A es un adenovirus serotipo 5 que expresa Ag85A, AEC/BC02 es una vacuna recombinante liofilizada que expresa Ag85B y una fusión de proteínas ESAT6-CFP10, ChAdOx185A-MVA85A consiste en un adenovirus de simio y un virus de viruela recombinante que expresan el antígeno 85A, H4:IC31 contiene una fusión de las proteínas Ag85B y TB10.4 formulada con IC31 como adyuvante, H56:IC31 es una vacuna que combina tres antígenos de *Mtb* las cuales son Ag85B, ESAT-6 y Rv2660c, ID93+GLA-SE posee cuatro antígenos de *Mtb* como Rv2608, Rv3619, Rv3620 y Rv1813, M72/AS01E combina dos antígenos de *Mtb* (32A y 39A) y TB/FLU-04L utiliza el virus de influenza como vector para expresar antígenos Ag85A y ESAT-6². Los candidatos a vacuna mencionados anteriormente todavía se encuentran entre las fases I y IIb de pruebas clínicas, en este momento solo se cuenta con dos candidatos a vacuna que están en ensayos clínicos (fase III), siendo *Vaccae*TM un candidato inmunoterapéutico y VPM1002 una vacuna recombinante a la que se le está evaluando la inmunogenicidad en neonatos, pacientes expuestos al VIH y la prevención de la recurrencia de la enfermedad en adultos².

Por otra parte, la FIDIC, en los últimos años ha trabajado en la búsqueda de antígenos provenientes de la envoltura de *Mtb*, su metodología se fundamenta en el uso de péptidos sintéticos los cuales presentan ventajas como que tienen propiedades físicas y químicas definidas, son de alta pureza,

libres de contaminantes como endotoxinas o subproductos de síntesis, secuencias análogas y se pueden obtener a un bajo costo con técnicas de laboratorio, permitiendo el acceso a poblaciones en vía de desarrollo ⁷¹. Dentro de las proteínas de interés para FIDIC se encuentran Rv0180c, Rv0227c, Rv0354c, Rv0679c, Rv1268c, Rv1411c, Rv1490, Rv1510c, Rv1911c, Rv1980c, Rv2004c, Rv2270, Rv2301, Rv2536, Rv2560, Rv2707, Rv2969c, Rv3166c, Rv3481c, Rv3494c, Rv3623, Rv3629c, Rv3630 Rv3587c, Rv3705c, Rv3763, Rv3804c y Rv3910, de las cuales han identificado secuencias de unión a receptores celulares y su relevancia en la inhibición de la entrada del patógeno a células hospederas ⁴⁻²³.

6. Metodología

6.1. Diseño metodológico

6.1.1. Tipo de investigación

Experimental, incluye elementos cualitativos y cuantitativos, como la recolección de datos para incorporar técnicas y procedimientos que ofrezcan resultados coherentes y contestar a una pregunta problema.

6.1.2. Universo

Neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv.

6.1.3. Población

Donantes QuantiFERON positivo y negativo.

6.1.4. Muestra

20 muestras de sangre periférica de los donantes

6.2. Técnicas y procedimientos

En la figura 4, se observa el resumen de la metodología para llevar a cabo la evaluación de la apoptosis en neutrófilos, infectados con *Mtb* H37Rv pre-opsonizada con IgG que reconocen péptidos derivados de proteínas de membrana.

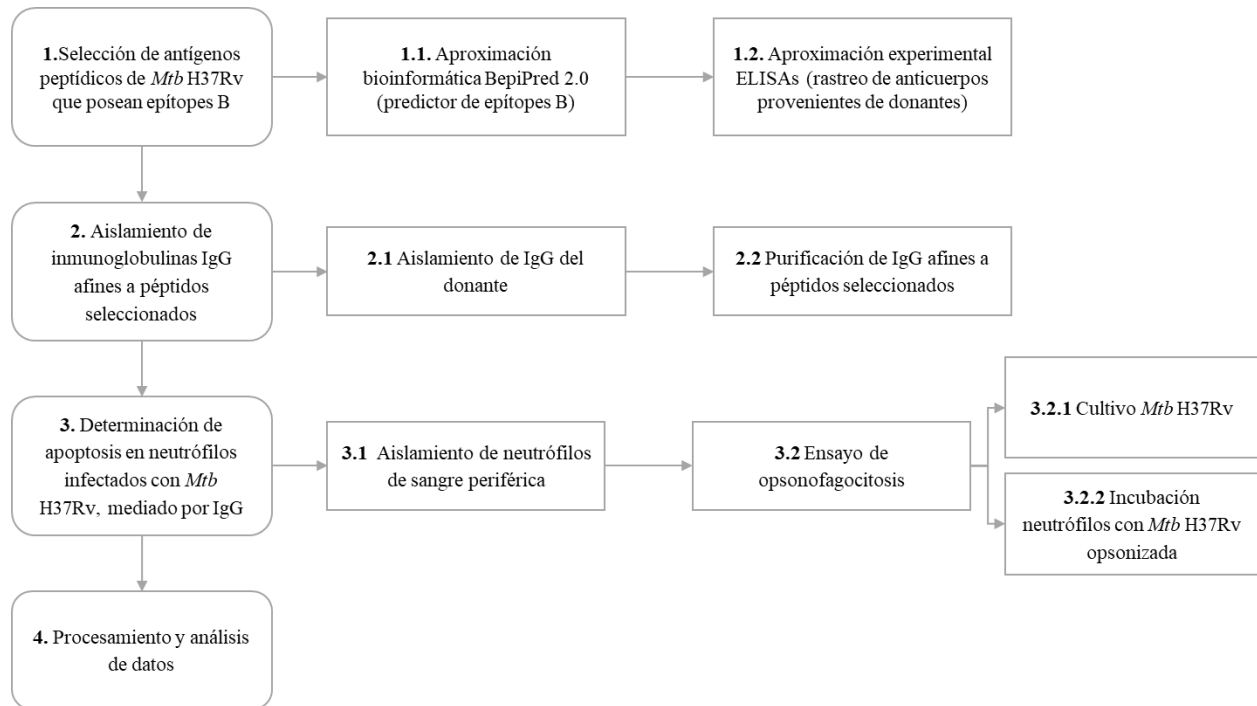


Figura 4. Resumen metodológico para evaluar la apoptosis en neutrófilos infectados por *Mtb* H37Rv.

6.2.1. Selección de péptidos

6.2.1.1. Aproximación bioinformática

La predicción de epítopes B lineales se determinó mediante el programa BepiPred 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>), predictor de epítopes B lineales, se identificaron las regiones con epítopes-B en 24 secuencias peptídicas definidas como HABPs (del inglés *High Activity Binding Peptides*), para cada secuencia, el servidor generó un puntaje de predicción y se

utilizó un umbral de 0.5 para definir el epítipo. Se consideraron los epítipes-B con una longitud de 5 a 20 residuos de aminoácidos.

6.2.1.2. Aproximación experimental

6.2.1.2.1. Obtención de sueros de Donantes

Se obtuvieron sueros provenientes de sangre periférica de 8 donantes, 4 de ellos han estado en contacto con *Mtb* (QuantiFERON positivo) y 4 no han estado en contacto con *Mtb* (QuantiFERON negativo). Los registros de la prueba de QuantiFERON Gold (Cellestis Limited) se encontraban en la base de datos de FIDIC. Se contó con los consentimientos informados de cada uno de los individuos para el uso de las muestras. (ANEXOS)

6.2.1.2.2. Búsqueda de anticuerpos IgGs afines a péptidos con epítipes B

Por medio de la técnica inmunoenzimática ELISA utilizando los sueros provenientes de los 8 donantes ⁷², se verificó la presencia de anticuerpos afines a péptidos que presentaron epítipes B por BepiPred 2.0. Los péptidos fueron sintetizados por el grupo funcional de Síntesis Química de la FIDIC, siguiendo la metodología de síntesis múltiple en fase sólida descrita por Merrifield *et al* ⁷³ y posteriormente modificada por Houghten *et al* ⁷⁴. Los antígenos peptídicos y el lisado de *Mtb* H37Rv se inmovilizaron a una concentración de 10µg/mL y se incubaron a 37°C durante dos horas, tras realizar lavados con Tween 20 al 0.5% en PBS, se agregó solución de bloqueo (Tween 20 al 0.5% y leche descremada al 5% en PBS) para evitar uniones inespecíficas, se incubó dos horas y se lavó nuevamente, después se adicionó el anticuerpo primario (sueros de los donantes) en una dilución de 1:25, se incubó durante 2 horas a 37°C y se lavó, posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario (Anti Human IgG - conjugado con peroxidasa) en una dilución de 1:10000, se incubó durante 1 hora a 37°C, después de lavar, se reveló con 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB), finalmente se detuvo la reacción con 50µl de ácido fosfórico (H₃PO₄) y se leyó en el espectrofotómetro (Multiskan GO, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 450nm.

6.2.2. Obtención de plasmas para purificación de inmunoglobulina G que reconocen péptidos seleccionados.

6.2.2.1. Purificación de IgG

Con el fin de aislar IgG total se inactivó el suero de un donante QuantiFERON negativo a 56°C por 30 minutos, inicialmente se precipitaron las proteínas que no correspondan a gammaglobulinas con ácido caprílico, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos, quedando en el sobrenadante las inmunoglobulinas. Después, la IgG se precipitó con sulfato de amonio saturado al 40% y se dejó en agitación 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 saturada 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.

