



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



## Estudiantes

Juan Sebastian Gomez Camargo  
Daniela Alejandra Galeano Orjuela

## Trabajo de Grado

Para optar por el título de Bacteriólogos y Laboratoristas Clínicos

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia  
FIDIC



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



## **Directora de tesis:**

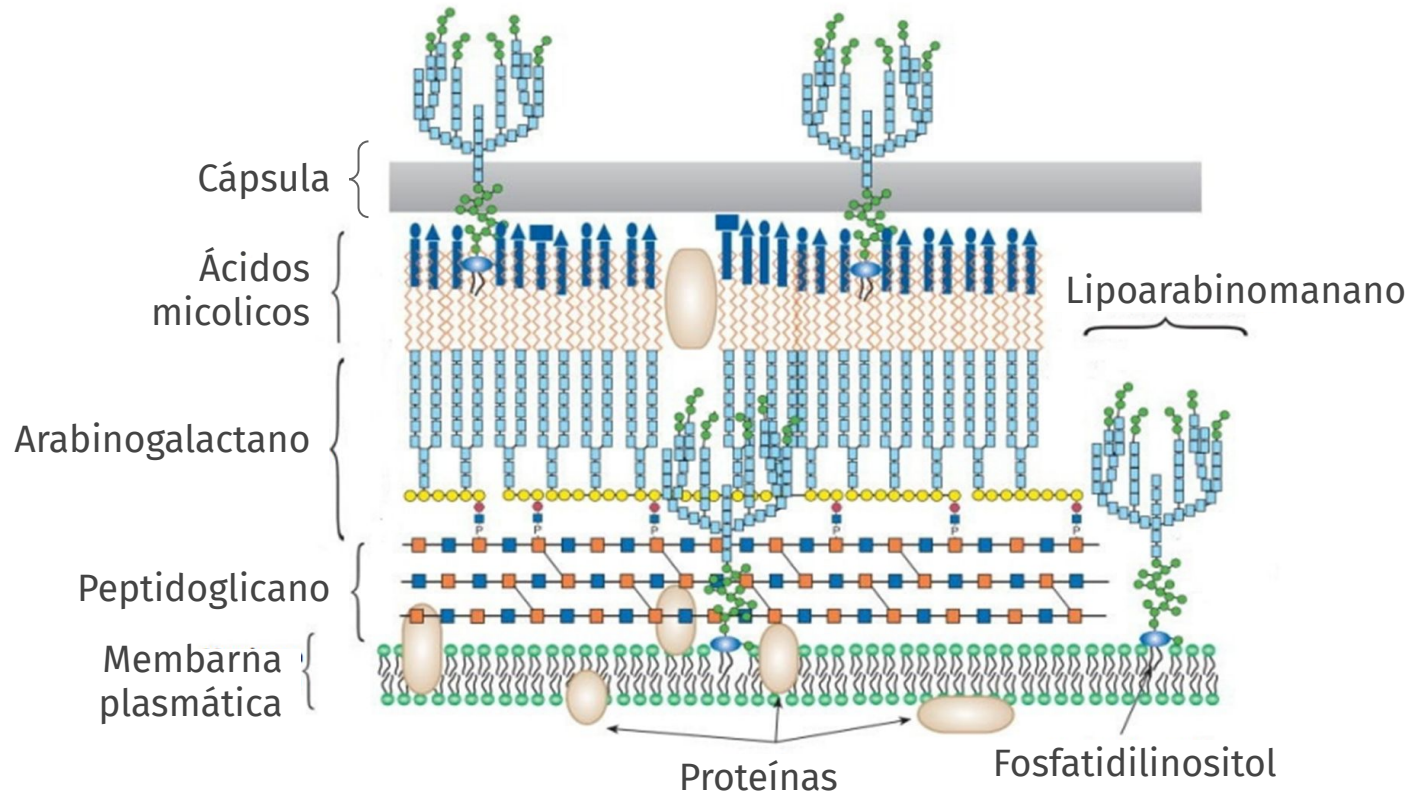
Mary Lilián Carabalí Isajar,  
MSc. Microbiología, cPhD

## **Asesora interna:**

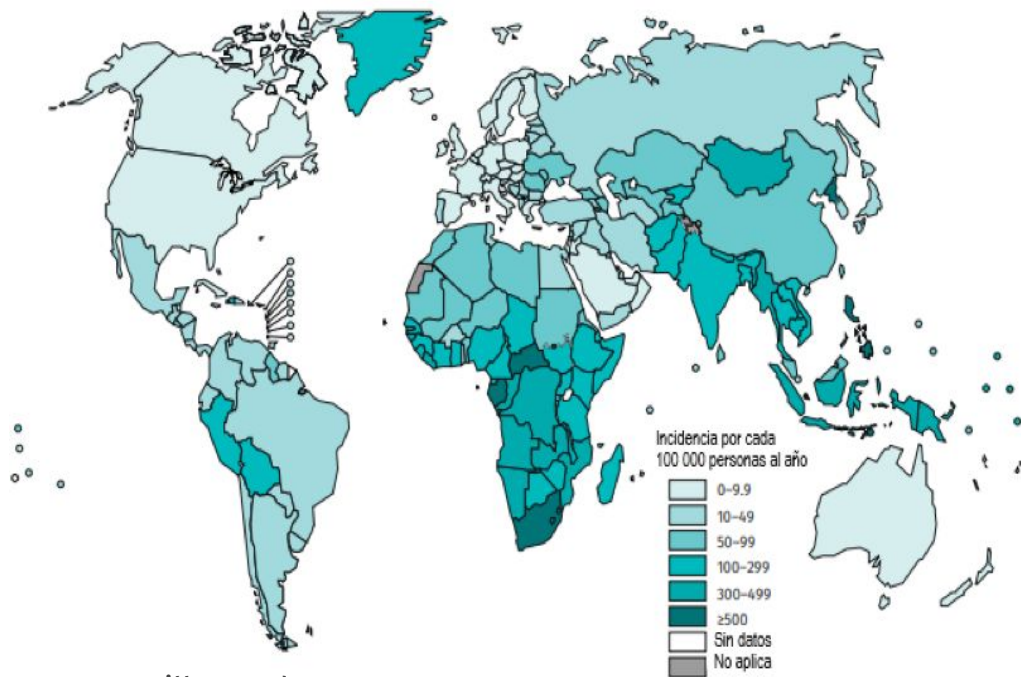
Jeannette Navarrete Ospina, MSc.  
Salud y producción animal

