



DETERMINACIÓN DE RESPUESTA INMUNE CELULAR GENERADA POR  
PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Mycobacterium*  
*tuberculosis* H37Rv

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C 2018



DETERMINACIÓN DE RESPUESTA INMUNE CELULAR GENERADA POR  
PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Mycobacterium*  
*tuberculosis* H37Rv

ERIKA TATIANA TONGUINO QUIÑÓNEZ

ASESORA EXTERNA: DEISY CAROLINA RODRÍGUEZ LANCHEROS, Msc  
INVESTIGADOR FUNDACION INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA

ASESORA INTERNA: EDITH DEL CARMEN HERNÁNDEZ ROJAS, Msc

DOCENTE UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C  
2018

## DEDICATORIA

*A mi hija, la luz de mi vida, lo que me anima a seguir, el origen de mis desvelos, de mis preocupaciones y de mis ganas de ser mejor persona. No hay día que no agradezca al cielo por ponerte en mi vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios y la vida por las oportunidades, dificultades y bendiciones del día a día que hicieron de mí una mejor persona.*

*A mis padres Emiliano y Janeth porque gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera.*

*A mi esposo Hernando, hermanos Ivon y Edwin, por su constante apoyo en mi crecimiento personal y profesional.*

*A las Msc. Deisy Carolina Rodríguez y Msc. Edith del Carmen Hernández por su apoyo, confianza, sus sugerencias, correcciones, comentarios y valiosos aportes en el desarrollo de mi trabajo, por enseñarme no solo a ser profesional sino también a ser una mejor persona.*

*A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia por abrir sus puertas y permitir que conociera el camino de la investigación.*

*Al grupo funcional Tuberculosis, a la Dra. Marisol Ocampo Cifuentes, por ser mi ejemplo a seguir, Alejandra, Cristian, Kewin y Mary por su acogida, apoyo y brindar un ambiente de trabajo propicio y fomentar en mí el proceso interminable de la investigación.*

*A los docentes de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, mi alma mater por el conocimiento adquirido, y la formación profesional y personal.*

*Muchas gracias por contribuir en mi formación profesional y personal.*

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>1. MARCO REFERENCIAL</b> .....	15
1.1 Epidemiología de la tuberculosis.....	15
1.2 Generalidades de la tuberculosis.....	16
1.2.1 El género <i>Mycobacterium</i> .....	16
1.2.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	18
1.2.3 Respuesta inmune ante <i>M. tuberculosis</i> .....	22
1.2.4 Diagnóstico de la enfermedad.....	25
1.2.4.1 Criterio clínico.....	25
1.2.4.2 Criterio bacteriológico.....	26
• Baciloscopia.....	26
• Cultivo bacteriano.....	27
1.2.4.3 Criterio radiológico.....	28
1.2.4.4 Criterio epidemiológico.....	29
1.2.4.5 Criterio tuberculínico.....	29
1.2.4.6 Criterio histopatológico.....	30
1.2.4.7 Ensayos de liberación de interferón gamma.....	30
1.2.5 Fármacos antituberculosos.....	31
1.2.6. Desarrollo de vacunas contra la tuberculosis.....	32
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	36

2.1 General.....	36
2.2. Específicos.....	36
<b>3. DISEÑO METODOLOGICO.....</b>	<b>37</b>
3.1 Universo, Población, Muestra.....	37
3.2. Selección de péptidos.....	37
3.3 Obtención de muestras de sangre periférica.....	38
3.4 Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	38
3.5 Ensayos de Linfoproliferación.....	40
3.5.1 Ensayos preliminares utilizando MTT.....	40
3.5.2 Ensayos utilizando CFSE.....	42
3.5.3 Procesamiento y análisis de datos.....	44
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 Selección de péptidos.....	45
4.2 Obtención de PBMC.....	47
4.3 Ensayos de Linfoproliferación.....	47
4.3.1 Ensayos preliminares utilizando MTT.....	47
4.3.2 Ensayos utilizando CFSE.....	49
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>59</b>

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Número de casos estimados de TB por país.....	15
<b>Figura 2.</b> Esquema de la envoltura celular de <i>M. tuberculosis</i> .....	20
<b>Figura 3.</b> Respuesta inmune en tuberculosis.....	24
<b>Figura 4.</b> Masa mediastínica que corresponde a una adenopatía tuberculosa con imagen de periadenitis.....	29
<b>Figura 5.</b> Nuevas vacunas para prevenir la tuberculosis.....	33
<b>Figura 6.</b> Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	42
<b>Figura 7.</b> Esquema montaje ensayo Linfoproliferación por MTT.....	44
<b>Figura 8.</b> Esquema montaje ensayo Linfoproliferación por CFSE.....	47
<b>Figura 9.</b> Linfoproliferación de PBMC por MTT.....	51
<b>Figura 10.</b> Linfoproliferación de PBMC por CFS.....	52
<b>Figura 11.</b> Linfoproliferación por estímulo de PBMC de donantes Qf+ con péptidos sintéticos derivados de proteínas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	53
<b>Figura 12.</b> Linfoproliferación por estímulo de PBMC individuos Qf- con péptidos sintéticos derivados de proteínas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	53
<b>Figura 13.</b> Evaluación respuesta inmune ante estímulo de péptidos en PBMC aisladas de donantes sanos.....	54

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Clasificación de las micobacterias no tuberculosas según Runyon.....</i>	18
<b>Tabla 2.</b> <i>Características de los medios de cultivo para micobacterias.....</i>	28
<b>Tabla 3.</b> <i>Péptidos sintéticos derivados de proteínas de M. tuberculosis H37Rv usadas en el estudio.....</i>	46
<b>Tabla 4.</b> <i>Viabilidad celular.....</i>	47





## **DETERMINACIÓN DE RESPUESTA INMUNE CELULAR GENERADA POR PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

### **RESUMEN**

Teniendo en cuenta que la tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada principalmente por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual infecta con mayor frecuencia los pulmones debido a que es transmitida por aerosoles (Tuberculosis pulmonar), además de afectar otros órganos (Tuberculosis extrapulmonar), y considerada después del SIDA como la segunda causa de muerte a nivel mundial, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia ha desarrollado una metodología lógica y racional para el diseño de vacunas sintéticas, la cual ha tenido éxito en estudios con malaria. Los avances obtenidos en el desarrollo de vacuna anti-tuberculosa han permitido establecer péptidos de alta unión específica a células blanco (HABPs), que además inhiben la entrada de la micobacteria en ensayos *in vitro*, los cuales han sido postulados para estudios como posibles candidatos a vacuna.