6.2.2.2. Purificación de IgG péptido-específica

La purificación de IgGs que reconocían péptidos seleccionados, se realizó por cromatografía de afinidad mediante la unión del anticuerpo de interés a un péptido inmovilizado. Para ello se preparó una columna de Sefarosa 4B activada con Bromuro de Cianógeno (CNBr) a la cual se unieron 3 mg del péptido de interés en bicarbonato de sodio (0.1M pH 8.3), posteriormente, para bloquear posibles sitios de unión a aminos, 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 adicionó bicarbonato de sodio (pH 8.3) y a continuación, se dejó pasar la muestra que contenía la IgG por la columna. 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 con Tris HCl 0.1M para evitar la desnaturalización del anticuerpo ⁷⁵. Las gammaglobulinas se concentraron en Amicon (membrana 100.000 NMWL, Da) por centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C ⁷⁵.

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 concentración de 10µg/mL y se incubaron a 37°C por 10 minutos, se realizaron 3 lavados con

Tween al 0,5 en PBS y se bloquearon los sitios de unión con solución de bloqueo (Tween al 0,5 % y leche descremada al 5% en PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavó y se adicionó la inmunoglobulina en una dilución de 1:100. Luego de incubar durante 10 minutos a 37°C, se realizaron 3 ciclos de lavado, se agregó el anticuerpo secundario (anti-human conjugado con fosfatasa) en dilución 1:5000, se incubó durante 1 hora a 37°C y se reveló con 6.6 µl de NBT (del inglés *Nitro Blue Tetrazolium*) y 3.3 BCIP (del inglés *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate*). Las inmunoglobulinas aisladas se cuantificaron por µDrop (T^M Plate, Thermo Scientific), utilizando 2µl de muestra, la lectura se realizó (Multiskan GO, Thermo Scientific) a una absorbancia de 280nm y la concentración se obtuvo en µg/mL utilizando el coeficiente de extinción molar de la IgG en la fórmula:

$$\text{Concentración de anticuerpo en mg/L} = \text{Abs} \times 10000 \times \frac{13.7}{280}$$

Dónde:

Abs = Absorbancia de la muestra.

10000 = Constante (una absorbancia equivale 10000 mg/L del anticuerpo).

13.7 = Coeficiente de extinción molar de la IgG.

280 = Longitud de onda utilizada en la lectura.

6.2.3. Ensayos de fagocitosis en neutrófilos mediada por anticuerpos

6.2.3.1. Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica

Se recolectaron 12 mL de sangre periférica de un donante QuantiFERON negativo, en tubos heparinizados, los cuales se centrifugaron a 2700 rpm durante 7 minutos a 20°C, luego de separar la fracción del *Buffy-coat* este se resuspendió en PBS 1x y se adicionó al Ficoll-Histopaque en proporción 2:1, posteriormente se centrifugó a 550 g durante 30 minutos a 20°C, la capa intermedia entre los eritrocitos y Ficoll-Histopaque (que contiene los PMN y algunos glóbulos rojos), se resuspendió en PBS y para eliminar el Ficoll-Histopaque, se realizaron dos lavados a 1800 rpm durante 5 minutos a 20°C. Para eliminar la contaminación por glóbulos rojos se adicionó *buffer* de lisis (NH₄Cl:1.5M, NaHCO₃:0.1M y Na₂EDTA:0.01M), se realizaron dos lavados con PBS 1x y las células se resuspendieron en 3 mL de medio RPMI suplementado con suero bovino al 10% ⁷⁶.

77.

La pureza celular se midió, marcando las células con el anticuerpo CD16b (FcγR111b) marcados con ficoeritrina (PE del inglés *Phycoerythrin*) (BD Pharmingen™) específico para neutrófilos y se observó la morfología a través de la coloración por Giemsa. La viabilidad se visualizó con Azul de Tripán en cámara de Neubauer.

6.2.3.2. Ensayo de opsonofagocitosis

6.2.3.2.1. Cultivo de *Mtb* H37Rv

Se utilizó *Mtb* H37Rv (ATCC 25618), que fue transformada con el plásmido pMN437, el cual contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP del inglés *Green Fluorescent Protein*) y el *cassete* de resistencia a higromicina, se cultivó a 37°C en aerobiosis, durante 30 días en Middlebrook 7H9, suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina bovina, dextrosa y catalasa) e higromicina, hasta obtener una densidad óptica a 600nm entre 0.5-1.0, después se cosechó centrifugando a 13000 rpm durante 20 minutos a 20°C, se resuspendió en PBS y se guardó a -20°C, para su posterior uso⁷⁸. El manejo de la micobacteria se hizo en un laboratorio de bioseguridad BSL-3 (del inglés *Biosafety Level-3*), por lo tanto, todos los ensayos, se realizaron cumpliendo las normas de bioseguridad adecuadas para el manejo de la cepa⁷⁸.

6.2.3.2.2. Opsonofagocitosis de *Mtb* H37Rv

Se incubó 1×10^8 *Mtb* H37Rv con 30µl de los anticuerpos aislados a 37°C, durante una hora en agitación continua. Considerando una multiplicidad de infección (MOI) 1:10 relación neutrófilos-micobacteria, el cual se adoptó después de evaluar diferentes MOIs (1:1, 1:3 y 1:10). La micobacteria pre-opsonizada se puso en contacto con 1×10^5 neutrófilos por pozo en cajas de 96 fondo redondo y se permitió la fagocitosis por 18 horas a 37°C. Para descartar la micobacteria no fagocitada, se pasaron las muestras a tubos eppendorf de 0.6 mL y se centrifugaron a 2500rpm durante 5 minutos a 10°C, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.5%. Para analizar el porcentaje de fagocitosis por citometría de flujo (BD FACSCanto II) se seleccionó la población celular teniendo en cuenta su complejidad y tamaño, y se identificaron las células que tenían en su interior *Mtb* H37Rv por medio de la GFP. Se realizaron extendidos en

láminas para ver morfología celular por microscopía electrónica ⁷⁹ y se evaluó la apoptosis en células no infectadas para determinar la apoptosis basal, teniendo en cuenta que se ha evidenciado este fenómeno en PMN no infectados ²⁹. Se contó con un control de infección (neutrófilos incubados con micobacteria no opsonizada). Todos los ensayos se realizaron con 6 réplicas: un triplicado para citometría y otro triplicado para microscopía.

El porcentaje de fagocitosis se determinó por citometría de flujo, cuantificando el porcentaje de células que presentaban la micobacteria GFP y la muerte celular se evaluó por morfología con tinción de Giemsa ^{29, 79}.

6.2.4. Procesamiento y análisis de datos

Los datos obtenidos por citometría de flujo se procesaron en el software *FlowJo* y el análisis estadístico para evidenciar diferencias entre tratamientos, se realizó con el programa Excel por medio de la prueba T-pareada.

7. Resultados

7.1. Selección de péptidos provenientes de proteínas de la envoltura de *Mtb* H37Rv

Inicialmente se contó con 24 péptidos pertenecientes a 15 proteínas de la envoltura de *Mtb* (Tabla 3), los cuales fueron estudiados por la FIDIC, en donde se encontró su alta capacidad de unión a células U937, A549 y así mismo de inhibir la entrada de *Mtb* H37Rv a estas mismas células hospederas. Para estos péptidos se identificaron regiones denominadas epítopes B, que variaron de 5 hasta 13 residuos de aminoácidos (Tabla 3).

Tabla 3. Predicción de epítopes B en péptidos provenientes de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv.

Proteína	Péptido	Secuencia del péptido	BepiPRED 2.0 Umbral 0.5	Aminoácidos del epítope
Rv0180c	31024	AALYLGGILNPMTNLRHFPI	11 16 PMTNLR	6
	31025	GPAGQQIVDGLVSGLDKNKF	6 17 QIVDGLVSGLDK	12
	31039	LGLPSAGATVPLEAVPAFFRY	6 17 AGATVPLEAVPA	12
	31028	RDFGASAVTPTRTRDRAITIIY	5 17 ASAVTPTRTRDRA	13
Rv0227c	16951	PRLGSAQPPPPDAGHPDPG	6 16 AQPPPPDAGH	11
Rv0679c	30987	YKNGDPTIDNLGAGNRINKE	5 17 DPTIDNLGAGNRI	13
Rv1268c	37964	AVALGLASPADAAAGTMYGD	8 16 SPADAAAGT	9
Rv1411c	37096	PDFNATQPVPATVWIQE	5 11 ATQPVPA	7
Rv1490	11073	FGRVESHADYHDWVCEHVTP	5 15 ESHADYHDWVC	11
Rv1911c	37763	MESPMSTLHRTPLATAGLAY	7 17 STLHRTPLATA	11
	37765	YVPKATTVDATTPAPAAEPL	7 16 TVDATTPAPA	10
	37767	GANVAPPLTWSSPAGAAELAY	7 17 PLTWSSPAGAA	11
Rv1980c	36827	TQIQMSDPAYNINISLPSYY	5 9 MSDPA	5
	31107	IVQGELSKQTGQQVSIAPNAY	5 17 ELSKQTGQQVSI	13
Rv2004c	9111	AGYAVRSGDTAPASLRDFYI	5 17 VRSGDTAPASLRD	13
Rv2270	37775	TSSNGARGGIASNMNPTNPY	7 18 RGGIASNMNPT	12
	37777	ETWINLQVGDTLADLPPADLY	6 17 LQVGDTLADLPP	12
	37780	GFAPYTGQSVDTSPYSVAYL	5 16 YTGQSVDTSPYS	12
Rv2301	30960	CPNTRLVPGGYSLGAAVTDV	6 15 LVPGGYSLGA	10
Rv2560	11024	VVALSDRATTAYTNTSGVSS	5 17 SDRATTAYTNTSG	13
Rv2707	16084	RIGVGTTTYSSSTAQHSAA	6 17 TTYSSSTAQHSA	12
Rv3166c	16298	MERELSHVPGVAPQDFDPTY	5 17 LSHVPGVAPQDFD	13
	16300	VSLFAEARFSPHVMNEEHREY	6 18 EARFSPHVMNEEH	13
Rv3494c	38373	HMRLNSGTAIPSNVTATVRSY	5 17 NSGTAIPSNVTAT	13