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia  
FIDIC**

# *Mycobacterium tuberculosis*

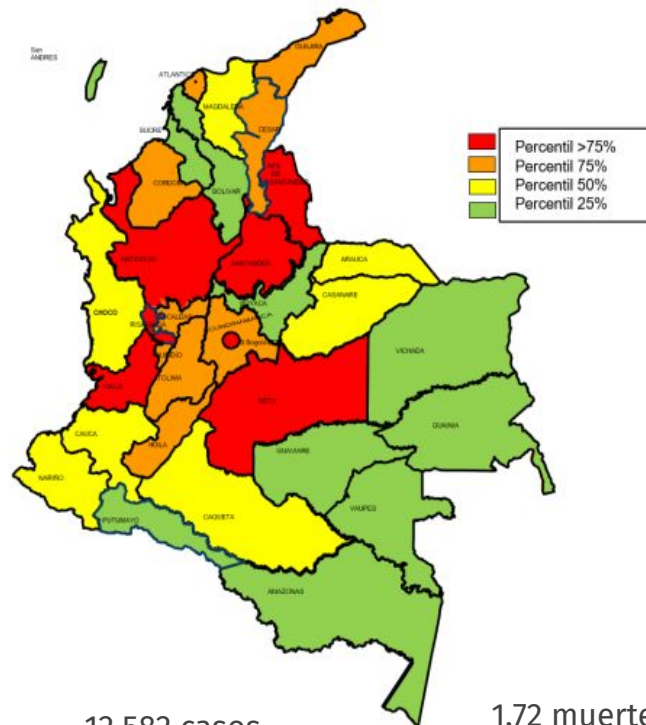


# Incidencia Tuberculosis 2020



9.9 millones de personas en el mundo infectadas

1,5 millones de muertes

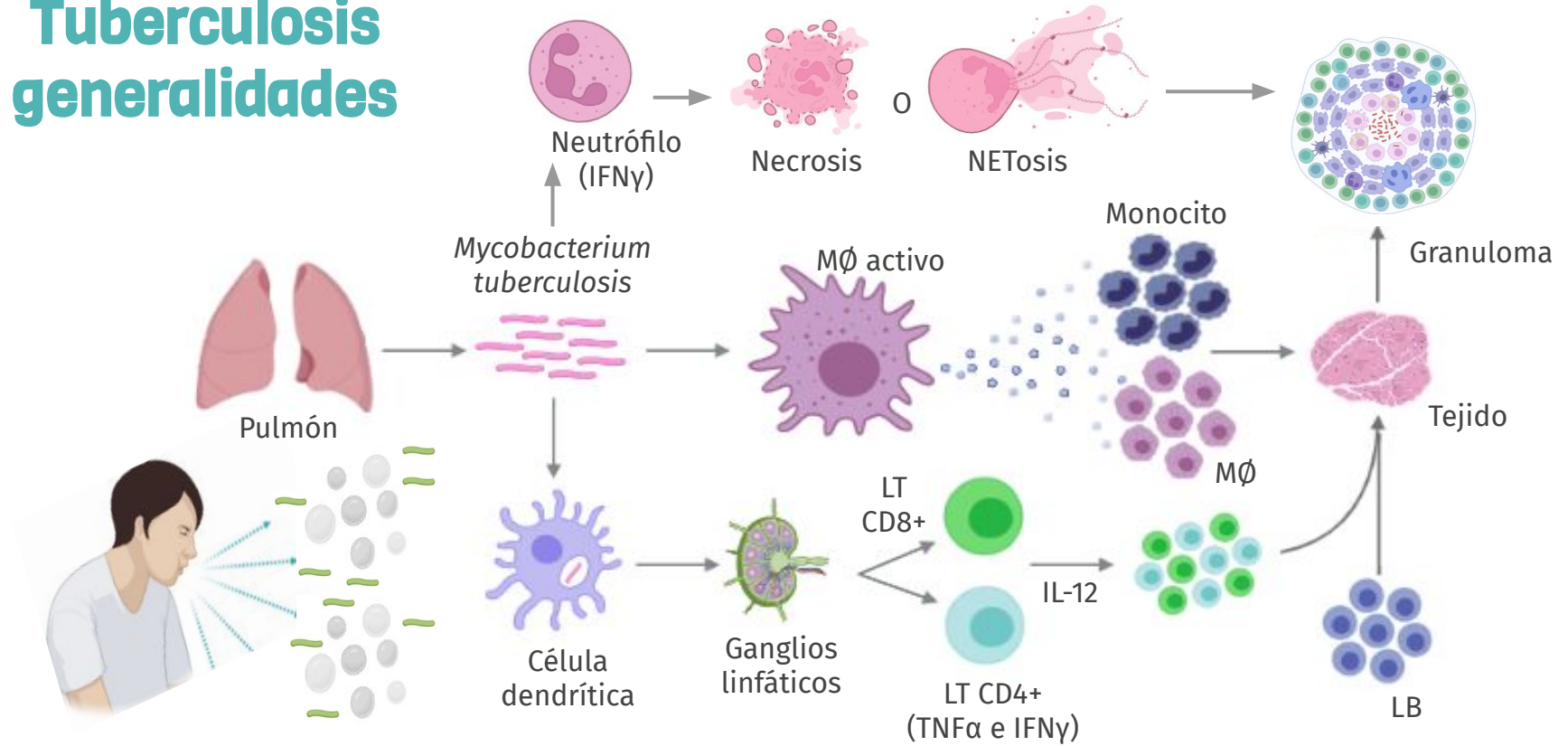


12.582 casos nuevos en Colombia

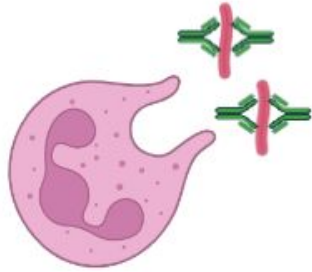
1,72 muertes por cada 100.000 habitantes



# Tuberculosis generalidades

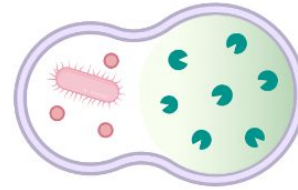


# Funciones efectoras de anticuerpos sobre macrófagos y neutrófilos

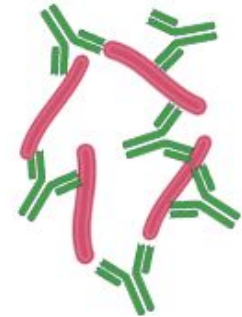


Neutralización de infectividad

Aumento de la fusión del fagolisosoma

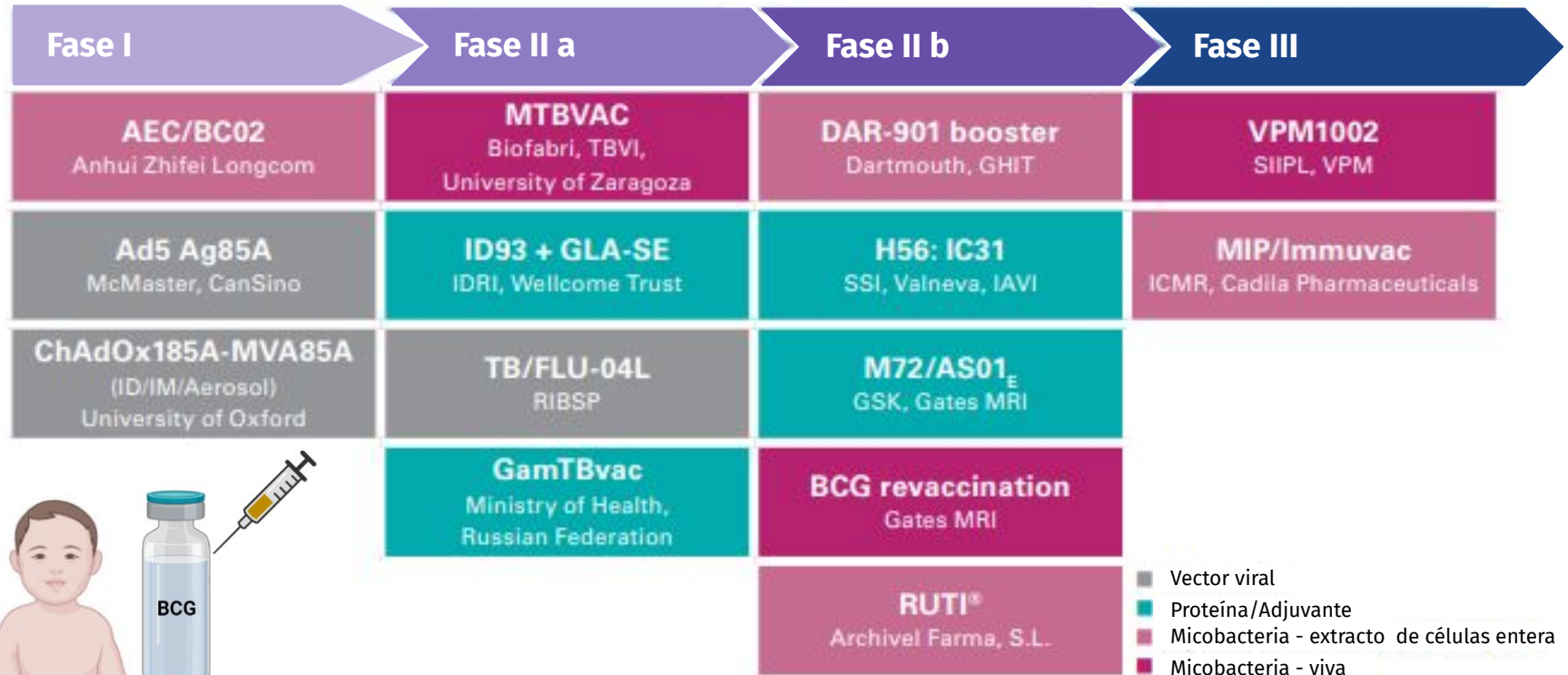


Fagocitosis mejorada

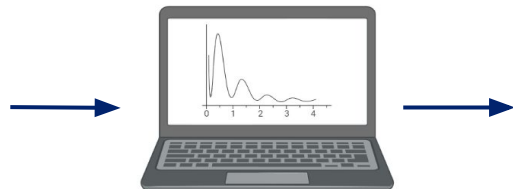
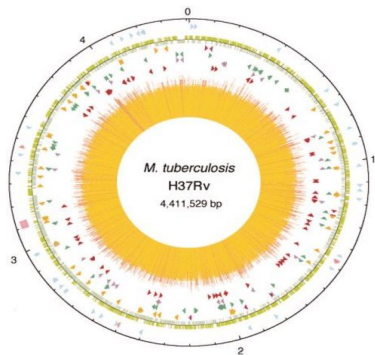


Neutralización previa al reconocimiento

# Vacunas Anti Tuberculosas

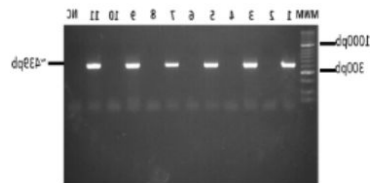


# Metodología de la FIDIC

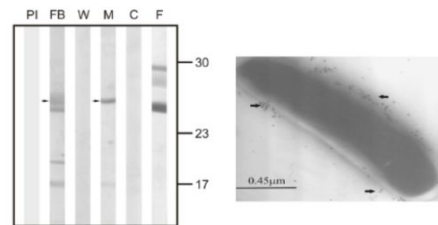
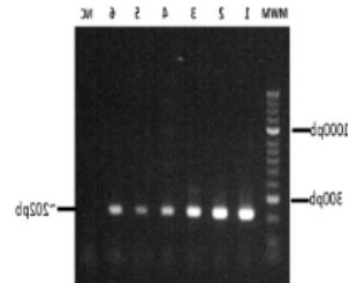