Dando continuidad a dicha metodología, en este proyecto mediante ensayos de linfoproliferación se evaluó parte de la respuesta inmune celular generada por péptidos sintéticos derivados de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

ante PBMC de 8 individuos clasificados por prueba de QuantiFERON Qf (4Qf+ y 4Qf-), determinando que la mayoría de los péptidos sintéticos importantes en la interacción hospedero-patógeno no son inmunogénicos.

Se estableció que los péptidos que hacen parte de las proteínas Rv0180c (31039), Rv2270 (37777) y Rv3494c (38373) estimulan la linfoproliferación de linfocitos de por lo menos 3 de los 4 individuos clasificados como Qf+, y a su vez que los resultados obtenidos contribuyen a una posible técnica de diagnóstico para diferenciar pacientes que hayan tenido contacto con *M. tuberculosis* de pacientes que no.

**Palabras clave:** Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, péptidos sintéticos, HABPs, PBMC, linfoproliferación.

**Estudiante:** Erika Tatiana Tonguino Quiñonez

**Docentes:** Deisy Carolina Rodríguez Lancheros, MsC,

Edith del Carmen Hernández Rojas, MsC.

**Instituciones:** Fundación Instituto de Inmunología de Colombia –FIDIC-;

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca –UCMC-.

**Fecha:** 16 de marzo del 2018

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada principalmente por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), el cual infecta con más frecuencia los pulmones debido a que es transmitida por aerosoles (TB pulmonar), pero también puede afectar otros órganos (TB extrapulmonar), esta enfermedad es considerada después del SIDA como la segunda causa de muertes a nivel mundial (1). En la última década el número de pacientes con tuberculosis sintomática ha tenido un incremento notable debido a diferentes condiciones de salud tales como inmunosupresión y la coinfección con el VIH-SIDA (2).

Aunque la tuberculosis es una enfermedad curable y prevenible, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que una tercera parte de la población mundial padece de tuberculosis latente, es decir, está infectada por *M. tuberculosis*, pero aún no ha desarrollado síntomas de la enfermedad ni puede transmitirla.

De aquellas personas infectadas con *M. tuberculosis* u otras micobacterias del complejo *M. tuberculosis* del 5 al 10% desarrollan la enfermedad a lo largo de la vida y dicho riesgo puede ser mayor para aquellas personas cuyo sistema esta inmunosuprimido, como es el caso de una coinfección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) diabetes o desnutrición (3).

A pesar de ser una enfermedad tratable con el uso de antibióticos, la tuberculosis muestra un aumento significativo en casos de tuberculosis multidrogoresistente. Por otra parte, la única vacuna contra la tuberculosis existente desde hace casi 100 años es la inoculación con bacilos atenuados de *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin BCG, que protege contra la TB miliar y TB meníngea en niños menores de 10 años, pero su eficiencia en la prevención de la TB pulmonar en adultos es muy variable, brindando una protección que oscila entre un 0% a un 80%.

Además, el uso de la BCG en pacientes con VIH no es recomendable, debido al alto riesgo de diseminación de la cepa de *Mycobacterium bovis*, en pacientes inmunosuprimidos, lo que demuestra la necesidad de crear una nueva vacuna eficiente que realmente ayude a prevenir la aparición de nuevos casos de tuberculosis (4).

En la actualidad se han reportado alrededor de 12 vacunas candidatas contra la tuberculosis que han llegado a ensayos clínicos, pero ninguna ha superado a la BCG hasta el momento. En el desarrollo de vacunas contra tuberculosis se presentan varias dificultades o retos: 1. La baja correlación entre la protección en modelos animales y humanos, 2. El costo y 3. Tamaño de muestras en ensayos clínicos debido a la baja incidencia regional a pesar de la alta prevalencia de la enfermedad. Es indispensable una mayor comprensión de la patogenicidad e inmunología de *M. tuberculosis*.(5)

Por su parte, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia –FIDIC- en los últimos 33 años en la búsqueda de antígenos que puedan ser empleados en una vacuna subunitaria basada en péptidos sintéticos y multiantigénica contra la malaria (6-10) y a partir de los avances en los estudios en el modelo de malaria por *Plasmodium falciparum*, la FIDIC ha propuesto una serie de principios y reglas para la obtención de una vacuna sintetizada químicamente fundamentada en secuencias cortas de aminoácidos como antígenos; reglas que podrían ser aplicadas a diferentes microorganismos causantes de diversas enfermedades En los estudios adelantados en desarrollo de vacuna contra tuberculosis se han caracterizado proteínas hipotéticas de la superficie micobacteriana que pueden estar involucradas en la interacción patógeno-hospedero, y se han encontrado algunos péptidos promisorios debido a que presentan alta capacidad de unión específica a células blanco, (HABPs, por sus siglas en inglés High Activity Binding Peptides) y que inhiben la infección de dichas células por *M. tuberculosis* H37Rv en ensayos *in-vitro*

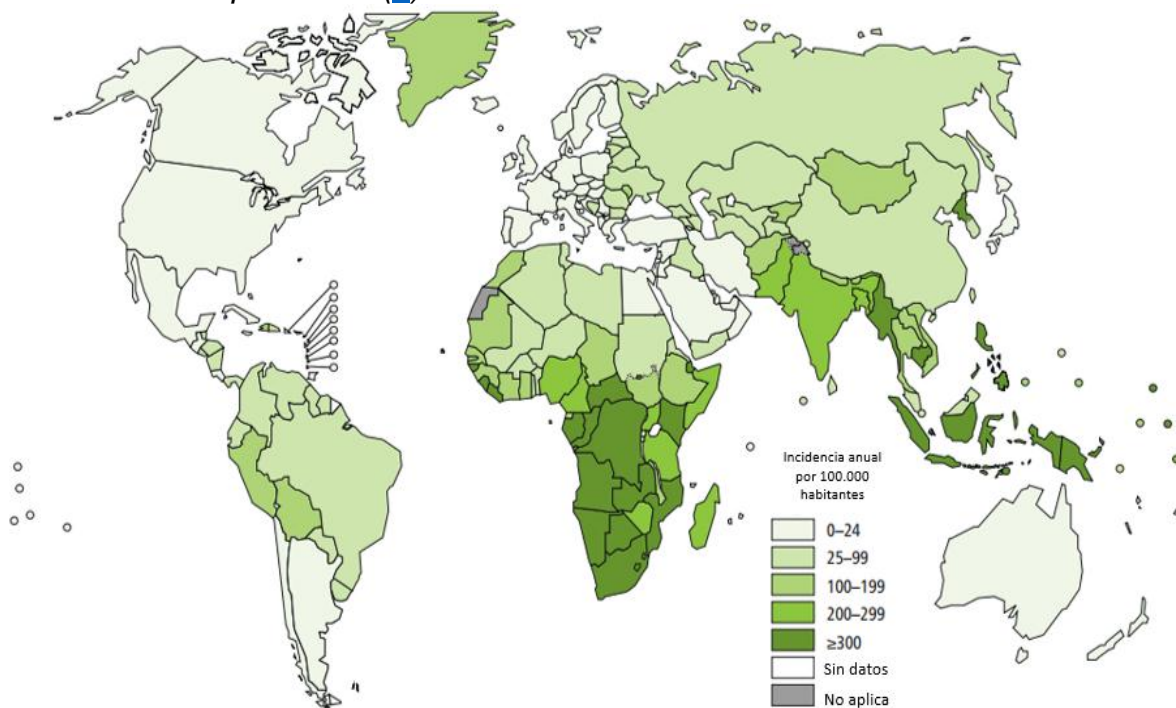
En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos en el estudio de respuesta inmune celular de diferentes individuos, frente a 31 secuencias peptídicas (HABPs) derivadas de 16 proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv (Rv0180c, Rv0227c, Rv0679c, Rv1268c, Rv1411c, Rv1490, Rv1911c, Rv1980c, Rv2004c, Rv2270, Rv2301c, Rv2560, Rv2707, Rv3166c, Rv3494c, Rv3629) que inhiben la infección de *M. tuberculosis* (11). La respuesta inmune se determinó en ensayos *in vitro* de estimulación celular de linfocitos de personas sanas clasificadas en dos grupos según prueba de Quantiferon (Qf) previamente realizada, se evaluaron células mononucleares (PBMC) de 4 personas con tuberculosis latente (Qf+) y 4 personas controles sanos que no han tenido contacto con *M. tuberculosis* (Qf-).