La primera columna muestra las proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv estudiadas en FIDIC y los péptidos provenientes de las mismas, además se observa la secuencia peptídica con el respectivo epítope B. Los números en superíndice indican la posición del aminoácido en el péptido.

Para continuar con la metodología planteada, se detectaron en los sueros de 8 donantes (4 QuantiFERON positivo y 4 QuantiFERON negativo) inmunoglobulinas IgG afines a los 24 péptidos evaluados; teniendo en cuenta el umbral establecido por el blanco de reactivos como 0.054, todos los donantes reconocieron los péptidos, los individuos QuantiFERON positivo tuvieron mayor reconocimiento respecto a los QuantiFERON negativo del lisado de *Mtb* H37Rv y de los péptidos 31025 (Rv0180c), 31039 (Rv0180c), 37964 (Rv1268c), 37096 (Rv1411c), 37765 (Rv1911c), 37767 (Rv1711c), 31107 (Rv1980c), 37780 (Rv2270), 16084 (Rv2707), 16298 (Rv3166c) y 38373 (Rv3494c). El péptido 38373 de la proteína Rv3494c permitió diferenciar estadísticamente de forma significativa a los dos grupos de estudio ($P=0.034$) (Figura 5).

Se escogieron los péptidos que presentaron una absorbancia mayor o igual a 0.6, entre los que se encuentran aquellos que reconocieron al lisado de *Mtb* H37Rv y a 9 secuencias peptídicas (31025, 31039, 30987, 37964, 37765, 31107, 37780, 16300 y 38373) este umbral de selección se escogió con el fin de tener suficiente anticuerpo para poder desarrollar los ensayos correspondientes. Con el fin de aislar las inmunoglobulinas séricas (IgG) que reconocieron a los péptidos seleccionados, se escogió el suero de un individuo QuantiFERON negativo, considerando la disponibilidad del mismo para donar la cantidad de muestra necesaria para la estandarización de los procedimientos a seguir (Figura 5).

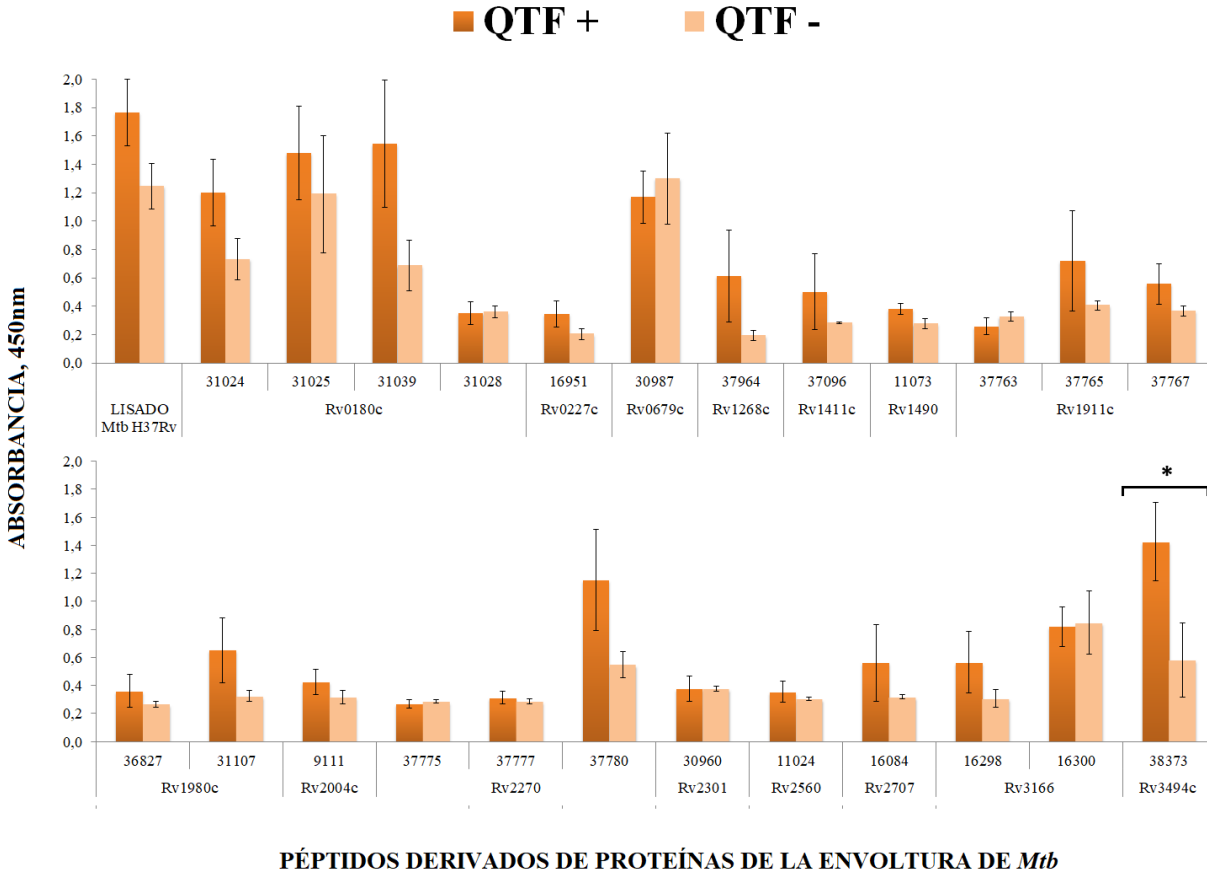


Figura 5. Reconocimiento de sueros provenientes de donantes frente a péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv. Se evidencia las absorbancias promediadas para 4 donantes QuantiFERON positivo (QTF +) y 4 donantes QuantiFERON negativo (QTF -) respecto a los péptidos evaluados. Diferencia estadísticamente significativa con el péptido 38373 (* P=0.034) entre los donantes QTF + y QTF -.

7.2. Purificación de inmunoglobulina G que reconocen péptidos específicos

Con el fin de estandarizar por conteo manual, la apoptosis en neutrófilos mediada por IgG, se aislaron y purificaron inmunoglobulinas séricas isotipo G de un donante QuantiFERON negativo (los resultados individuales por donante se consignan en el anexo). Todos los anticuerpos purificados, mantuvieron el reconocimiento por el lisado de *Mtb* H37Rv y los péptidos a los cuales reconocían (Figura 6).