Bioinformática

Presencia

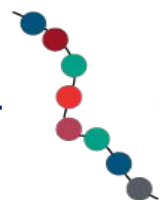


Transcripción



Immunoblot y  
microscopia electronica

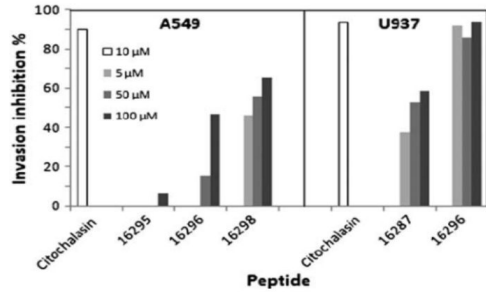
Síntesis de péptidos



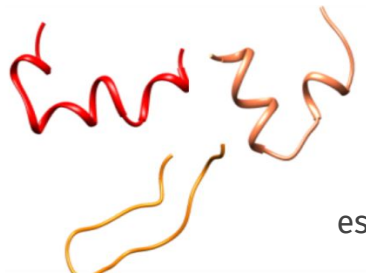
Peptide number	Sequence Rv3587c	Binding Activity (%)			
		A549 Cells		U937 Cells	
39257	MLDLEPRQPLPTEIYWRERQ	100	100	100	100
39258	LALGLAVVVVGLAVAVIAY	100	100	100	100
39259	FVDSAGAKPYSADKPAAY	100	100	100	100
39260	QSHPGSPAPQAPQAGQTEY	100	100	100	100
39261	GNAAAAFPQGQNPETPTFT	100	100	100	100
39262	AAVQPPFVLEQDDCPDSTY	100	100	100	100
39263	AVKGLTNPQYVYVGDQPKF	100	100	100	100
39264	MVVTNIGLVSKKRDVGAAY	100	100	100	100
39265	VLAAYVYSLDNKRLWSNLDI	100	100	100	100
39266	APSNELVKTIFSPGEQVTTY	100	100	100	100
39267	AVITWGMOSAPRCPLRPAY	100	100	100	100
39268	QPGTYNLVYQLNLRSLPY	100	100	100	100
39269	PFILNQPPFPFPVPAQGY	100	100	100	100
39270	VPAPQPAQAPPESPAQGGV	100	100	100	100

Ensayo receptor-ligando

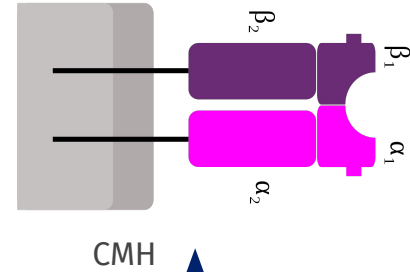
# Metodología de la FIDIC



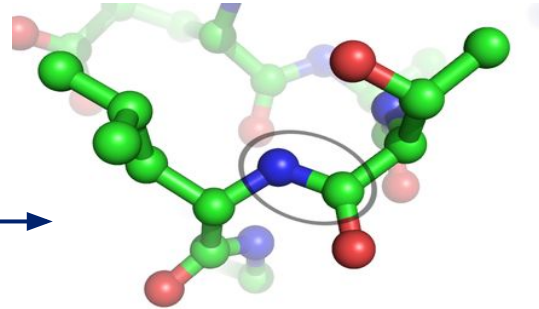
Inhibición de la entrada de *Mtb*



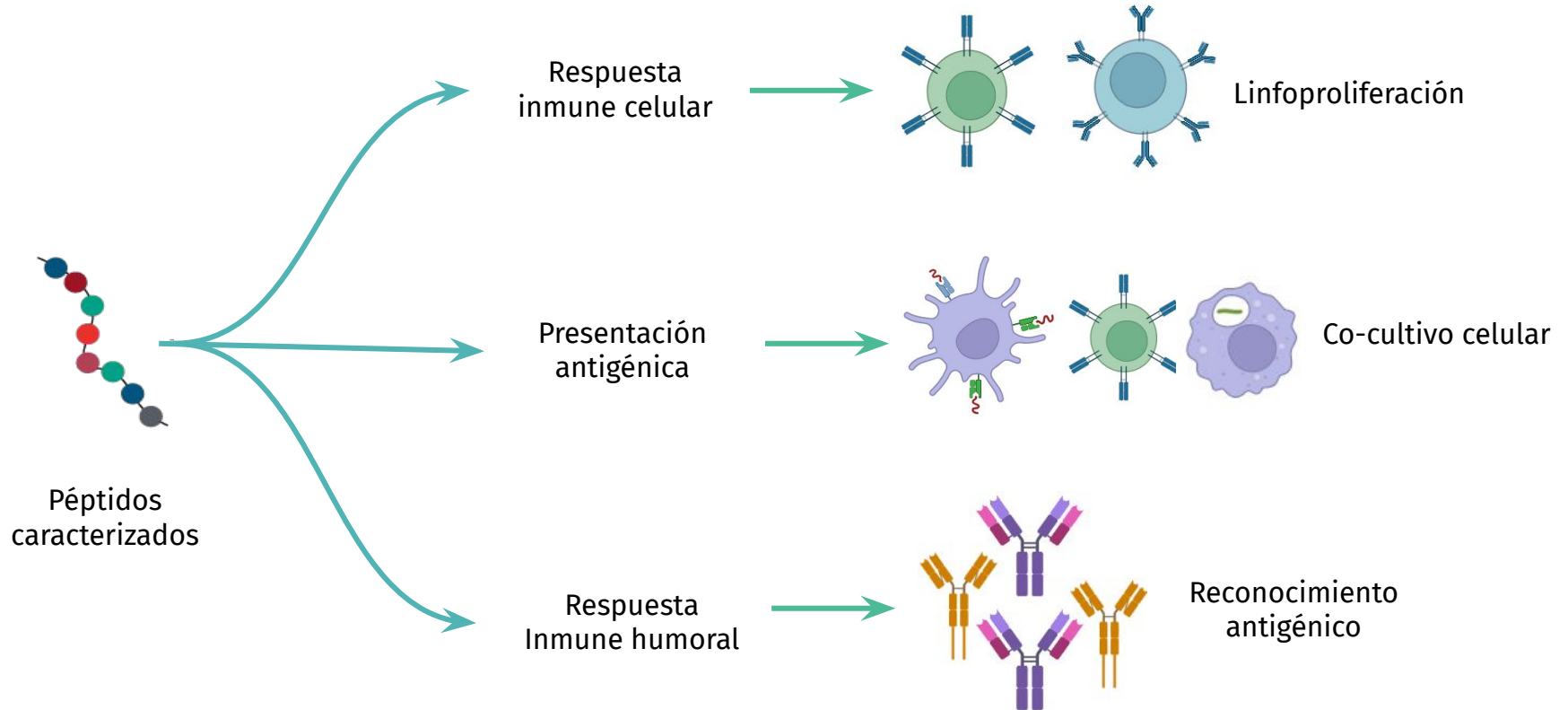
Determinación de estructura secundaria



Modificación de péptidos



# Planteamiento del problema





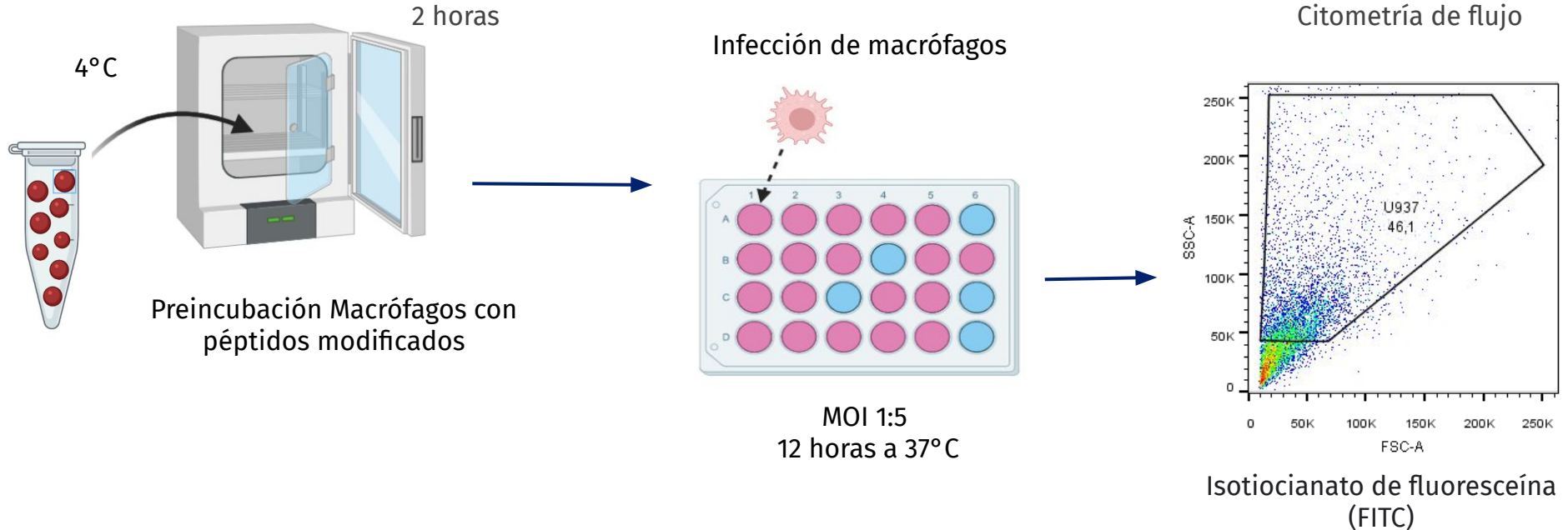
## Objetivo General

Establecer la actividad efectora de anticuerpos, que reconocen péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv, sobre neutrófilos y macrófagos infectados