## 1. MARCO REFERENCIAL

### 1.1 Epidemiología de la tuberculosis

La tuberculosis es la novena causa mundial de muerte y la primera por enfermedades infecciosas por encima del VIH/Sida, la tuberculosis en el 2016 presentó una cifra estimada de muertes de 1,3 millones de individuos VIH-negativos, y de 374.000 en individuos VIH-positivos. Además, se estima que en ese mismo año de los 10,4 millones de personas que contrajeron la TB el 90% eran adultos, el 65% de sexo masculino y el 10% personas infectadas con VIH (74% en África) figura 1; con un reporte de 13.626 casos de tuberculosis en Colombia. De esta cifra, 2.147 correspondieron a coinfección con el virus de VIH con una incidencia registrada de 27,9 casos por cada 100.000 habitantes(2).

**Figura 1** Número de casos estimados de TB por país. Modificado de *Global Tuberculosis Report WHO* (2)



La TB drogorresistente sigue siendo una amenaza, para el mismo año se reportaron 600.000 casos nuevos de resistencia ante la rifampicina (TB-RR), fármaco de primera línea más eficaz; de los cuales 490.000 de estos tenían TB multirresistente (TB-MR). Cerca del 47% se produjeron en China, India y la Federación de Rusia.

Aunque la Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene como objetivo de desarrollo general, que para el periodo 2016-2035 la “Estrategia Fin a la Tuberculosis” hasta el momento el ritmo de la disminución anual se ha presentado solo en un 3% para la tasa mundial de mortalidad y en un 2% para la incidencia, presentándose muerte del 16% por TB, cifras que tendrían que aumentar en un 4% a 5% y 10% anual, para que las metas fijadas para el 2020 en la Estrategia Fin a la TB se puedan alcanzar.

Gran parte de las muertes por TB podrían evitarse si se contara con vacunas, un diagnóstico precoz y un tratamiento apropiado. Aunque entre el 2000 y 2016 con diagnóstico y tratamiento eficaz se ha evitado alrededor de 53 millones de muertes, siguen existiendo grandes lagunas a la hora de la detección y el tratamiento.

## **1.2 Generalidades de la tuberculosis**

### **1.2.1 El género *Mycobacterium***

El orden de los *Acomycetales* incluye la familia *Mycobacteriaceae*, *Actinomycetaeae*, *Streptomycetaeae* y *Nocardiscaeae*. La familia *Mycobacteriaceae* contiene solo un genero, el género *Mycobacterium* al que pertenecen las micobacterias ([12](#)).

Las micobacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos: El complejo *M. tuberculosis* (MTC) y las micobacterias no tuberculosas (MNT). Las micobacterias que hacen parte del complejo *M. tuberculosis* son una serie de organismos relacionados con patógenos humanos y animales que comparten similitud hasta del 99,9% a nivel de nucleótidos (13). El complejo, además de *M. tuberculosis*, está formado por *M. africanum* causante de tuberculosis en África, *M. microtti* causante patogénica en ratones, *M. caprae* en cabras, *M. bovis* causante de la enfermedad en bovinos, entre otras. Las MNT son *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* denominadas también atípicas, están distribuidas en el ambiente y en ocasiones colonizan la piel, el tubo digestivo y también las vías respiratorias de pacientes inmunosuprimidos produciendo lesiones ulcerosas (14).

La clasificación del género *Mycobacterium* se basa en morfología, tasa de crecimiento y pigmentación de las colonias (micobacterias pigmentadas producen carotenoides) y se representa en la tabla 1.



**Tabla 1. Clasificación de las micobacterias no tuberculosas según Runyon. Modificada de (14)**

GRUPO	I	II	III	IV
Velocidad de crecimiento	CRECIMIENTO LENTO			CRECIMIENTO RÁPIDO
	14 – 21 días	10 – 14 días	14 – 21 días	5 – 7 días
Morfología	FOTOCROMOGENAS (se tornan pigmentadas cuando se exponen a la luz)	ESCOTOCROMOGENAS (se presentan fuertemente cuando crecen en la luz u oscuridad)	NO FOTOCROMOGENA	NO FOTOCROMOGENA
Característica	Pigmento amarillo claro – Colonias rugosas	Pigmento Naranja/rojizo – Colonias lisas	No pigmentadas	No pigmentadas
Micobacteria	<i>M. kansasii</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. marinum</i> <i>M. intermedium</i> <i>M. novocastrense</i>	<i>M. szulgai</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. tusciae</i>  <i>M. kublai</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. hiberniae</i>	Complejo <i>M. avium</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. genavense</i> <i>M. haemophilus</i>  <i>M. ulcerans</i> <i>M. simiae</i> <i>M. shimoidei</i>	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. mucogenicum</i>  <i>M. peregrinum</i> <i>M. smegmatis</i>