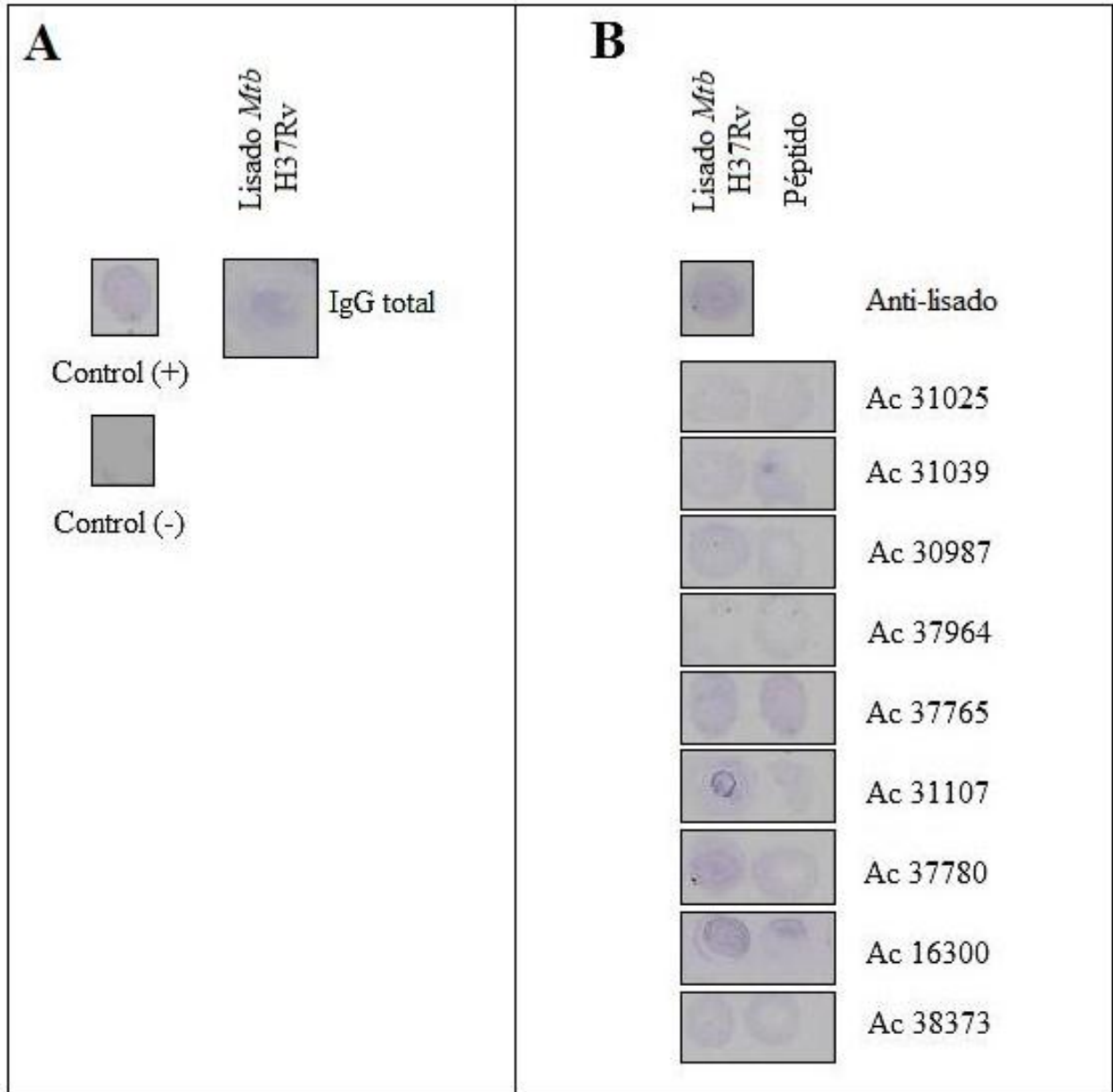


Figura 6. Aislamiento y purificación de IgG que reconocen péptidos seleccionados. (A) IgG total, aislada de suero de un donante QTF - (B) anticuerpo péptido-específico purificado por cromatografía de afinidad. Como control positivo se utilizó el lisado de *Mtb* H37Rv y suero de conejo hiperinmune 1:10000, para el control negativo es utilizó albumina de suero bovino (BSA del inglés *Bovine Serum Albumin*). Las IgGs purificadas se denominan Ac acompañadas del código del péptido al cual reconocen

En la cuantificación se evidenció que el 10% de las proteínas aisladas del donante corresponden a las inmunoglobulinas isotipo G, a partir del cual se obtuvo un rango de IgG péptido-específica entre 0.43-1.70%. Además, se determinó que el 6.7% de las IgGs totales del donante reconocen péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* (Tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación de Inmunoglobulinas purificadas

		Concentración (µg/mL)	Rendimiento (%)
Proteínas total en suero		37028	
IgG total aislada		3703	10
IgG péptido- específica	31025	23.0	0.62
	31039	19.8	0.53
	30987	16.9	0.46
	37964	32.9	0.89
	37765	20.8	0.56
	31107	16.1	0.43
	37780	30.1	0.81
	16300	25.4	0.69
	38373	63.0	1.70

7.3. Apoptosis de neutrófilos

La metodología estandarizada permitió aislar en promedio 8×10^6 neutrófilos (Figura 7A), con un porcentaje de viabilidad del 95-99% y una pureza del 95%, en la figura 7B se observaban los neutrófilos con un núcleo multilobulado y un citoplasma rosado, la pureza fue confirmada por citometría de flujo utilizando un anticuerpo dirigido al receptor CD16b (FcγRIIIb), que se encuentra exclusivamente en los neutrófilos (Figura 7C).

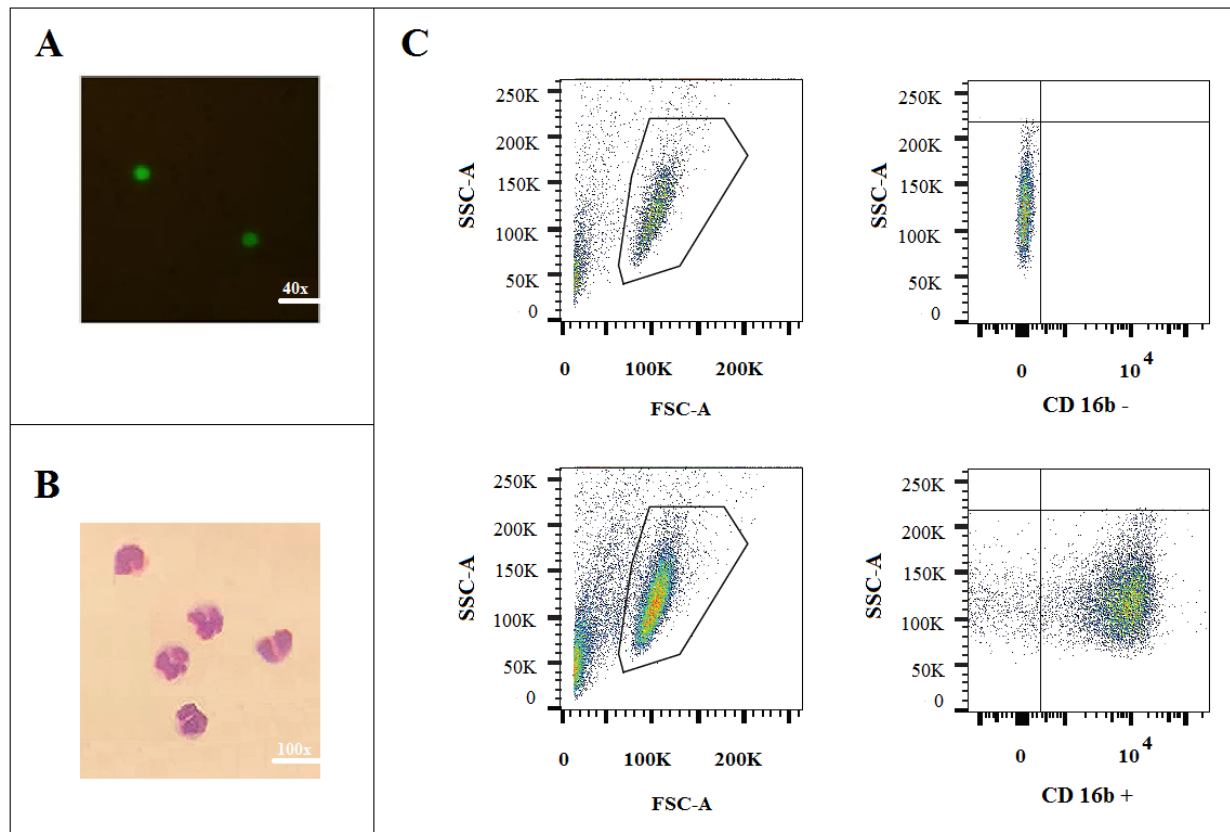


Figura 7. Análisis de neutrófilos aislados de sangre periférica. (A). Neutrófilos observados en cámara de Neubauer con naranja de acridina, 40x. (B). Neutrófilos con coloración de Giemsa, 100x (C). En el panel superior se observan células sin CD16b-PE (FcyRIIIb) y en el panel inferior neutrófilos marcados con CD16b-PE (FcyRIIIb).

En la figura 8A y B se observa la estandarización del MOI de infección, se evaluó el porcentaje de neutrófilos que fagocitaron la micobacteria por citometría de flujo, encontrándose que el MOI 1:10 presentó el mayor porcentaje de fagocitosis (25%), por lo tanto se escogió para realizar los posteriores ensayos³⁸. Finalmente se estandarizó la evaluación de la apoptosis por morfología celular, realizándose extendidos en láminas con neutrófilos previamente infectados y fijados que se colorearon con Wright pero los PMN presentaron una morfología indefinida (Figura 8C), por ende la apoptosis evaluada por microscopía, se estandarizó fijando los neutrófilos en lámina por calor y posteriormente coloración de giemsa (Figura 9).