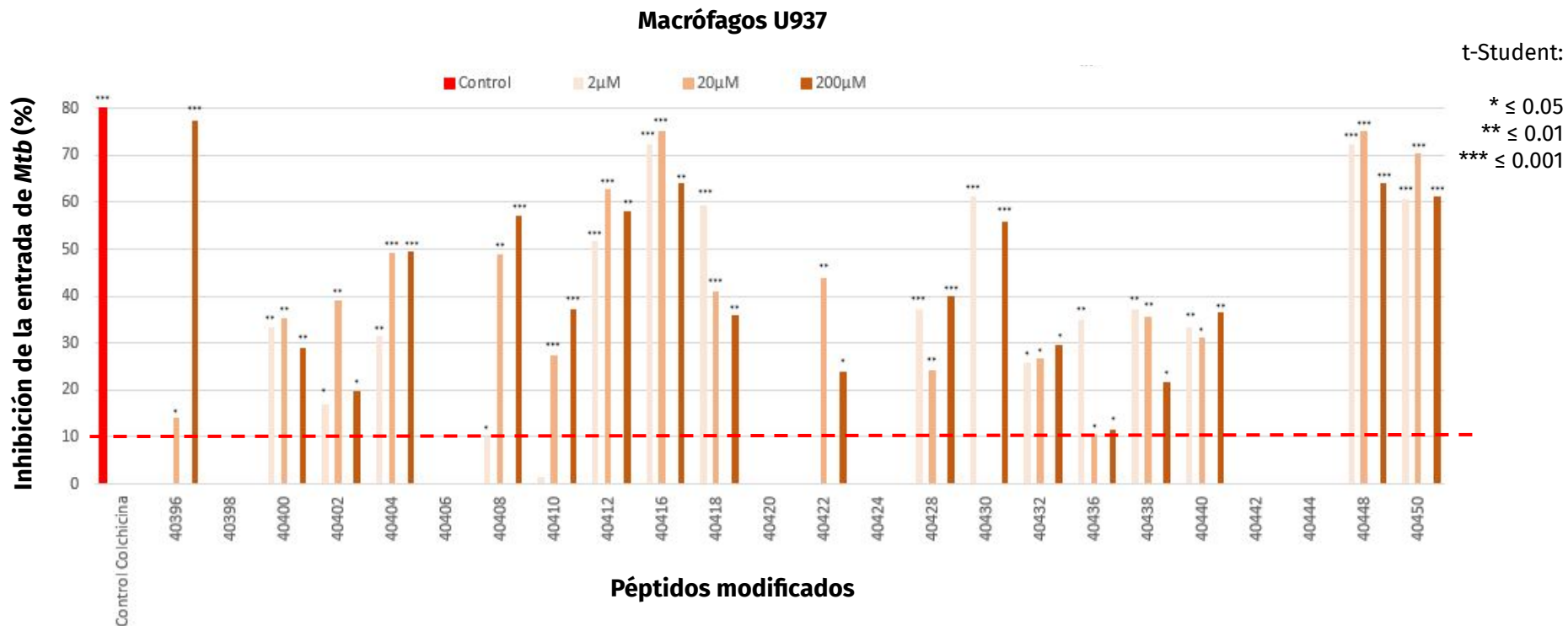
# Objetivos específicos

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

# Ensayo de inhibición de la entrada de *Mtb* a macrófagos U937 en presencia de péptidos modificados



# Evaluación de la capacidad inhibitoria de péptidos modificados



75% de los péptidos analizados inhibieron la entrada de la micobacteria a los macrófagos

# Péptidos seleccionados

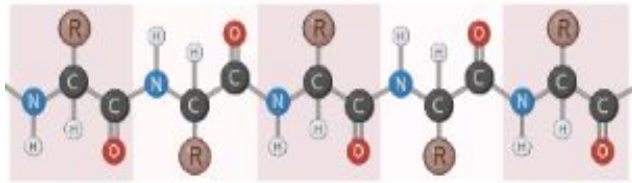
Proteína	Péptidos
Rv 0227c	<b>16951</b>
	40396
Rv1268c	<b>37964</b>
	40398
Rv1411c	<b>37096</b>
	40400
Rv1490	<b>11073</b>
	40402
Rv2560	<b>11024</b>
	40404
Rv2707	<b>16084</b>
	40406
Rv 3166	<b>16295</b>
	40408
	<b>16298</b>
	40410
	<b>16300</b>
	40412

Proteína	Péptidos
Rv 0180c	<b>31024</b>
	40416
	<b>31025</b>
	40418
	<b>31032</b>
	40420
	<b>31039</b>
	40422
	<b>31028</b>
	40424
Rv 2270	<b>37775</b>
	40428
	<b>37777</b>
	40430
	<b>37780</b>
	40432

Proteína	Péptidos
Rv1911c	<b>37765</b>
	40436
	<b>37767</b>
Rv 2004c	40438
	<b>9111</b>
Rv 2301	40440
	<b>30960</b>
Rv 1980c	40442
	<b>36827</b>
Rv 3494c	40444
	<b>38373</b>
Rv 679c	40448
	<b>30987</b>
	40450

# Predicción de epítopes B en los péptidos seleccionados

Secuencias de 15 proteínas (RV-número de proteína)