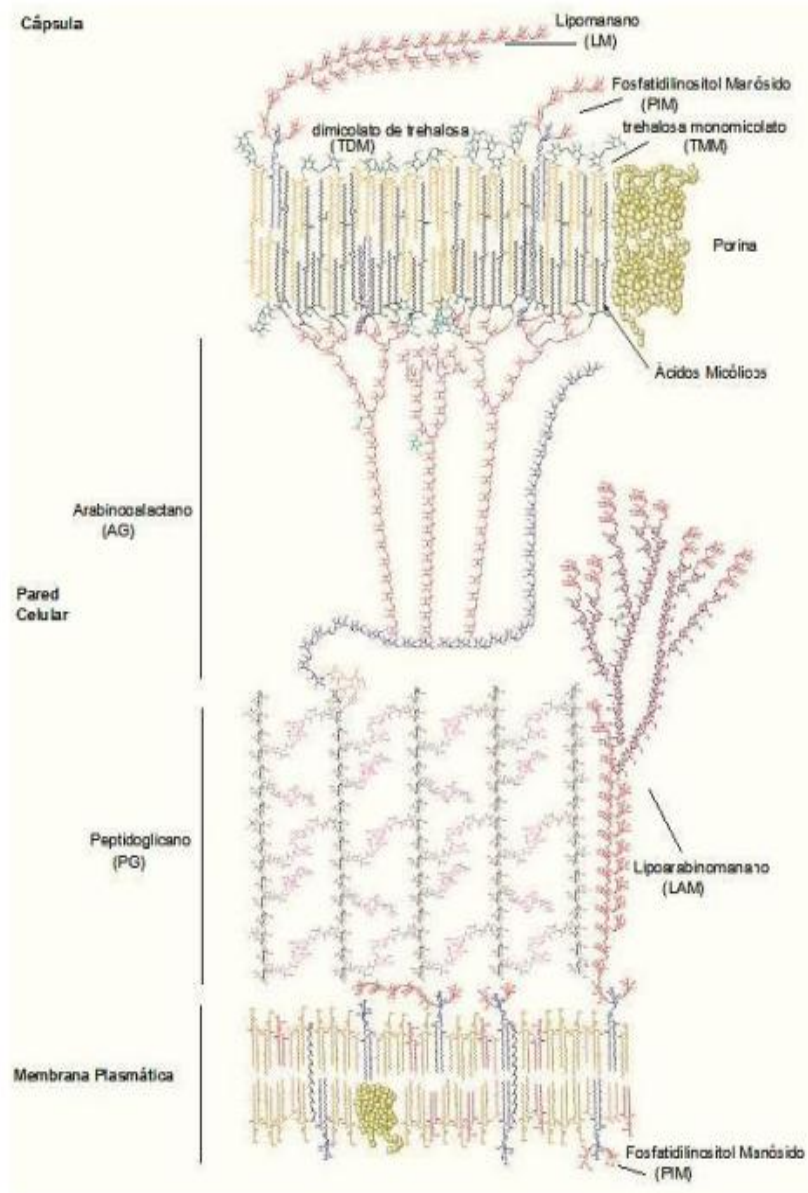
### 1.2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Las bacterias del género *Mycobacterium* son inmóviles y no-esporuladas, se agrupan en el supragénero de actinomicetos las cuales poseen un alto contenido de guanidina y citosina (G+C) en su ADN y probablemente el más alto contenido de

lípidos en la pared celular, donde se destaca la presencia de ácidos micólicos. Dichos lípidos pueden actuar como reserva de energía y de carbono para la micobacteria, involucrados en la estructura y función de membranas y de organelos membranosos. Los lípidos constituyen más de la mitad del peso de la micobacteria. La cubierta cerosa confiere las características propias del género: ácido alcohol resistencia, hidrofobicidad, resistencia al daño, incluido el ocasionado por antibióticos, diferentes propiedades inmunológicas y también posible contribución al lento crecimiento de algunas especies por la toma restringida de nutrientes (15).

La envoltura de *M. tuberculosis*, esquematizada en la figura 2 está compuesta por una membrana celular, una pared celular y una capa similar a una cápsula exterior. La membrana citoplasmática de la micobacteria no es peculiar excepto por la presencia de algunos lipopolisacáridos que también se encuentran en actinomicetales. Esta membrana provee protección osmótica y regula el tráfico de solutos específicos entre el citoplasma y el ambiente. Acerca de la membrana de *M. tuberculosis* se sabe que está rodeada por una pared que protege el contenido celular, proporciona el soporte mecánico y es responsable de la forma característica de la micobacteria.

**Figura 2** Esquema de la envoltura celular de *M. tuberculosis*. Se muestran los residuos de galactosa (azul), arabinosa (rojo), residuos succinil y galactosamina en el arabinogalactano; fosfatidilinositol manósido, lipomanano, lipoarabinomanano en rojo y residuos de arabinosa púrpura. Traducido de (16)



La pared es única entre los procariotas, está constituida por una capa de peptidoglicano interna responsable de dar forma e integridad estructural a la micobacteria, presenta un número inusual de entrecruzamientos, el arabinogalactano se encuentra unido covalentemente al peptidoglicano, esterificado con ácidos micólicos, la disposición de estos ácidos micólicos es específica de cada especie, en *M. tuberculosis* se pueden encontrar alfa, beta, ceto y metoximicolatos que contienen de 76 a 90 átomos de carbono.

La capa exterior de la pared contiene lípidos libres como dimicocerosato tioceroil (PDIM), glicolípidos fenólicos (PGL), glicolípidos que contienen trehalosa y sulfolípidos (17). Algunos glicolípidos como fosfatidil-mioinositol manosidos (PIM) lipomano (LM) y lipoarabinomano se encuentran atravesando toda la envoltura y están anclados a la membrana plasmática extendiéndose al exterior de la pared celular. La pared celular además contiene algunas proteínas que podrían ser exportadas u otras estructurantes de la pared celular durante el ciclo de vida de la micobacteria, también se encuentran algunas porinas formando canales hidrofílicos que permiten el paso pasivo de solutos acuosos a través de la capa de ácidos micólicos.

La cápsula contiene muy pocas proteínas, polisacáridos y en menor cantidad lípidos internos en rotación constante. La habilidad que distingue a *M. tuberculosis* de sobrevivir en el macrófago, su patogenicidad y sus propiedades inmunogénicas se derivan, de la naturaleza de algunas de las moléculas de la envoltura micobacteriana.

Generalmente las bacterias localizan proteínas específicas en sus envolturas celulares por modificaciones lipídicas post-traduccionales para producir lipoproteínas ancladas a membrana. En las micobacterias, éste parece ser un mecanismo muy importante por el cual las proteínas se localizan en la envoltura

celular. Las lipoproteínas presentan además significancia en la fisiología micobacteriana y posiblemente estén involucradas en la virulencia de *M. tuberculosis*, corresponden alrededor del 2,5% de su proteoma por lo que se cree que esta clase de proteínas está involucrada en interacciones hospedero-patógeno (18).