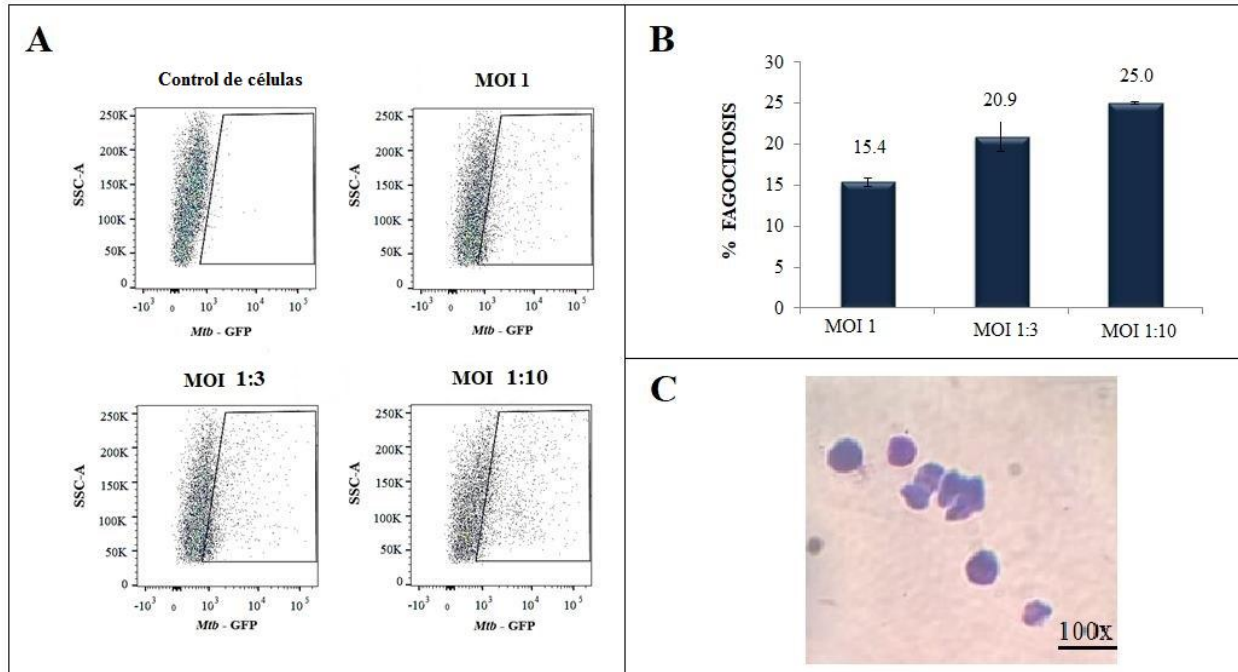


Figura 8. Estandarización MOI de infección y tinción de neutrófilos infectados. (A) Porcentaje de fagocitosis evaluado mediante citometría de flujo, se utilizó un control de células no infectadas y otras infectadas en MOIs 1, 3 y 10. (B) Análisis estadístico del porcentaje de fagocitosis la cual se evaluó por triplicado. (C) Neutrófilos previamente infectados, fijados con paraformaldehído al 4%, glutaraldehído al 0.5% y coloreados con Wright.

En neutrófilos recién aislados, células incubadas durante 18h (apoptosis basal) y en neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv, se evidenció apoptosis con porcentajes de 5, 84.2 y 58% respectivamente, en la figura 9 se puede observar a los PMN con morfología que indica apoptosis, caracterizada por tener el núcleo condensado con pérdida de estructura nuclear multilobular.

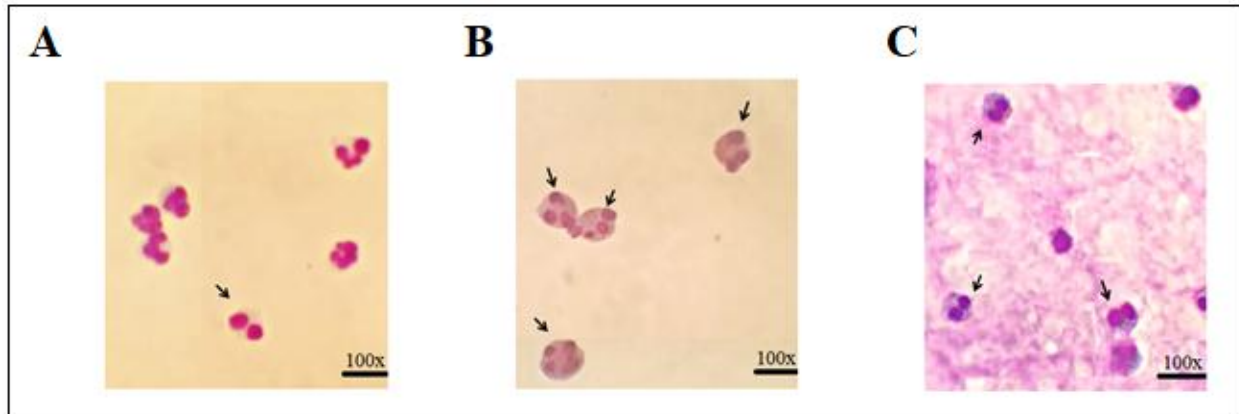


Figura 9. Neutrófilos en apoptosis. (A) Células recién aisladas (B) PMN 18horas pos-aislamiento (Apoptosis basal) (C) Neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv. Las flechas señalan los PMN en apoptosis.

Al evaluar la apoptosis en neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv pre-opsonizada, las inmunoglobulinas que reconocen el lisado de *Mtb* y a los péptidos 37964, 37765, 31107, 16300 y 38373 aumentaron el porcentaje de apoptosis con respecto al control de infección; adicionalmente se demostró un aumento estadísticamente significativo con las IgG específicas al anti-lisado ($P=0.017$) y al Ac38373 ($p=0.047$) (Figura 10A). Por otra parte, la opsonofagocitosis con los anticuerpos Ac31025, Ac31039, Ac30987 y Ac37780 redujeron la apoptosis (Figura 10A), y se encontró que prevalecieron morfologías relacionadas a otros tipos de muerte celular distintas a la apoptosis como necrosis donde se evidencia restos celulares y desintegración de la membrana nuclear y celular (Figura 10B) y NETs donde se observa un núcleo descondensado dispersado en el citoplasma (Figura 10C) ^{29,40}.

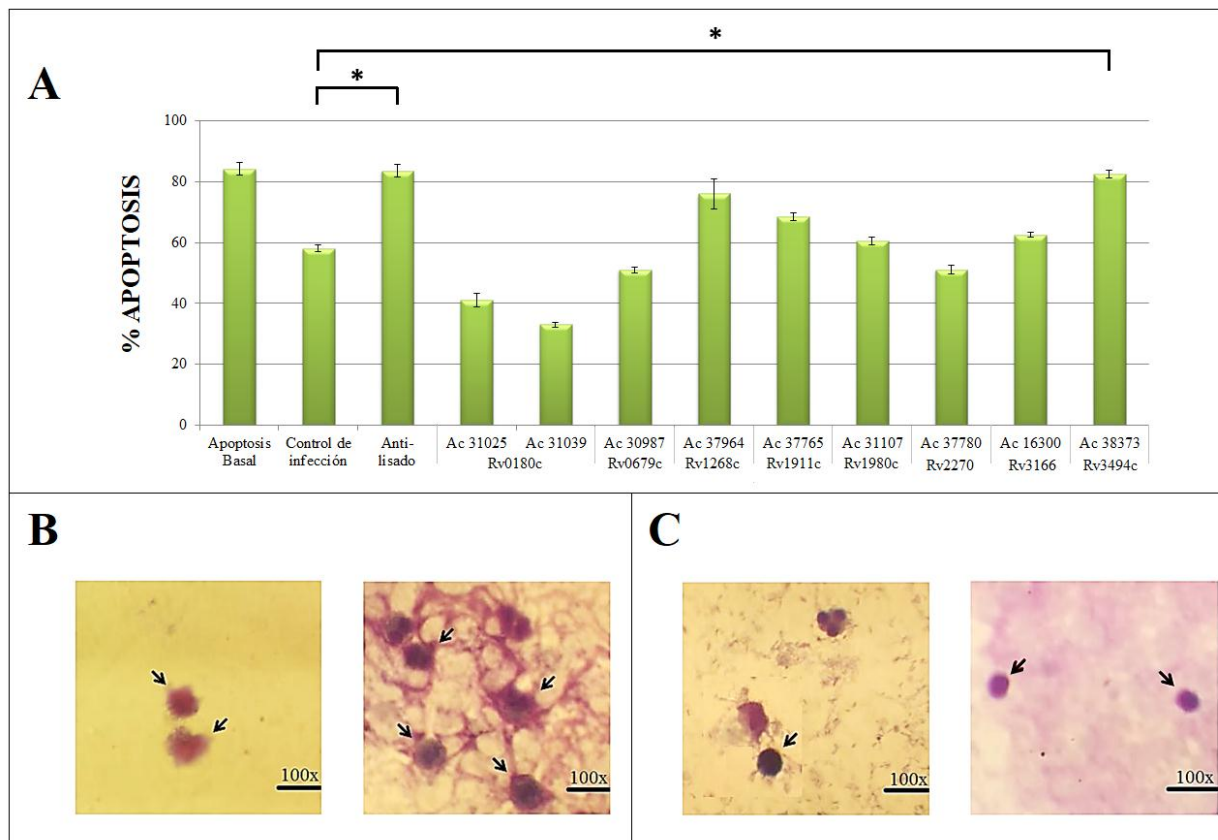


Figura 10. Muerte celular de neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv pre-opsonizada con IgG péptidos-específicos. (A) Porcentaje de neutrófilos en apoptosis, infectados y no infectados con *Mtb* H37Rv. (B) Las flechas señalan PMN en necrosis infectados con *Mtb* H37Rv pre-opsonizada (C) Las flechas indican células en NETosis. * $P \leq 0.05$

Finalmente, se analizó la fagocitosis en neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv. En la figura 11A se observa el desplazamiento de la población celular infectada con el patógeno sin pre-opsonizar, la cual presentó una fagocitosis de 25.6%, que aumentó a un 32,5% tras opsonizar con el anticuerpo 30987.