VDTVAAGLSYGPPVLRNTPC



BepiPred 2.0



VDTVAAGLSYGPPVLRNTPC

Epítopo B



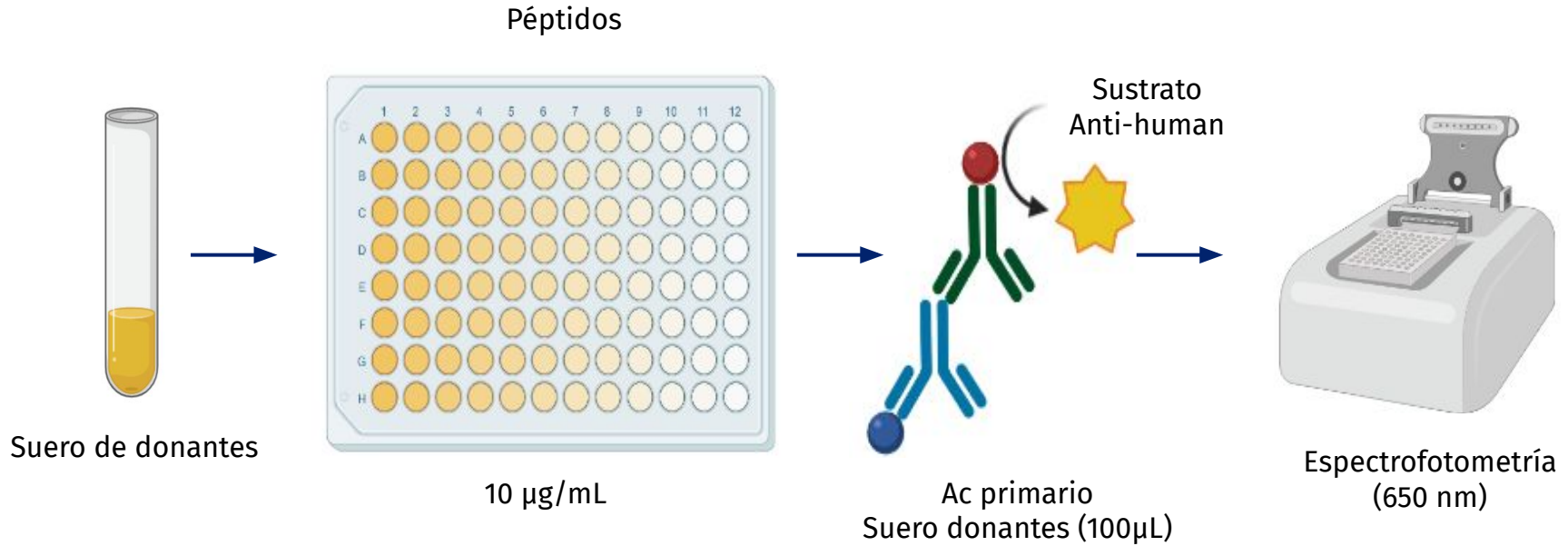


# Caracterización de antígenos candidatos

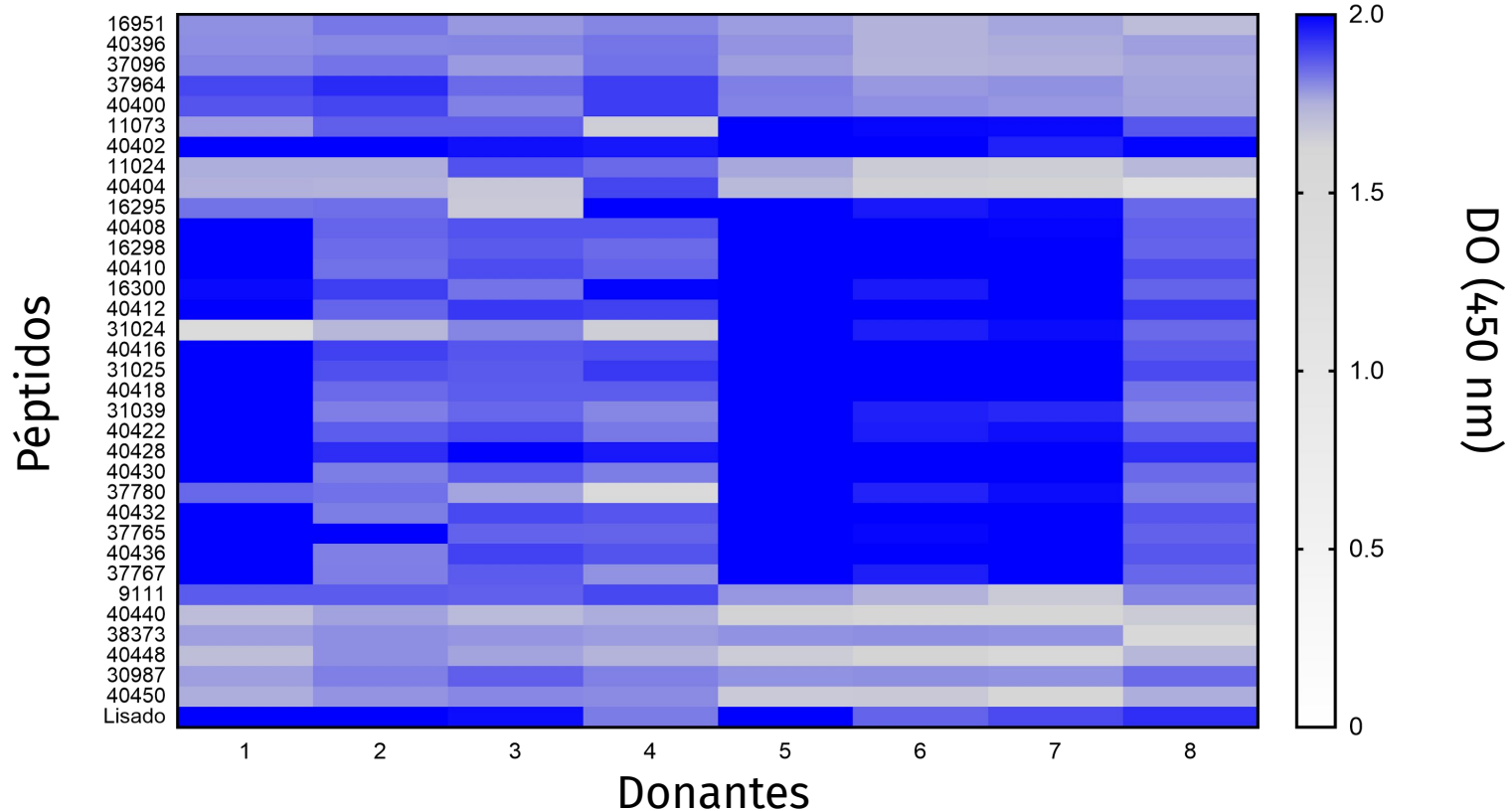
25										C				C						C
24		C		C		C				G		C		G						C
23		G		G		G				Y		G		A						G
22		E		R		L		C		A		I		S						N
21	Y	A	Y	S		Y		G	Y	L		Y		S		K	Y	R		G
20	P	T	L	L	L	A	L	L	A	Q	I	F	V	L	Y	Q	S	T	E	A
19	N	A	D	D	Y	V	P	P	L	A	Y	D	D	S	Y	D	R	G	K	G
18	T	P	A	A	A	S	E	E	E	A	F	R	T	S	S	P	V	K	N	L
17	P	P	P	P	V	Y	A	A	A	S	D	L	V	G	P	Y	T	Q	I	N
16	N	G	P	P	S	P	A	A	A	A	R	S	A	F	L	Y	A	D	R	S
15	M	R	L	R	Y	V	P	P	G	P	L	A	A	P	S	S	T	A	N	K
14	N	N	D	P	P	T	A	A	A	S	S	P	G	Q	I	P	V	Q	G	L
13	S	P	A	A	S	V	P	P	P	S	A	S	L	L	N	L	N	L	A	N
12	T	K	L	R	T	P	T	T	S	W	P	T	S	R	I	S	S	S	G	D
11	A	P	T	T	D	S	T	S	S	T	A	P	Y	T	N	L	P	P	L	L
10	I	D	D	D	V	S	A	A	W	L	T	S	G	N	Y	N	I	G	N	P
9	G	A	G	G	S	A	D	D	T	P	D	S	P	P	A	L	A	S	D	K
8	G	S	V	Q	Q	T	V	F	L	P	G	F	P	T	P	N	T	N	I	Y
7	R	L	Q	L	G	F	T	S	P	A	S	A	V	S	D	Y	G	L	T	P
6	A	G	L	Q	T	P	T	T	P	V	R	Q	L	N	S	A	S	R	P	G
5	G	G	N	P	Y	A	A	A	A	N	V	F	R	A	M	P	N	M	D	A
4	N	R	I	I	P	F	K	K	V	A	A	G	T	M	Q	D	L	H	G	G
3	S	A	W	W	A	G	P	P	N	G	Y	A	N	S	I	S	R	A	N	L
2	S	G	T	G	F	G	V	G	A	G	G	G	P	G	Q	G	M	G	K	G
1	T	C	E	C	G	C	Y	C	G	C	A	C	C	C	T	C	H	C	Y	C
Position	37775	40428	37777	40430	37780	40432	37765	40436	37767	40438	9111	40440	30960	40442	36827	40444	38373	40448	30987	40450
	Rv2270						Rv1911c				Rv2004c		Rv2301		Rv1980c		Rv3494c		Rv679c	