La envoltura de *M. tuberculosis* hace que sea capaz de sobrevivir durante semanas o meses sobre objetos inertes en superficies alejadas de la luz solar, procesos de desecación y calor. Además, son más resistentes a los álcalis, ácidos y desinfectantes comunes que el resto de las bacterias no formadoras de esporas, son resistentes a temperaturas muy bajas, su viabilidad es preservada durante largos periodos de tiempo (longevidad de 1-40 años) a 2-4 °C y -70°C (19)

### **1.2.3 Respuesta inmune ante *M. tuberculosis***

*M. tuberculosis* agente causal de la TB, es un patógeno intracelular obligado que se replica principalmente dentro de las células alveolares. El ciclo de la TB comprende dos fases; la fase aguda (TB activa) en la cual el paciente presenta los síntomas de la enfermedad como tos, expectoración nocturna, pérdida de peso y, la fase latente (TB latente) en la cual permanecen más del 90% de los individuos que han tenido contacto con este microorganismo, quienes no presentan síntomas ni tienen la capacidad de transmitir la bacteria a otras personas (20).

Las micobacterias tienen la habilidad de ingresar, vivir y multiplicarse dentro de los macrófagos alveolares y células no fagocíticas tales como los neumocitos tipo II, células endoteliales y fibroblastos, quienes actúan como un potencial reservorio de las mismas (21, 22).

Autores han descrito que la infección por parte de *M. tuberculosis* sigue una secuencia cronológica claramente definida que inicia con la inhalación de *M. tuberculosis* en forma de micro gotas vía aérea. En el pulmón, *M. tuberculosis* es fagocitada por macrófagos alveolares y a su vez induce una respuesta inflamatoria la cual produce el reclutamiento de células mononucleares localizadas en los vasos sanguíneos más próximos, células que son base para la formación del granuloma característico de la enfermedad. El granuloma está formado en su núcleo por macrófagos infectados, rodeados por células foamy (macrófagos espumosos), envueltos por linfocitos que delimitan la periferia de la estructura granulomatosa. Dicho granuloma es característico de contención de la fase de infección, durante la cual no se evidencia ningún signo clínico y el hospedero no transmite la enfermedad. Si se efectúan cambios en el sistema inmune la contención en el granuloma puede fallar tal es el caso en la desnutrición, co-infección con el VIH o la edad avanzada, donde el centro del granuloma sufre una caseificación y libera bacilos infecciosos, viables a las vías aéreas (23). Desarrollándose así de manera productiva facilitando la dispersión de aerosoles de *M. tuberculosis* como se ilustra en la figura 3.

La respuesta inmune protectora para el control de la tuberculosis es dada, en gran parte por la inmunidad mediada por células. Estudios en humanos y animales han demostrado la variedad de componentes del sistema inmune involucrados en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, incluyendo componentes como las células T, citosinas como IFN- $\gamma$ , IL-2, FNT- $\alpha$ , IL-6, células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos).

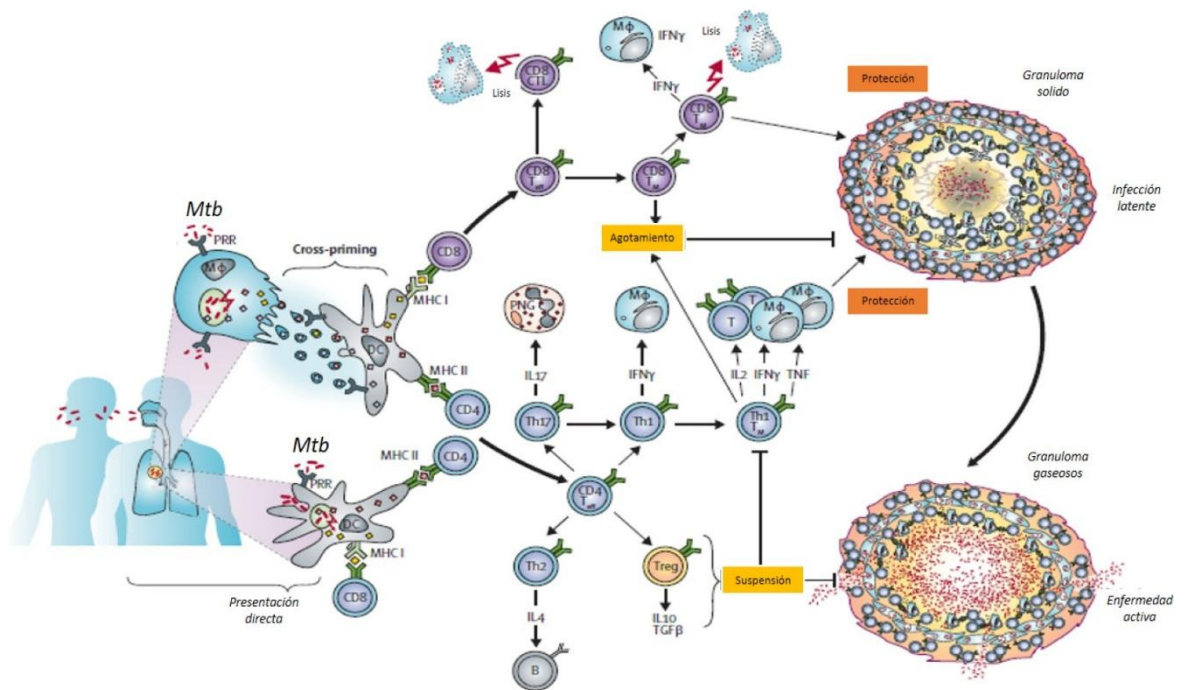
Por su localización fagosomal los antígenos de *M. tuberculosis* son presentados rápidamente a células CD4+ del tipo Th1, quienes producen INF- $\gamma$ , mediadores críticos de la protección contra la TB. De igual manera las células CD8+ también tienen un papel importante en la resistencia adquirida ante este patógeno ya que

secretan perforina y granulicina, proteínas involucradas en la lisis de células blanco infectadas con las micobacterias y que son altamente productoras de INF- $\gamma$ .

Se ha mostrado recientemente la posible presentación de antígenos cargados en moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH-I). *M. tuberculosis* induce apoptosis, resultando en formación de vesículas cargadas con proteínas micobacteriales y glicolípidos; dichas vesículas son tomadas por células dendríticas presentadoras de antígeno más eficientes del sistema inmune, permitiendo que se carguen moléculas MHCI, CMHII y CD1, estimulando de esta forma las respectivas poblaciones de células T. Al mismo tiempo el alto contenido glicolípido de estas vesículas estimula células dendríticas por vía de los Toll-Like receptors (TLRs ), estimulando más su capacidad de presentar antígenos (25) (figura 3).