En la figura 11B se presenta el porcentaje de apoptosis y fagocitosis de los diferentes tratamientos con respecto al control de infección, frente al cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los anticuerpos Ac30987 ($P=0.004$), Ac37765 ($P=0.003$), Ac 16300 ($P=0.000$) y Ac38373 ($P=0.010$), que incrementaron el porcentaje de infección al igual que la apoptosis a excepción del Ac30987 quien no produjo el mismo efecto en cuanto a la apoptosis. Por otra parte, los anticuerpos que reconocen el lisado de *Mtb* H37Rv y los péptidos 37964, 31107 y 37780 no

promovieron la fagocitosis pero si aumentaron la apoptosis celular, en cambio las IgG 31025 y 31039 redujeron los procesos de fagocitosis como apoptosis (Figura 11B).

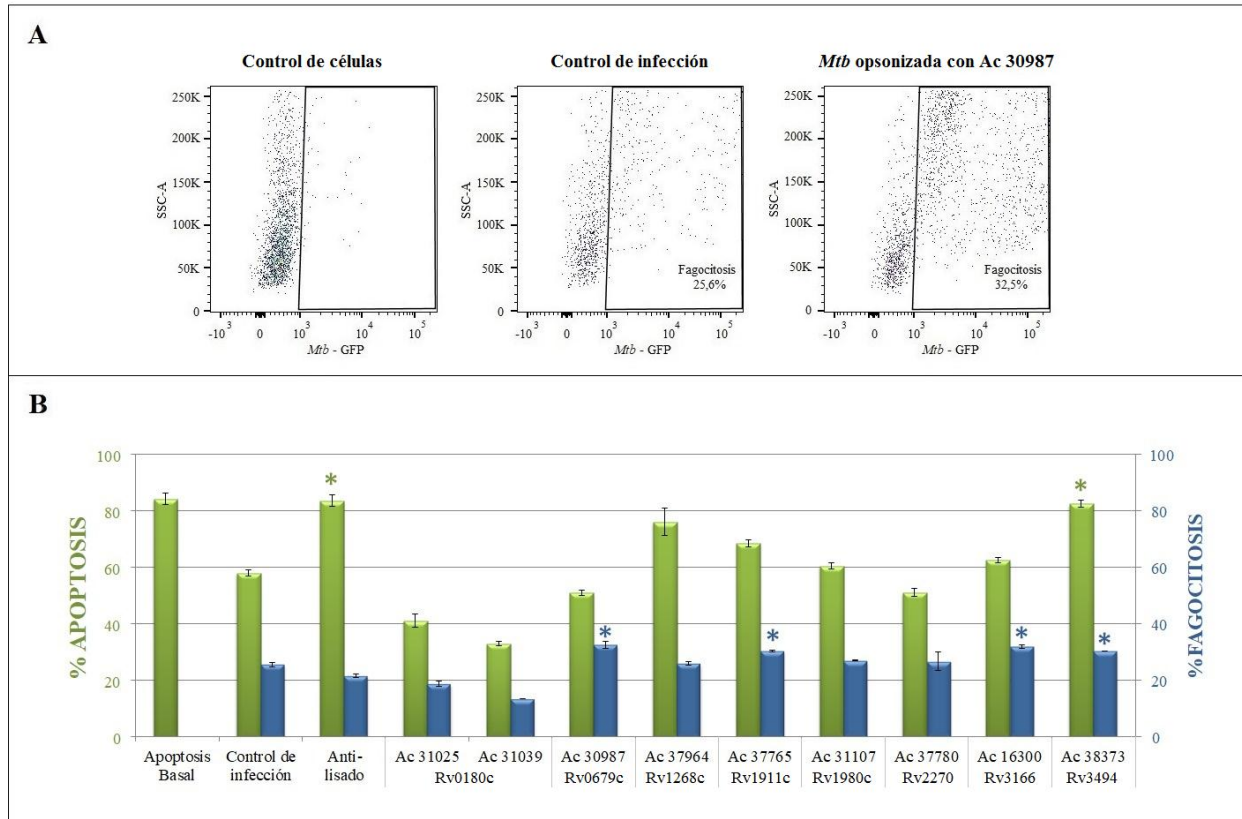


Figura 11. Fagocitosis y apoptosis de neutrófilos con *Mtb* H37Rv pre-opsonizada. A) Porcentaje de infección evaluada por citometría B) Análisis del porcentaje de fagocitosis y apoptosis en neutrófilos con *Mtb* H37RV pre-opsonizada con anticuerpos péptido-específicos. Las líneas indican el umbral de apoptosis y fagocitosis encontradas en el control de infección. Diferencias significativas en la apoptosis con respecto al control de infección (* P: ≤ 0.05). Diferencias significativas en la fagocitosis con respecto al control de infección (* P: ≤ 0.01).

8. Discusión

La TB sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial y aunque actualmente se cuenta con la vacuna BCG esta no previene la forma activa de la enfermedad en adultos, además los fármacos antituberculosos, producen problemas hepatotóxicos en los pacientes y el mal uso de los antibióticos ha traído con ello la aparición de cepas multidrogasresistente, por lo tanto es indispensable buscar nuevas alternativas que contribuyan a controlar la enfermedad siendo la vacunación la más eficiente según la OMS ^{2, 52}.

En vista de lo anterior, es necesaria la formulación de una vacuna eficiente que favorezca la erradicación de la enfermedad, para ello la FIDIC ha buscado antígenos promisorios, donde se ha encontrado que inmunogenicidad no se traduce necesariamente en protección; es así como en la FIDIC se usa un enfoque funcional en donde se consideran péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb*, estos péptidos interactúan con células U937 y A549 inhibiendo la entrada de *Mtb* ^{5, 7, 8, 10-17, 19, 20, 22}; no obstante, es necesario evaluar su inmunogenicidad y su posible acción en el sistema de respuesta inmune innata, debido a que este es importante para dar paso a la respuesta inmune adaptativa protectora.

Los neutrófilos son un grupo de células que hacen parte de la respuesta inmune innata contra *Mtb* y son las células que predominan en muestras de lavado broncoalveolar y de esputo en pacientes con TBA ^{24, 80}. En los últimos años estos PMN han sido estudiados, de modo que su participación durante la respuesta inmune, puede ser alterada por la patogenicidad y virulencia que posee la micobacteria; no obstante, estas células son capaces de eliminar microorganismos, favorecer la presentación antigénica y suprimir el proceso inflamatorio sin ocasionar daño tisular, mediante la apoptosis, pero durante la infección con *Mtb*, se puede producir otras formas de muerte en los neutrófilos como la necrosis y NETs, promoviendo la liberación de gránulos citotóxicos y proteolíticos que afectan a células del microambiente ^{24-26, 28-31, 38, 64, 81-84}.

De tal manera, este trabajo tuvo como objetivo evaluar si las IgGs que reconocen péptidos específicos, podrían mediar la apoptosis en neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv, considerando los beneficios que este tipo de muerte celular desencadena durante el proceso inflamatorio. Para ello, se seleccionaron péptidos provenientes de proteínas de la envoltura de *Mtb* Rv0180c (31024,

31025, 31039, 31028), Rv0227c (16951), Rv0679c (30987), Rv1268c (37964), Rv1411c (37096), Rv1490 (11073), Rv1911c (37763, 37765, 37767), Rv1980c (36827, 31107), Rv2004c (9111), Rv2270 (37775, 37777, 37780), Rv2301 (30960), Rv2560 (11024), Rv2707 (16084), Rv3166c (16298, 16300) y Rv3494c (38373) ^{5, 7, 8, 10-17, 19, 20, 22}.

Teniendo en cuenta que las secuencias peptídicas contenían epítopes B, se determinó si existía diferencia en el reconocimiento de los péptidos por parte de los sueros de personas que, según la prueba de QuantiFERON, han estado expuestas a *Mtb* de las personas que no. Los resultados de la ELISA revelaron que los donantes que no han estado en contacto con *Mtb*, es decir los donantes QuantiFERON negativo, poseen anticuerpos específicos contra los péptidos analizados, sin embargo se debe considerar que la prueba de QuantiFERON mide la respuesta celular frente a antígenos exclusivos del complejo MTB, que no necesariamente tiene una relación estrecha con la respuesta inmune humoral evaluada en la ELISA ^{85,87}.

Respeto a lo anterior, es relevante destacar que existen especies de micobacterias ambientales como *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. smegmatis*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* y *M. szugai*, que no hacen parte del Complejo MTB y se ha reportado que las proteínas de las cuales se derivan los péptidos aquí estudiados, también se presentan en estas micobacterias ^{5, 7, 8, 10-17, 19, 20, 22}, por lo tanto si los individuos QuantiFERON negativo seleccionados para el presente estudio, estuvieron en contacto con estas micobacterias, probablemente se pudo generar reconocimiento frente a los antígenos evaluados. Por otra parte, estos resultados son similares a los reportados por Li H et al.⁸⁶ y Lu LL et al.⁸⁷ donde personas negativas para la prueba de liberación de IFN- γ reconocen antígenos de *Mtb*.