34 péptidos pertenecientes a 15 proteínas presentaron epitopes B

# Aproximación experimental de ELISA indirecta

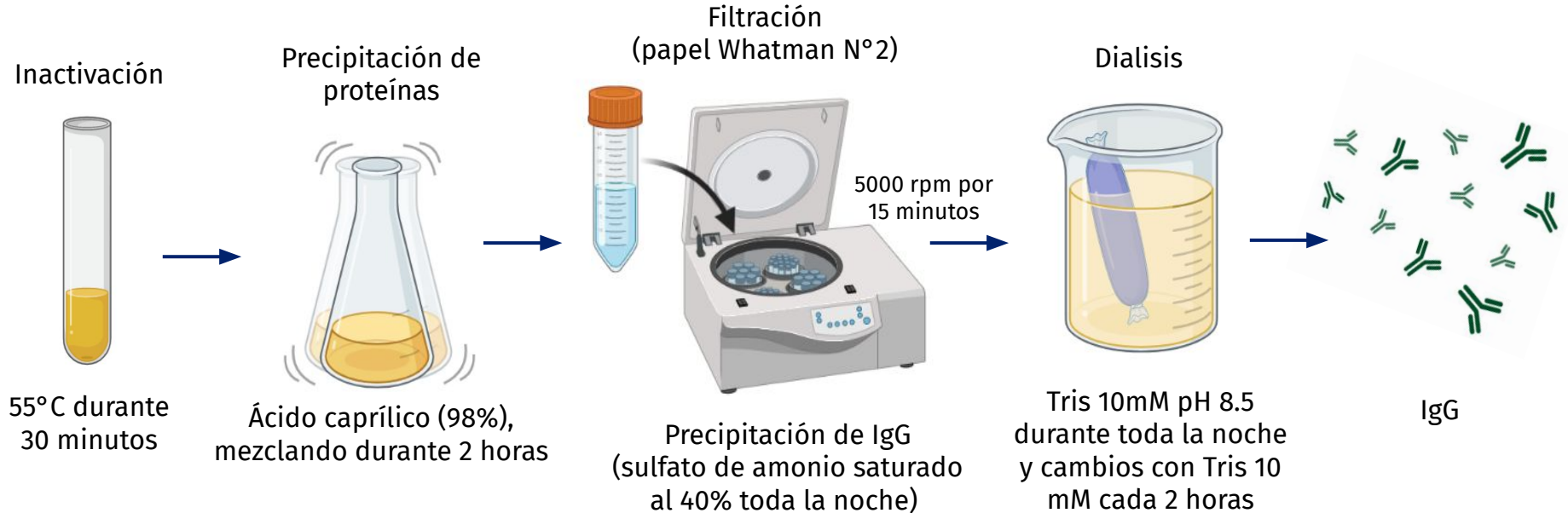


# Reconocimiento de péptidos por inmunoglobulinas G

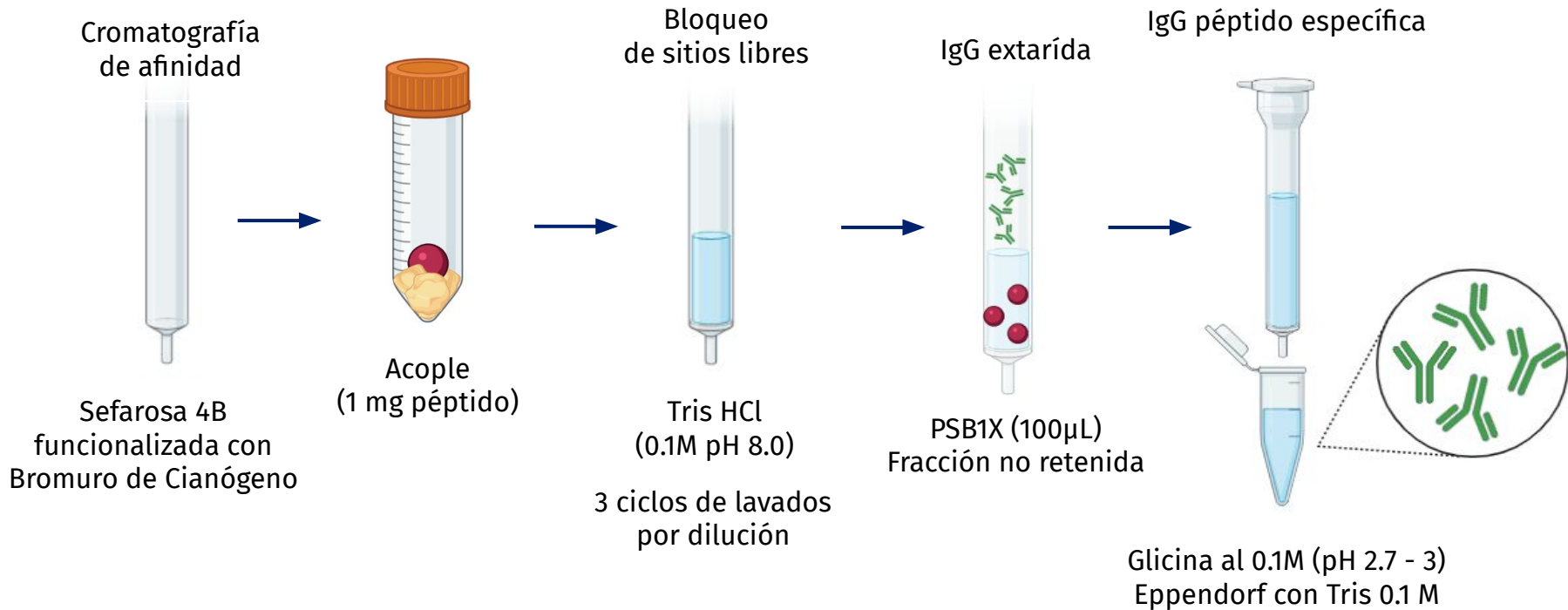


DO: 1.0 - 2.0 indica mayor reconocimiento de las secuencias peptídicas

# Extracción de inmunoglobulinas G



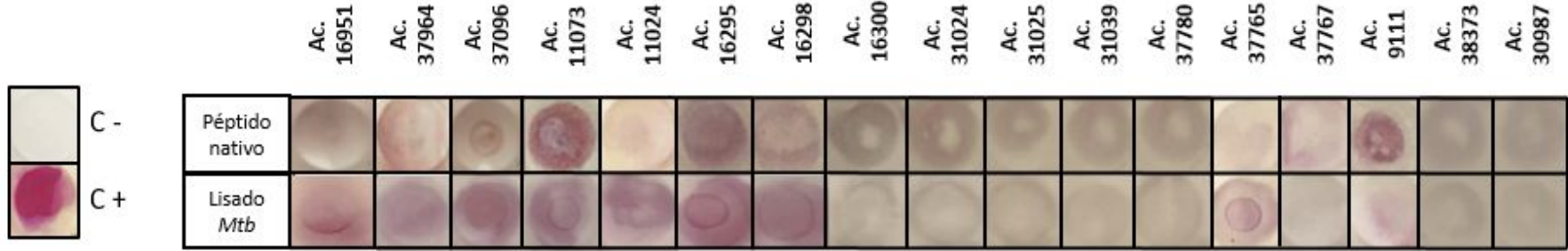
# Anticuerpos péptido - específicos



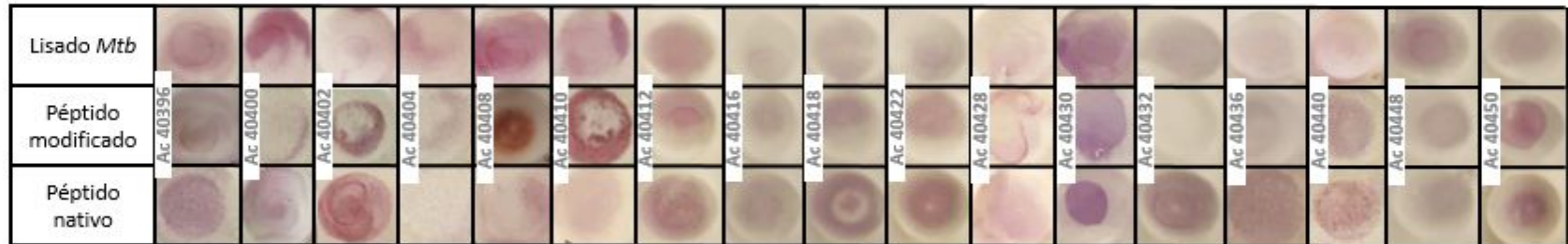


# Reconocimiento de péptidos nativos y modificados

Anticuerpos péptido-específicos nativos



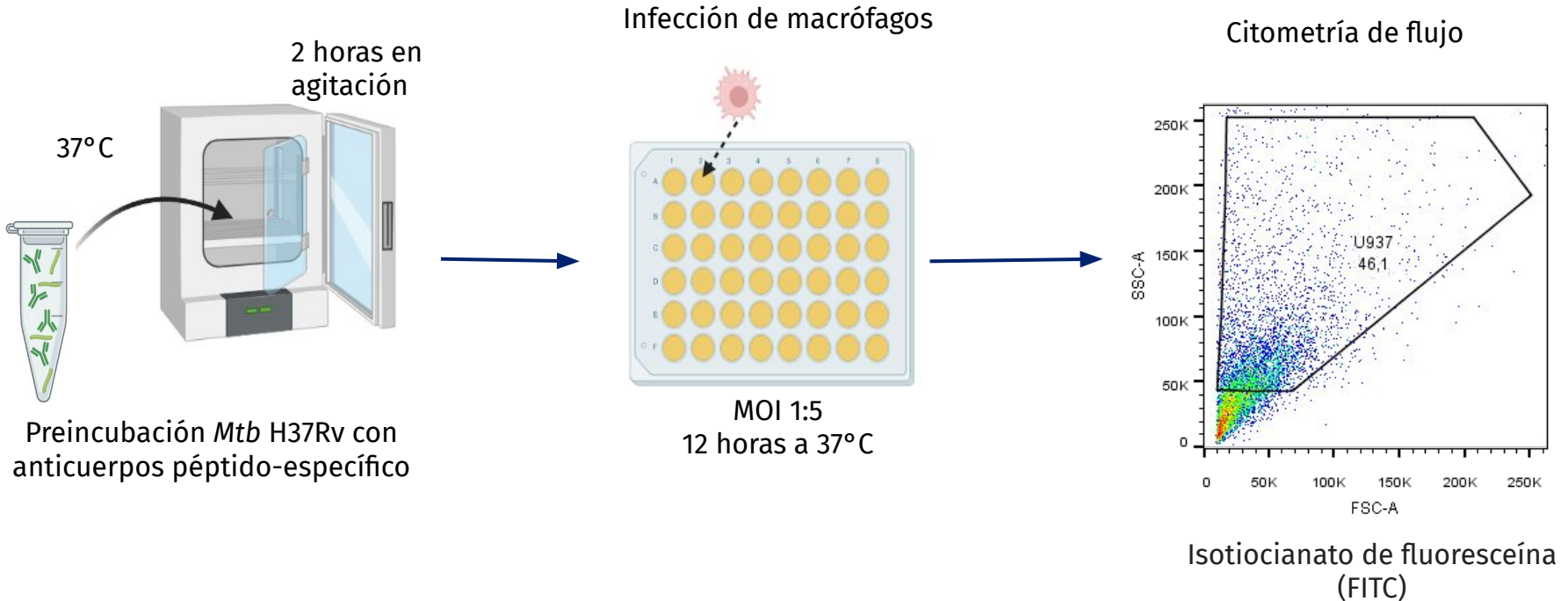
Anticuerpos péptido-específicos modificados



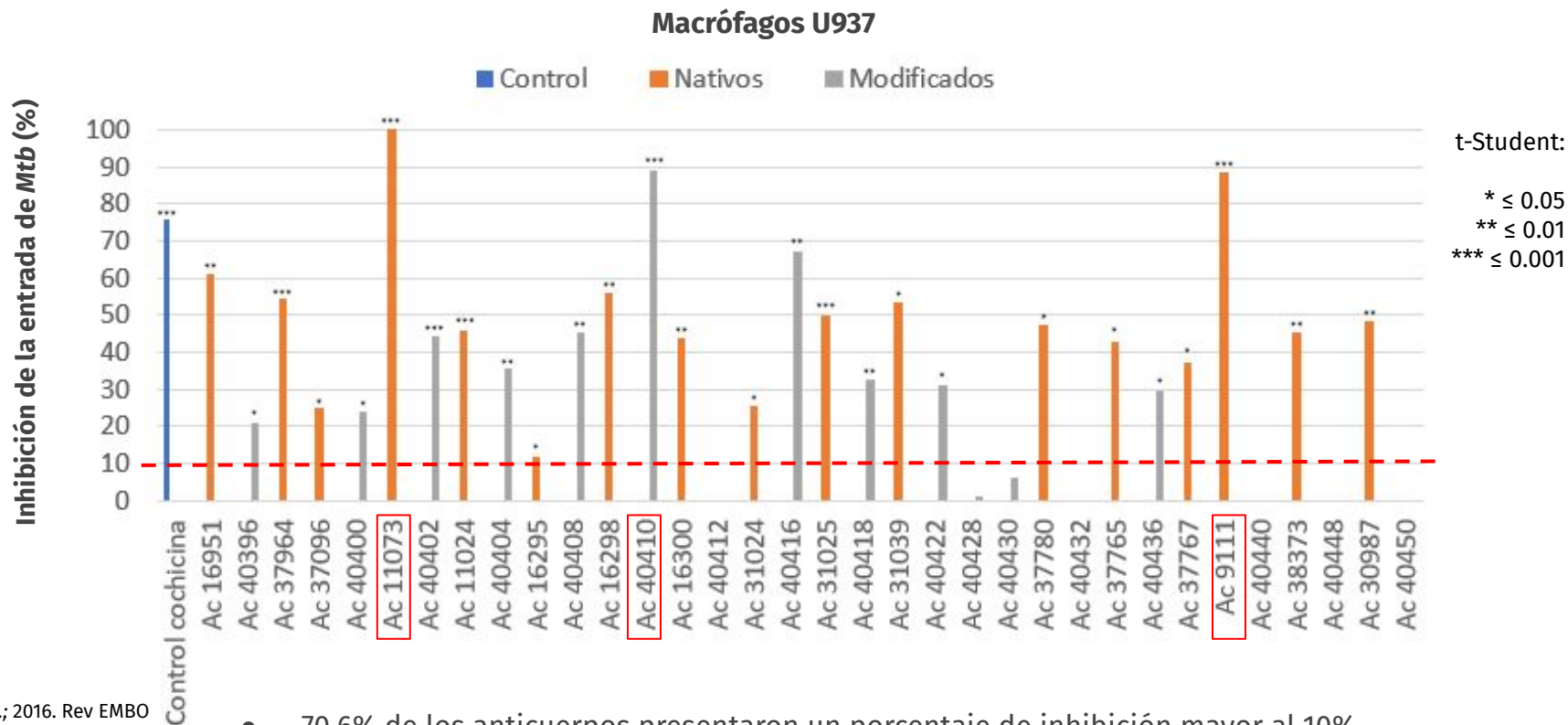
# Objetivos específicos

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

# Ensayo de inhibición de la entrada de *Mtb* con anticuerpos péptido-específicos



# Capacidad inhibitoria de anticuerpos péptido-específicos



- 70,6% de los anticuerpos presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 10%
- Los Ac **11073**, **40410** y **9111** inhibieron la entrada de la micobacteria a los macrófagos en un porcentaje superior al control

Zimmerman *et al.*; 2016. Rev EMBO

Mol Med. 8 (11):1325-1339.