Las micobacterias, dentro de las células fagocíticas, son capaces de evadir la respuesta inmune humoral y a la vez mantener su viabilidad por largos períodos de tiempo. Los linfocitos T forman parte en la activación y regulación de los macrófagos en el control del crecimiento micobacteriano. La respuesta de células TH1 que constituye la respuesta inmune protectora ante la infección por *M. tuberculosis*, es controlada por la interleuquina-1 (IL-1) e interleuquina-12 (IL-12), mediada por células T CD4 secretando interleuquina-2 (IL-2) e interferón gamma (IFN-  $\gamma$ ). En la inmunidad antimicobacteriana están implicados diferentes grupos de células T incluyendo las células T CD4 alfa/beta, las células T CD8 alfa/beta y las células T gamma/delta. Tanto las células fagocíticas como las micobacterias sintetizan proteínas con el fin de facilitar su sobrevivencia. Ensayos recientes señalan una fuerte correlación entre la producción de IFN-  $\gamma$  en las células T gamma/delta y la manifestación de tuberculosis pulmonar primaria, lo cual es consistente con la hipótesis de que estas células tienen un efecto inmune protector en la infección (26).

**Figura 3.** Respuesta inmune en tuberculosis. El control de *M. tuberculosis* es el resultado de la participación de diversas poblaciones de células T, células B y macrófagos. PRR, receptores de patrones de reconocimiento (Pattern recognition receptors); Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Factor de Necrosis Tumoral (TFN), Granulocitos Polimorfonucleares (PNGs), Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Adaptado de Kaufmann SH tomado de (24)



### 1.2.4 Diagnóstico de la enfermedad

Para el diagnóstico de la TB se deben tener en cuenta diversos criterios, clínico, bacteriológico, radiológico, epidemiológico, tuberculínico e histopatológico (27, 28).



#### **1.2.4.1 Criterio clínico**

Es fundamental distinguir los signos y síntomas sugestivos que se presentan según el órgano afectado al momento de la orientación médica, todos los pacientes sintomáticos respiratorios quienes presentan tos y expectoración por más de 15 días, son altamente sospechosos de TB ([28](#)).

#### **1.2.4.2 Criterio bacteriológico**

Es uno de los criterios más relevantes para el diagnóstico de la TB, ya que del resultado de la baciloscopia depende la inclusión de pacientes positivos en programas de prevención y control de la TB. Si se llegase a presentar casos negativos en baciloscopia de esputo, pero se tiene prueba de, tuberculina positiva se puede proceder a obtener muestras para procedimientos adicionales tales como la baciloscopia de lavado bronquial, lavado gástrico, biopsia y cultivo directo, los cuales pueden llegar a ser más precisos. El diagnóstico bacteriológico comprende ([29](#)):

- **Baciloscopia**

Técnica de elección para el diagnóstico rápido y el control del tratamiento de la tuberculosis pulmonar del adulto. Es simple económica y eficiente para detectar los casos infecciosos. Por eso es la herramienta fundamental de un programa de control de la tuberculosis, basada en el estudio de 3 muestras seriadas de esputo espontaneo, secreción bronqueo-alveolar o jugo gástrico en un periodo de tres días consecutivos, este examen se hace mediante la coloración de *Zielh-Neelsen*, la cual permite evidenciar microscópicamente los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

Dependiendo de la concentración de las micobacterias en la muestra obtenida la sensibilidad de la baciloscopia varía entre un 40 a 60%, en áreas donde existen condiciones sanitarias deficientes, la sensibilidad alcanza un 75% debido a la alta prevalencia de la enfermedad y a las condiciones avanzadas por parte de los pacientes al momento de realizar la consulta. El bajo costo y la sensibilidad del examen hacen de esta una prueba de referencia para diagnóstico de tuberculosis obligatorio e insustituible en todas las instituciones prestadores de salud a nivel nacional (IPS) (30)}

- **Cultivo bacteriano**

Se realiza para confirmar resultados obtenidos en la baciloscopia, produce resultados tardíamente pero es más sensible que la baciloscopia, puede evidenciar un mínimo de 10 a 100 bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) presentes en una muestra, permite detectar casos antes de que sean infecciosos. Existen diferentes medios de cultivo para micobacterias entre ellos los que son a base de huevo como Ogawua-Kudoh y Lowenstein-Jensen implementados en el laboratorio de bajos recursos económicos, o aquellos que son usados en el laboratorio de investigación como el caldo Middlebrook 7H9, medio Middlebrook 7H10 (tabla 2). Estos medios gracias a sus componentes nutricionales y presencia de antibióticos PACT (Polimixina B, Anfotericina B, Carbecilina y Trimetropina) y PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, Ácido nalidixico, Trimetropina y Azlocilina) hacen posible el crecimiento único de bacilos del género *Mycobacterium*. Debido al crecimiento lento de las micobacterias, el diagnóstico confirmatorio tarda hasta 20 días lo que favorece la propagación de bacilo entre la comunidad (29).

**Tabla 2.** Características de los medios de cultivo para micobacterias.

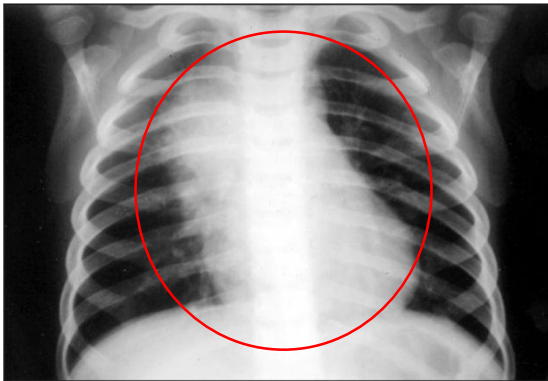
MEDIO	FUNDAMENTO DE MEDIO
Kudoh Ogawa	Medio selectivo para aislamiento y cultivo de microorganismos del género <i>Mycobacterium</i> , constituido por un conjunto de sales tales como citrato de magnesio, sulfato de magnesio, glutamato de sodio, fosfato disódico, fosfato monopotásico anhídrido, además incorpora glicerol, verde de malaquita y homogenizado de huevo; esta mezcla debe tener un pH de 6,4.
Lowenstein- Jensen	Medio para el aislamiento, cultivo y diferenciación de micobacterias, fundamentalmente <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , los nutrientes de éste medio basal, más los aportados por el agregado de la mezcla de huevos, constituyen un rico soporte para el crecimiento de una gran variedad de micobacterias excepto <i>M. leprae</i> . El verde malaquita inhibe el desarrollo de la flora acompañante Gram positiva y de algunas bacterias Gram negativas. Con el agregado de glicerina se estimula el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> ,
Middlebrook 7H9	Contiene varias sales inorgánicas que proporcionan sustancias esenciales para el crecimiento de micobacterias. El citrato de sodio, convertido en ácido cítrico, retiene determinados cationes inorgánicos en la solución. El glicerol es una fuente abundante de carbono y energía, el ácido oleico, además de otros ácidos grasos de cadena larga, puede ser utilizado por la micobacteria desempeñando un papel importante en el metabolismo y como fuente de carbono a largo plazo. La catalasa destruye los peróxidos tóxicos que pudieran estar presentes en el medio. La albumina aporta los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas y protege contra agentes tóxicos.