Es de resaltar que los dos grupos estudiados respondieron diferencialmente a los péptidos evaluados, encontrándose el mayor reconocimiento para los individuos QuantiFERON positivo, en 11 de los 24 péptidos evaluados, siendo el péptido 38373, con el cual se pudo evidenciar una diferencia estadísticamente significativa entre los donantes QuantiFERON positivo y negativo, lo anterior es un dato relevante, dado que dicho péptido podría ser un marcador para diferenciar personas que han estado en contacto de las que no con *Mtb*, para esto es necesario rectificar el comportamiento del péptido con una cohorte más grande con respecto a la utilizada en el estudio.

La técnica utilizada para aislar las IgGs que reconocieron los péptidos 31025, 31039, 30987, 37964, 37765, 31107, 37780, 16300 y 38373, fue adecuada ya que en el Dot blot se evidenció que los anticuerpos mantuvieron la funcionalidad en su fracción Fab, debido a que hubo reconocimiento antigénico del lisado y los péptidos, y así mismo en la región Fc, dado que las inmunoglobulinas anti-human acopladas a peroxidasa utilizadas en el inmunoensayo, reconocieron esta región del anticuerpo. Por otra parte, tras la cuantificación de las IgGs, se encontró una cantidad apreciable de inmunoglobulinas péptido-específicas correspondiente al 6.7% de IgG total, lo cual da cuenta de la exposición del donante a micobacterias como se había mencionado anteriormente, en tanto que esta inmunoglobulina es un marcador de memoria frente a la exposición previa de antígenos ^{85,87}.

Igualmente se aislaron neutrófilos de sangre periférica optimizando la metodología de Böyum ⁷⁶, aunque algunos autores usan el DEXTRAN para el aislamiento de los PMN, en el presente trabajo se aislaron los neutrófilos como lo describe Andersson et al. ⁷⁷, en donde omite el uso del reactivo, siendo esto una ventaja para aislar los PMN en menos tiempo, adicionalmente se disminuye el estrés celular, ya que durante el procedimiento los neutrófilos pueden inducirse a apoptosis; de este modo se obtuvieron células con un porcentaje de viabilidad y pureza similar a los descritos por otros autores ^{39, 65, 77}.

En este sentido la metodología utilizada para evaluar la apoptosis por morfología celular también ha sido usada por Perskvist N et al. ⁷⁹, estos autores compararon la apoptosis obtenida por conteo manual con la apoptosis evaluada por Anexina V, siendo estos resultados muy semejantes. En el presente trabajo la apoptosis fue evaluada por conteo manual, los datos revelaron que la apoptosis en los neutrófilos infectados con *Mtb* H37Rv, podría ser mediada por anticuerpos péptido-específicos, que reconocían antígenos presentes en la envoltura de la micobacteria. Al infectar los PMN con una cepa virulenta de *Mtb*, la apoptosis se redujo en comparación con la basal correspondiente a células sin infectar, por lo tanto lo anterior puede ser relacionado a las investigaciones realizadas por varios autores, que han evidenciado que neutrófilos infectados con *Mtb* pueden morir por necrosis y NETs ^{29-31, 38}.

Al opsonizar la micobacteria con las IgGs purificadas, el porcentaje de apoptosis aumentó con las inmunoglobulinas G que reconocen el lisado de *Mtb* H37Rv y a los péptidos 37964, 37765 y 38373, estos podrían ser considerados para posteriores estudios, que permitan generar una respuesta

inmune protectora basada en la producción de anticuerpos contra estos péptidos. Por el contrario, la opsonofagocitosis con los anticuerpos 31025 y 31039 los cuales disminuyeron significativamente el porcentaje de apoptosis conlleva a evaluar si las IgG podrían mediar otro tipo de muerte en los neutrófilos como lo ha descrito Aleyd et al.⁴⁰ con la IgA, que induce la liberación de NETs.

Los resultados obtenidos con las inmunoglobulinas Ac16300, Ac30987, Ac38373 y Ac37765 confirman lo descrito por diferentes autores que han demostrado que al opsonizar *Mtb* con suero, la fagocitosis aumenta en los PMN, siendo esto importante para generar una respuesta inmune protectora^{38, 39}. Por el contrario, se evidenció un efecto distinto con las IgGs que reconocen los péptidos 31025 y 31039 que disminuyeron el porcentaje de fagocitosis, este comportamiento también ha sido descrito por Zimmermann et al.⁸⁸, quienes utilizaron anticuerpos monoclonales IgA, en este mismo estudio se describió que la fagocitosis puede ser dependiente de isotipos, además que la función protectora que generan los anticuerpos, puede depender del antígeno al que van dirigidos y del tipo de célula hospedera, por lo cual se sugiere para este trabajo, evaluar qué función efectora puedan presentar las inmunoglobulinas que fueron aisladas, aumentando la cohorte de donantes para determinar si estos anticuerpos dirigidos a los péptidos 31025 y 31039 podrían tener función neutralizante.

Finalmente, cabe resaltar que la estandarización del procedimiento para evaluar la apoptosis en neutrófilos mediada por anticuerpos péptido-específicos, consignado en el presente, permitirá evaluar una posible respuesta protectora en futuros antígenos peptídicos propuestos por la FIDIC como candidatos para hacer parte del diseño de una vacuna sintética contra tuberculosis, considerando que los neutrófilos durante el desarrollo de la respuesta inmune innata contribuyen mediante la apoptosis celular a la resolución de la infección evitando el daño tisular, así mismo también ayudan a generar una respuesta inmune adaptativa, ya que los cuerpos apoptóticos que contienen antígenos micobacterianos son reconocidos por macrófagos, lo cual favorecen en la eliminación de la micobacteria.

9. Conclusiones

- Los 24 péptidos pertenecientes a 15 proteínas de la envoltura de *Mtb* presentaron epítopes B y fueron reconocidos tanto por donantes QuantiFERON negativos como positivos.
- Los sueros de los donantes QuantiFERON positivos tuvieron mayor reconocimiento por la mayoría de los péptidos analizados en comparación con los donantes negativos. De manera particular, el péptido 38373 de la proteína Rv3494c presentó diferencias estadísticamente significativas entre los donantes QuantiFERON positivos y negativos.
- La técnica utilizada para aislar IgG de sangre periférica pudo mantener la funcionalidad de las fracciones Fab y Fc de las inmunoglobulinas, la cual fue evidenciada a través del Dot blot realizado posterior al aislamiento de los anticuerpos.
- Las IgGs que reconocen el lisado de *Mtb* H37Rv y los péptidos 37964, 37765, 31107, 16300 y 38373, podrían conducir a la apoptosis de neutrófilos infectados con *Mtb* opsonizada, de forma que dichos péptidos podrían contribuir de alguna forma a generar una respuesta inmune protectora.
- La estandarización que se llevó a cabo para obtener los anteriores resultados, permitirán evaluar los futuros candidatos peptídicos que se obtengan en la FIDIC para el diseño de una vacuna contra tuberculosis

10. Recomendaciones

- Considerar el uso de la Anexina V, dado que esta metodología alterna confirma los datos obtenidos de la apoptosis por conteo manual.
- Aumentar el número de individuos con el fin de determinar el comportamiento de los anticuerpos que modularon la apoptosis en los neutrófilos, igualmente, se podría considerar evaluar si estas inmunoglobulinas poseen isotipos específicos que ayudan a generar esta muerte celular.
- Realizar co-cultivos con macrófagos para evaluar si la apoptosis en neutrófilos promueve la presentación antigénica protectora contra la TB.

11. Referencias

1. Bozzano F, Marras F and De Maria A. Immunology of tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014; 6.
2. WHO. World Health Organization: Global Tuberculosis report 2018.
3. INS. Instituto Nacional de Salud: Boletín epidemiológico semana 11 del 2019.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Plaza DF, Curtidor H, Patarroyo MA, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* membrane protein Rv2560--biochemical and functional studies. *FEBS J*. 2007; 274: 6352-64.
9. Patarroyo MA, Plaza DF, Ocampo M, et al. Functional characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv2969c membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 372: 935-40.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Dallenga T and Schaible UE. Neutrophils in tuberculosis--first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? *Pathog Dis*. 2016; 74.
25. Warren E, Teskey G and Venketaraman V. Effector Mechanisms of Neutrophils within the Innate Immune System in Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Clin Med*. 2017; 6.