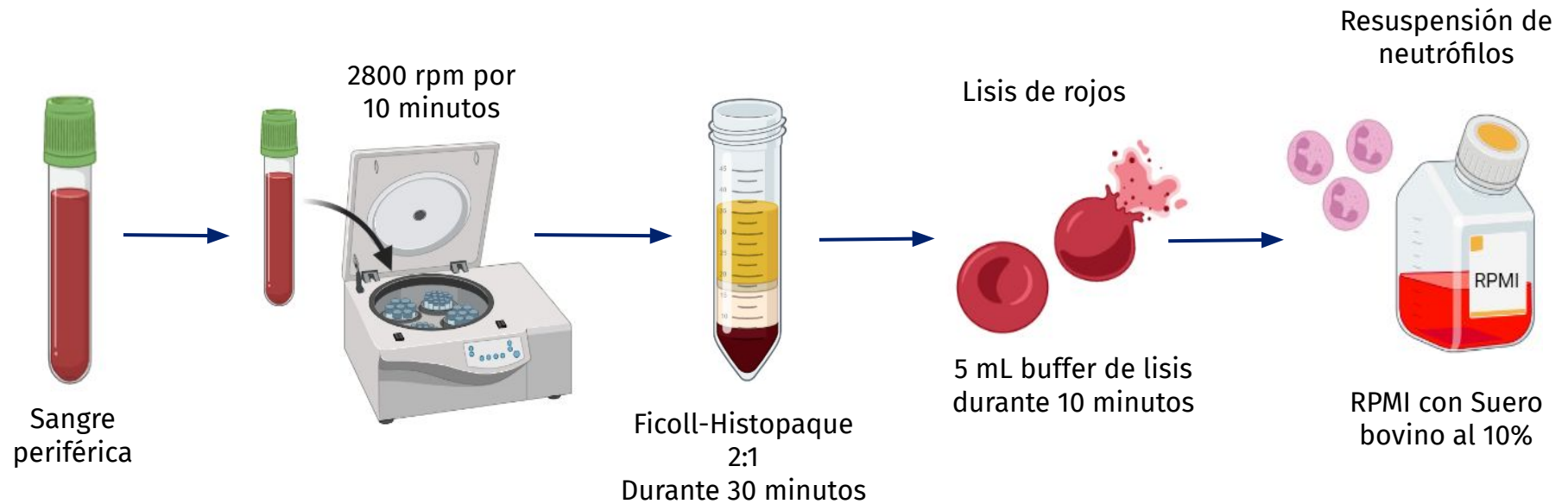
Lu *et al.*, 2016. Rev Cell.

167(2):433-443.e14.

# Objetivos específicos

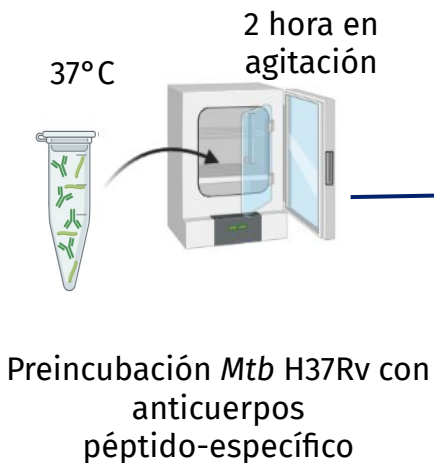
1. Identificar anticuerpos IgG en sangre periférica que reconocen antígenos peptídicos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv
2. Evaluar la capacidad que tienen los anticuerpos, que reconocen péptidos derivados de proteínas presentes en la envoltura de *Mtb* H37Rv, para inhibir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

# Extracción de neutrófilos a partir de sangre periférica

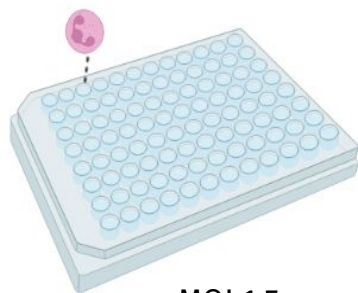




# Ensayo de invasión en neutrófilos con *Mtb* mediado por IgG

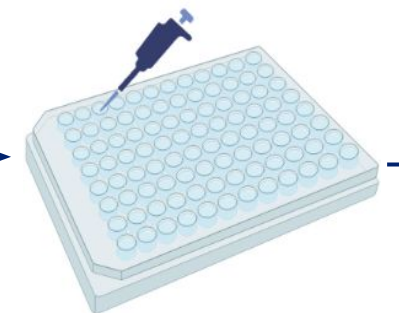


Infección de neutrófilos



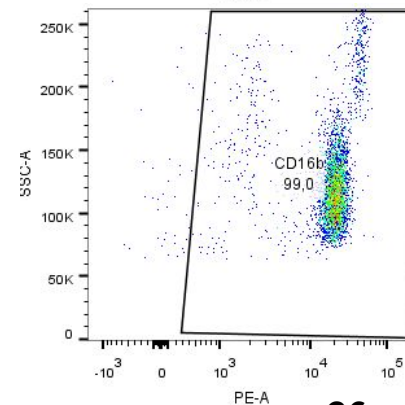
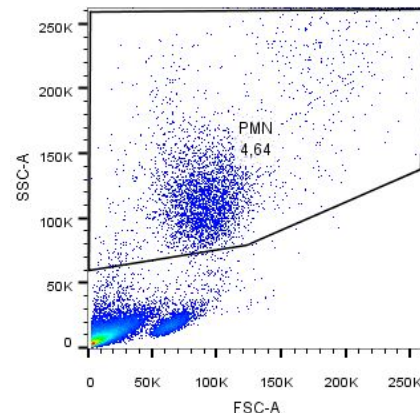
MOI 1:5  
18 horas a 37°C

Marcaje

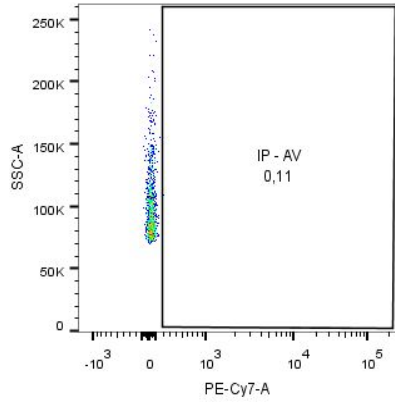


Anexina V (1 µL)  
Yoduro de propidio (0,4µL)  
15 minutos a 4°C

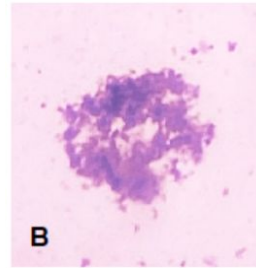
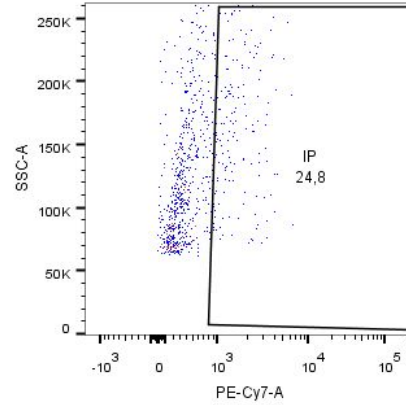
Citometría



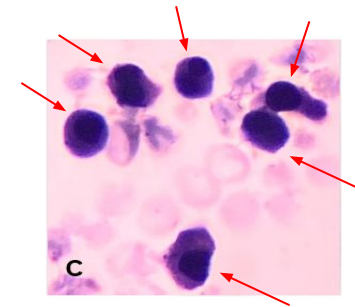
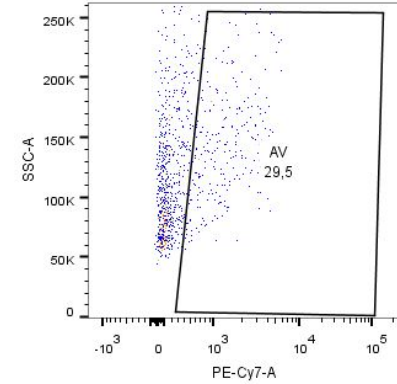
# Citometría de flujo



NEUTRÓFILOS VIABLES



NEUTRÓFILOS EN NECROSIS



NEUTRÓFILOS EN APOPTOSIS

## Necrosis y apoptosis en neutrófilos infectados

AC	DONANTE															
	1		2		3		4		5		6		7		8	
	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP	NEC	APOP
	Ctrl (8,52)	Ctrl (23,70)	Ctrl (8,70)	Ctrl (6,37)	Ctrl (2,55)	Ctrl (1,32)	Ctrl (10,50)	Ctrl (1,51)	Ctrl (28,10)	Ctrl (3,92)	Ctrl (11,70)	Ctrl (7,60)	Ctrl (18,30)	Ctrl (3,80)	Ctrl (13,70)	Ctrl (2,32)
16951	4,31**	11,60***	31,35***	0,93**	2,79	10,60***	1,06***	2,94***	17,50**	9,96**	10,30***	24,55***	47,30***	17,75***	3,42***	7,51***

Hilda *et al.*, 2019. Rev Innate Immunity. 26 (4): 240-247

Dallenga *et al.*, 2017. Rev Cell Host & Microbe. V22,ISSUE4, P519-530.E3.