#### 1.2.4.3 Criterio radiológico

En la radiografía de tórax se pueden evidenciar imágenes sugestivas de TB, como la presencia de complejo primario de Ghon. Un estudio radiológico anormal por sí

solo no hace el diagnóstico de la enfermedad, éste debe ser correlacionado con la clínica del paciente (31). En la figura 4 se muestra masa mediastínica correspondiente a una adenopatía tuberculosa.

**Figura 4.** Masa mediastínica que corresponde a una adenopatía tuberculosa con imagen de periadenitis. Tomada de Antoni Martínez Roig, et al (32)



#### **1.2.4.4 Criterio epidemiológico**

Tener contacto con un caso bacilífero de tuberculosis hace positivo este criterio (signo de Combe positivo), toda persona con nexo epidemiológico debe dirigirse a su IPS para valoración médica y realización de otras pruebas diagnósticas con el fin de descartar tuberculosis activa. Este criterio es muy útil en casos de tuberculosis infantil. La tuberculosis requiere de un análisis con enfoque de determinación social que permita generar intervenciones efectivas para su control (33).

#### **1.2.4.5 Criterio tuberculínico**

Consiste en hacer una prueba cutánea de tuberculina que permite la identificación de la presencia o contacto con *M. tuberculosis*, la prueba consiste en la aplicación

intradérmica de PPD (Derivado Proteico Purificado del cultivo de *M. tuberculosis*) en el antebrazo del paciente, y la posterior medición de la reacción de induración en milímetros que forma una pápula a las 24, 48 y 72 horas, cuando dicha pápula presenta más de 5mm de diámetro se considera positivo, en el caso con pacientes que ya han recibido la vacuna antituberculosa BCG se considera como positiva una reacción de más de 15mm y para pacientes con VIH se considera como positiva la induración de cualquier tamaño. La sensibilidad y especificidad no alcanzan el 100% como prueba diagnóstica debido a que reacciones cruzadas debido a la sensibilización del sistema inmune causada por la administración previa de la vacuna BCG o de la exposición a micobacterias no tuberculosas y puede presentar falsos negativos en las personas infectadas con VIH o aquellas que reciben terapias inmunosupresoras, en estado de desnutrición, personas de la tercera edad, personas con alguna coinfección como sarampión, varicela, tosferina, entre otros ([31](#), [34](#)).

#### **1.2.4.6 Criterio histopatológico**

Se hace basado en una biopsia de tejido y el diagnóstico es positivo cuando hay granulomas con necrosis, caseificación y Ziehl-Neelsen positivo, con excepción de casos de adenitis post vacunal e inflamación de una glándula o ganglio linfático, producida a consecuencia de la vacunación con BCG ([28](#)).

#### **1.2.4.7 Ensayos de liberación de Interferón-Gamma $INF-\gamma$**

IGRA (por sus siglas en inglés Interferon-Gamma Release Assays), es una técnica implementada en los últimos años en la búsqueda de mejorar el diagnóstico actual de la TB latente, en la prueba se detecta el interferón gamma producido por células T previamente sensibilizadas por antígenos específicos de *M. tuberculosis*

principalmente CFP-10, TB7.7 y ESAT-6. En la actualidad se cuenta con dos pruebas en el mercado.

✓ **QFT – GIT (QuantiFeron® TB – Gold in tube)** Es una prueba indirecta para determinar la infección por *M. tuberculosis* implementando la tecnología ELISA basada en la medición de la respuesta inmune. Dicha respuesta se mide tras la estimulación de manera *in vitro* de células T con 3 proteínas presentes en el complejo *M. tuberculosis* CFP-10, TB7.7 y ESAT-6.

En la prueba se detecta la liberación de INF- $\gamma$  por parte de las células T que reconocen el antígeno debido a contacto o infección previa con micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, Las cepas de BCG y la mayoría de las micobacterias no tuberculosas no sintetizan las proteínas implementadas en la prueba; por lo tanto el resultado de los pacientes vacunados con BCG o infectados con micobacterias ambientales debe ser negativo.

Para realizar la prueba se emplean 3 tubos que se sirven con el kit de reactivos: El primero incluye los antígenos tuberculosos específicos ESAT-6, CFP-10, TB 7.7 (tubo problema); el segundo contiene fitohemaglutinina (tubo control positivo) y el tercero no contiene reactivos (tubo control negativo). Para la prueba se requiere 1ml de sangre extraída directamente en cada tubo. Posteriormente, y previa agitación de los tubos, se lleva a cabo la incubación de éstos durante 18-22h a 37°C, luego los tubos son centrifugados y el plasma obtenido se emplea para realizar el ELISA que permite detectar y cuantificar el INF- $\gamma$  liberado por los linfocitos T del paciente. Después de la incubación, el plasma puede almacenarse varias semanas sin que se afecten los resultados.

✓ **T-SPOT, TB®** Prueba diagnóstica *in vitro* para la detección de las células T efectoras que responden a la estimulación de antígenos de *M. tuberculosis* y que está diseñada para facilitar el diagnóstico de la infección tuberculosa. Este análisis

es una versión simplificada de método de análisis inmunoenzimático (ELISPOT), única técnica validada para medir de forma directa la función de las células T efectoras (secretoras de INF- $\gamma$ ) activadas específicamente ante un cuadro de tuberculosis.

### **1.2.5 Fármacos antituberculosos**

Una vez se ha diagnosticado la enfermedad, es de vital importancia iniciar el tratamiento. Los fármacos antituberculosos se clasifican en dos grupos, los de primera y segunda línea, los primeros son formulados para casos nuevos de tuberculosis, entre ellos se encuentran Isoniazida (H), Rifampicina €, Pirazinamida (Z), Estreptomina (ES) gracias a su efecto bactericida y finalmente el Etambutol € que impide el crecimiento y reproducción bacteriana por su efecto bacteriostático (35), por otra parte entre los fármacos de segunda línea, están los que se administran a pacientes que presenten reacciones adversas y resistencia a los antibióticos de primera línea como kanamicina (Ka), Amikacina (Ak) (36), Capreomicina (Cp), Rifabutina, Rifapentina (Rp), Ácido para aminoalicólico (PAS), Etionamida (Et), Levofloxacina (Levo), Moxifloxacina (Moxi), los cuales se ha demostrado que tienen mayores efectos secundarios (32, 33).