26. Lyadova IV. Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way? *Mediators Inflamm.* 2017; 2017: 8619307.
27. Quinn TM, DeLeo, F.R. *Neutrophil Methods and Protocols*. Humana Press 2da ed. 2014.
28. Geering B and Simon HU. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* 2011; 18: 1457-69.
29. Dallenga T, Repnik U, Corleis B, et al. M. tuberculosis-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. *Cell Host Microbe.* 2017; 22: 519-30 e3.
30. Braian C, Hoge V and Stendahl O. *Mycobacterium tuberculosis*- induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *J Innate Immun.* 2013; 5: 591-602.
31. Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009; 89: 29-37.
32. Gamberale R, Giordano M, Trevani AS, Andonegui G and Geffner JR. Modulation of human neutrophil apoptosis by immune complexes. *J Immunol.* 1998; 161: 3666-74.
33. Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, et al. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell.* 2016; 167: 433-43
34. Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM and Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol.* 2017; 18: 46-61.
35. Farga V and Caminero JA. *Tuberculosis*. . Mediterraneo 3ra ed. 2011.
36. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol.* 2001; 1: 20-30.
37. Bozzano F, Marras F and De Maria A. Immunology of tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014; 6: e2014027.
38. Corleis B, Korbel D, Wilson R, Bylund J, Chee R and Schaible UE. Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. *Cell Microbiol.* 2012; 14: 1109-21.
39. Hilda NJ and Das S. Neutrophil CD64, TLR2 and TLR4 expression increases but phagocytic potential decreases during tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2018; 111: 135-42.
40. Aleyd E, van Hout MW, Ganzevles SH, et al. IgA enhances NETosis and release of neutrophil extracellular traps by polymorphonuclear cells via Fc α receptor I. *J Immunol.* 2014; 192: 2374-83.

41. Mendez-Samperio P. Commentary: The Role of Neutrophils in the Induction of Specific Th1 and Th17 during Vaccination against Tuberculosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7: 179.
42. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L and Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017; 58: E9-E12.
43. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ and Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31: 475-527.
44. Kumar K and Kon OM. Diagnosis and treatment of tuberculosis: latest developments and future priorities. *Annals of Research Hospitals.* 2017; 1.
45. Sua LF, Fernández, L. Tuberculosis miliar o diseminada. *Revista Colombiana de Neumología.* 2015; 27: 208 - 10.
46. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG and Van Crevel R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol.* 2011; 2011: 405310.
47. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffre A, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence.* 2013; 4: 3-66.
48. INS. Instituto Nacional de Salud. Tuberculosis: Protocolos de vigilancia y salud publica 2016.
49. INS. Instituto Nacional de Salud. Guía para la vigilancia por laboratorio de tuberculosis. 2017.
50. OPS. Organización Panamericana de Salud. MANUAL para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis 2008.
51. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, et al. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27: 3-20.
52. Garcia R, Lado FL, Bastida V, Pérez ML and Ortiz A. Tratamiento actual de la tuberculosis. *An Med Interna.* 2003; 20: 91-100.
53. Li W, Deng G, Li M, Liu X and Wang Y. Roles of Mucosal Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Tuberc Res Treat.* 2012; 2012: 791728.
54. Liu CH, Liu H and Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cell Mol Immunol.* 2017; 14: 963-75.
55. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12: 352-66.
56. Scordo JM, Knoell DL and Torrelles JB. Alveolar Epithelial Cells in *Mycobacterium tuberculosis* Infection: Active Players or Innocent Bystanders? *J Innate Immun.* 2016; 8: 3-14.

57. Lerner TR, Borel S and Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol.* 2015; 17: 1277-85.
58. McClean CM and Tobin DM. Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases. *Pathog Dis.* 2016; 74.
59. Mihret A. The role of dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Virulence.* 2012; 3: 654-9.
60. Allen M, Bailey C, Cahatol I, et al. Mechanisms of Control of *Mycobacterium tuberculosis* by NK Cells: Role of Glutathione. *Front Immunol.* 2015; 6: 508.
61. Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, et al. Neutrophil Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Genetically Susceptible and Resistant Mice. *Infection and Immunity.* 2005; 73: 1744-53.
62. Cummings BS and Schnellmann RG. Measurement of cell death in mammalian cells. *Curr Protoc Pharmacol.* 2004; Chapter 12: Unit 12 8.
63. Driss EK, János, G.F. Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through $\beta 2$ integrins. *Front Immunol.* 2013; 4: 1-15.
64. Tan BH, Meinken C, Bastian M, et al. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol.* 2006; 177: 1864-71.
65. Andersson H, Andersson B, Eklund D, et al. Apoptotic neutrophils augment the inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in human macrophages. *PLoS One.* 2014; 9.
66. Dheda K, Schwander SK, Zhu B, van Zyl-Smit RN and Zhang Y. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology.* 2010; 15: 433-50.
67. Lin PL and Flynn JL. CD8 T cells and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Semin Immunopathol.* 2015; 37: 239-49.
68. Kozakiewicz L, Phuah J, Flynn J and Chan J. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 783: 225-50.
69. Abebe F and Bjune G. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp Immunol.* 2009; 157: 235-43.
70. Rao M, Valentini D, Poiret T, et al. B in TB: B Cells as Mediators of Clinically Relevant Immune Responses in Tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2015; 61Suppl 3: S225-34.

71. Ocampo M, Patarroyo MA, Vanegas M, Alba MP and Patarroyo ME. Functional, biochemical and 3D studies of *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides for an effective anti-tuberculosis vaccine. *Crit Rev Microbiol*. 2014; 40: 117-45.
72. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bulletin of the World Health Organization*. 1976; 54: 129-39.
73. Merrifield R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a tetrapeptide *Journal of the American Chemical Society*. 1963; 85: 2149-54.
74. Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82: 5131-5.
75. Amersham Biosciences Limited. CNBr-activated Sepharose 4B. 2002, p. 1-12.
76. 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.
77. Andersson AM, Larsson M, Stendahl O and Blomgran R. Efferocytosis of Apoptotic Neutrophils Enhances Control of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-Coinfected Macrophages in a Myeloperoxidase-Dependent Manner. *J Innate Immun*. 2019: 1-13.
78. Larsen MH, Biermann, K, Jacobs, W.R. Laboratory Maintenance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Protocols in Microbiology*. 2017; 6: 10A. 1. 1-A. 8.1.
79. Perskvist N, Long M, Stendahl O and 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. *J Immunol*. 2002; 168: 6358-65.
80. Eum SY, Kong JH, Hong MS, et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest*. 2010; 137: 122-8.
81. Blomgran R, Desvignes L, Briken V and Ernst JD. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell Host Microbe*. 2012; 11: 81-90.
82. Kroon EE, Coussens AK, Kinnear C, et al. Neutrophils: Innate Effectors of TB Resistance? *Front Immunol*. 2018; 9: 2637.
83. Lowe DM, Redford PS, Wilkinson RJ, O'Garra A and Martineau AR. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends Immunol*. 2012; 33: 14-25.
84. Velmurugan K, Chen B, Miller JL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathog*. 2007; 3: e110.

85. Lu LL, Smith MT, Yu KKQ, et al. IFN-gamma-independent immune markers of *Mycobacterium tuberculosis* exposure. *Nat Med.* 2019; 25: 977-87.
86. Li H, Wang, X.X, Wang B, et al. Latently and uninfected healthcare workers exposed to TB make protective antibodies against *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* 2017: 5023--8
87. Lu LL, Smith, M.T., Yu KKQ³, Luedemann C², Suscovich TJ², Grace PS², Cain A², Yu WH^{2,4}, McKittrick TR⁵, Lauffenburger D⁴, Cummings RD⁵, Mayanja-Kizza H⁶, Hawn TR³, Boom WH⁷, Stein CM^{7,8}, Fortune SM^{1,2}, Seshadri C⁹, Alter G¹⁰. IFN- γ -independent immune markers of *Mycobacterium tuberculosis* exposure *Nat Med.* 2019; 25: 977-87.
88. Zimmermann N, Thormann V, Hu B, et al. Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO Mol Med.* 2016; 8: 1325-39.

12. Anexos

Plantilla de consentimientos informados (Versión 01 de Noviembre 13 de 2018)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

No. _____

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC

“Evaluación *in vitro* de antígenos candidatos a vacuna contra tuberculosis”

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

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

INFORMACIÓN AL PACIENTE

Justificación y objetivos de la investigación

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

El objetivo de este proyecto es determinar si su sistema de defensa, o inmune, reconoce partes de la bacteria que produce la tuberculosis para que después se puedan usar esas partes en el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad.

Procedimiento

Si usted es mayor de 18 años y está de acuerdo en participar en este estudio, se le solicitará la donación de 53 mL de sangre de la vena de su brazo. La sangre será tomada por personal de la salud especializado, a partir de una única toma.

Una vez obtenida la muestra de sangre en 5 tubos heparinizados de 10mL y tres tubos especiales para la prueba del quantiFERON (1 mL por tubo), ésta será procesada por personal del laboratorio de investigaciones con el fin de alcanzar los propósitos antes descritos.

Molestias o Riesgos

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

Beneficios

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

Se le dará por escrito el resultado de la prueba del quantiFERON®. Recuerde una prueba positiva no significa que necesariamente tenga tuberculosis, sin embargo es una información valiosa para su médico tratante.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

Por lo anterior estando en pleno uso de mis facultades acepto participar voluntariamente en este estudio y autorizo la toma de 53mL de sangre firmando este documento:

SI____

NO____

Apellidos

Nombres

Firma

Documento de identidad

C.C.

Tel:

Testigos:

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

Apellidos y Nombres

Firma del **Testigo 1**

C.C.

Dirección:

Teléfono:

Relación con el Paciente:_____

Apellidos y Nombres

Firma del **Testigo 2**

C.C.

Dirección:

Teléfono:

Relación con el Paciente:_____

Firma del Investigador que administra el consentimiento

Bogotá, DC, día____, del mes de _____, del año_____.

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