# Necrosis y apoptosis en neutrófilos infectados

AC	DONANTE															
	1		2		3		4		5		6		7		8	
	NEC Ctrl (8.52)	APOP Ctrl (23.70)	NEC Ctrl (8.70)	APOP Ctrl (6.37)	NEC Ctrl (2.55)	APOP Ctrl (1.32)	NEC Ctrl (10.50)	APOP Ctrl (1.51)	NEC Ctrl (28.10)	APOP Ctrl (3.92)	NEC Ctrl (11.70)	APOP Ctrl (7.60)	NEC Ctrl (18.30)	APOP Ctrl (3.80)	NEC Ctrl (13.70)	APOP Ctrl (2.32)
16951	4.31**	11.60***	31.35***	0.93**	2.79	10.60***	1.06***	2.94***	17.50**	9.96**	10.30**	24.55***	47.30***	17.75***	3.42***	7.51***
40396	5.10**	14.50***	6.69*	0.29***	1.31***	9.74**	1.80***	1.31*	30.10***	19.50***	17.10***	16.40***	13.20***	4.96*	6.42***	13.20***
37964	3.81*	20.15	6.87*	1.27*	2.76	13.40***	29.55***	13.35**	3.94***	11.90**	18.00***	13.70	1.93**	31.70***	3.59**	3.66**
37096	3.74***	49.50**	14.25**	2.81***	5.68*	10.35***	1.50**	2.06**	12.21*	7.78	8.63***	6.15**	2.91**	7.45***	24.35	3.29
40400	3.18***	57.80***	2.96**	3.12***	1.71*	28.55***	3.62***	3.97***	10.70***	8.33**	8.69	19.60***	5.00***	46.35***	3.86***	6.54***
11073	6.85*	13.85**	27.05***	2.43***	17.9**	8.43*	2.93***	4.56**	33.70***	1.97*	8.41**	17.35**	15.90***	6.51**	10.56*	3.14
40402	5.49**	14.45**	45.15**	1.28***	1.63*	13.25***	3.72***	5.17**	36.00***	11.60**	7.08**	22.00**	26.50***	9.37**	7.19***	7.05***
11024	3.10**	28.40	18.85**	0.32***	3.10	29.01**	1.18***	4.49**	37.80***	15.80***	13.08	27.00*	21.45	15.85***	4.67***	7.25***
40404	4.17*	14.40***	34.60**	1.28***	36.10***	32.40***	2.21***	2.49**	15.30**	17.10***	17.65**	14.25	14.40***	21.20***	1.69***	9.88***
16295	6.83	8.85**	21.50***	1.17***	27.45**	16.15***	1.91***	13.80**	36.70***	6.00*	18.80***	24.50**	5.68**	4.26	2.39***	17.30***
40408	5.18**	19.00**	16.60**	1.71***	10.08**	30.40***	2.30**	1.91**	40.50***	19.50***	7.40**	21.95**	4.73***	17.15*	4.00***	3.87**
16298	2.27**	15.20***	9.37	1.11***	9.62*	20.30***	13.30*	3.46***	25.20	11.25***	4.89*	18.85	4.84**	10.30**	2.76***	2.08**
40410	2.68**	10.84**	16.20**	0.88***	1.68***	16.20***	16.25*	2.33**	45.65***	6.78*	6.96	14.55**	1.71***	2.82*	1.25***	7.98***
16300	3.26***	23.65	7.90	2.45	2.26**	15.95***	0.26***	1.98*	14.75***	47.70***	13.30	18.05	8.56**	13.00***	5.41***	6.25***
40412	4.86***	28.30**	1.50**	0.56***	1.20**	8.20*	1.63***	5.00***	5.00***	11.90**	7.69*	9.68**	16.30	10.37***	0.64***	2.67*
31024	10.50***	39.55*	4.89**	1.57*	12.5***	0.80**	2.32*	14.10***	6.21*	15.55*	21.20**	12.20**	2.03*	1.88***	2.06*	
40416	2.89*	33.40**	8.77	1.50***	2.42	0.94	1.69***	3.98***	15.90**	4.77*	7.55**	30.75**	22.55**	50.35***	21.25**	5.08**
31025	1.24***	22.30**	7.12*	3.17***	2.08*	7.14*	1.20**	2.64*	12.45**	3.35	6.34***	25.10*	9.45***	20.20***	1.49***	4.24**
40418	5.98**	38.80***	36.65**	2.15**	2.81	14.3*	0.45***	1.92*	21.10***	1.87**	5.10**	12.05**	10.66**	16.95***	3.81***	9.47***
31039	3.05***	15.55**	20.30**	2.26***	2.01	9.53***	2.43***	5.18***	42.50**	2.28*	16.25*	11.80**	9.03**	32.50***	4.17***	6.57***
40422	8.74*	15.50**	4.60*	0.90***	3.25*	7.43**	1.34***	3.83**	29.70***	18.80***	23.35**	16.35**	7.91**	3.64	3.35***	9.70***
40428	6.13*	30.95**	4.31**	0.49***	1.64*	17.4**	22.60***	5.63***	10.45*	8.84*	6.82**	14.40**	10.80***	8.99**	1.60***	7.28***
40430	16.55	22.85	3.33**	0.65***	3.21	13.35***	21.00**	7.98**	43.65*	19.10***	11.32	13.95	3.23**	48.40***	1.31***	5.52*
37780	13.05**	20.80*	26.90***	1.07**	0.78*	17.7***	3.11***	11.8***	57.50*	4.97	2.86**	18.30*	3.91***	16.20***	13.05***	2.05
40432	6.30**	21.80	2.43**	0.94***	9.53***	32.6**	0.79***	2.26**	41.00***	2.48*	16.30**	16.35	11.95***	13.55**	6.36***	11.40***
37765	7.73*	15.50**	7.22*	1.92**	1.10**	7.98***	1.32**	2.29**	48.60***	2.28*	7.42***	42.50**	2.35***	15.45**	9.32***	2.29
40436	14.30*	13.70**	22.25*	0.74***	2.21	18.40***	0.51***	1.03**	21.20***	4.61	28.50***	6.78**	9.42**	0.23**	4.65***	5.07**
37767	4.88**	30.95*	14.95**	2.30***	0.76***	5.98*	0.71***	1.82*	22.80***	8.19**	15.50*	19.95*	6.64***	7.50**	64.10***	23.10***
9111	4.99***	25.75*	10.36*	6.24	1.16*	6.70***	0.37**	1.12**	25.50***	6.28*	7.47***	20.40*	14.10***	17.45**	13.50***	26.40***
40440	7.74**	32.20***	8.95	2.51***	1.79	20.70**	0.45***	0.53***	33.40***	2.24*	9.61**	7.53***	14.10***	4.26	13.70**	5.40**
38373	8.80	29.60**	2.83**	4.82*	1.11***	30.05***	16.10***	2.52	24.60***	3.15	8.25**	18.30**	17.30***	50.70***	4.48**	4.82*
40448	23.50**	19.30**	15.80**	1.66***	3.44**	24.4**	0.31***	1.30**	29.35	4.72	14.95**	18.40***	24.80***	34.20***	13.30***	10.54*
30987	7.05*	10.25***	4.09**	1.33***	0.83**	2.15*	22.15***	6.78***	23.20**	4.00	7.26*	4.39	6.05***	32.45**	8.33**	6.75***
40450	4.67*	41.10***	11.90	3.74***	2.56	1.05	2.96***	0.83***	19.60***	17.50***	8.36**	22.95***	27.30***	17.05*	5.02***	7.97**

t-Student:

\* ≤ 0.05

\*\* ≤ 0.01

\*\*\* ≤ 0.001

El 52,9% de los anticuerpos incrementan la apoptosis en Neutrófilos en el 75% de la población

El 35,3% de los anticuerpos disminuyen la necrosis en Neutrófilos en el 75% de la población

Tan *et al.*, 2006. Rev The Journal of Immunology.

177(3): 1864-1871.

Andersson *et al.*, 2019. Rev Journal of Clinical

Investigation. 12(3):235-247.

# Conclusiones

- Inmunoglobulinas de tipo G dirigidas contra secuencias peptídicas presentan función efectora neutralizante frente a *Mtb* en macrófagos U937.
- IgGs péptido específicas son capaces de promover la apoptosis y disminuir la necrosis en neutrófilos infectados, lo cual podría establecer un mejor panorama durante la infección.
- Los anticuerpos dirigidos contra los péptidos 16951, 11073, 40410, 40416 y 9111 presentan los mayores porcentajes de inhibición de la entrada de la micobacteria a macrófagos U937.
- Se destacan los péptidos 9111, 11073 y 40400 que además de inhibir la entrada de la *Mtb* a macrófagos, disminuye la necrosis y aumentan la apoptosis en neutrófilos, cumpliendo con las características evaluadas en el presente estudio que podrían conferir protección frente a *Mtb*.

# Recomendaciones

- Incrementar el número de individuos reclutados con el fin de determinar el comportamiento de los anticuerpos como se evaluó en el presente estudio.
- Determinar las subclases de IgG que se presentan tras la purificación de inmunoglobulinas utilizadas en el ensayo y así mismo las glicosilaciones de la fracción cristalizable, ya que se conoce que interfieren en la función efectora de los anticuerpos.
- Evaluar la vía apoptótica que se desencadena en los neutrófilos tras la exposición a la micobacteria pre-opsonizada relacionada con las caspasas implícitas en el proceso