La prolongación del tratamiento y el abandono temprano de éste ha hecho que los fármacos no sean efectivos a la hora de actuar contra *M. tuberculosis*, debido a la resistencia que han adquirido los bacilos a los fármacos tanto de primera como de segunda línea, éstas micobacterias se denominan como multidrogorresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (X-MDR) al tratamiento (35).

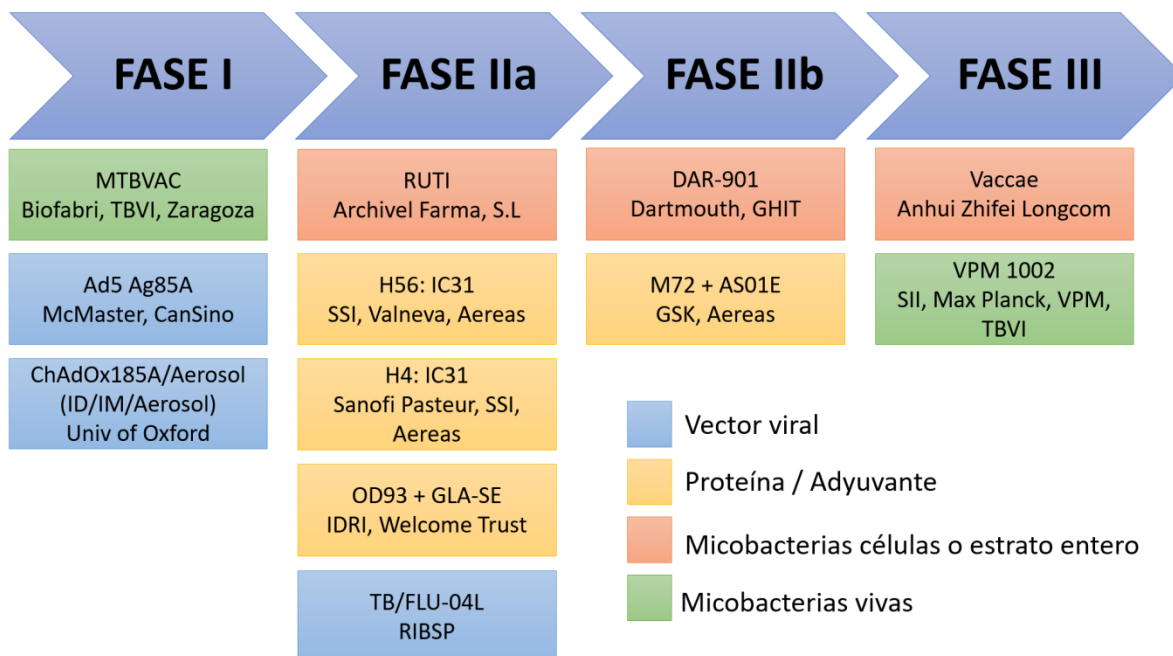
### **1.2.6 Desarrollo de vacunas contra la tuberculosis**

Actualmente se cuenta con la vacuna BCG, desarrollada hace casi 100 años, que protege principalmente en la primera infancia de tuberculosis, sin embargo la protección en adultos contra tuberculosis pulmonar es muy variable (2, 37). Los mecanismos de inmunidad mediada por BCG aún no son claros, y actualmente se cuenta con un gran número de personas que presentan tuberculosis latente y una alta morbilidad por tuberculosis a pesar de la vacunación con BCG (37).

La publicación del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv ha representado un enorme avance en cuanto al diseño de fármacos y la búsqueda de antígenos candidatos a vacuna contra la tuberculosis. Dentro de los actuales candidatos a vacuna se encuentran 13 ensayos clínicos, la mayoría dirigidos a la prevención de la infección y otros para evitar que las personas con tuberculosis latente (TBL) desarrollen la enfermedad en estado activo, gran parte de estas vacunas que se encuentran en etapa de investigación, incorporan antígenos secretados tempranamente durante la infección por TB, pero una tendencia actual se centra en los antígenos relacionados con los acontecimientos posteriores, como la latencia y reanimación de latencia de *M. tuberculosis*. Los principales tipos de estos candidatos de vacunas son antígenos de *M. tuberculosis* en vectores virales y antígenos de proteínas recombinantes en combinación con adyuvantes., Figura 5.



**Figura 5.** Nuevas vacunas para prevenir la tuberculosis, tomado y traducido de (38)



Las proteínas recombinantes pueden ser poco inmunogénicas cuando se administran solas, ya que muchas veces no tienen el peso, complejidad, tamaño características químicas, configuración espacial y carga eléctrica requeridos para ser vistos por el sistema inmune, permanecer y provocar una respuesta inmune, a pesar de sus ventajas, ya que pueden ser producidos a bajo precio, a gran escala y en un nivel muy alto de pureza; es así como para mejorar la respuesta inmune a las vacunas de recombinantes, es necesario administrarlas junto con un adyuvante. Uno de los obstáculos en el desarrollo de vacunas anti-bacterianas ha sido la falta de adyuvantes eficaces en la estimulación de la inmunidad mediada por células, que a la vez sean suficientemente seguros para ser utilizados en seres humanos. Los únicos adyuvantes de vacunas aprobados para uso humano hoy en día son las sales de aluminio AS03/04 y MF59, que promueven estimulan principalmente una respuesta humoral ayudando a que el antígeno usado como vacuna sea detectado por el sistema inmune (39, 40).

La Fundación Instituto de Inmunología de Colombia –FIDIC-, mediante estudios realizados durante más de 30 años ha propuesto una metodología lógica y racional para el desarrollo de vacunas a partir del modelo de malaria ([6-10](#)), que lleva a la identificación de antígenos peptídicos funcionalmente importantes y propone desarrollo de vacunas sintéticas basadas en subunidades.

En el caso de *M. tuberculosis* se usan como blanco para ensayos *in vitro* las líneas celulares U937 ATCC® CRL-1593.2™ (células monocíticas derivadas a macrófagos) y A549 ATCC® CLL-185™ (células epiteliales alveolares). En este modelo los antígenos corresponden a proteínas de la envoltura micobacteriana los cuales son sintetizados en péptidos de 20 aminoácidos no superpuestos.

En resumen se sigue la siguiente metodología para la selección de péptidos promisorios para vacuna contra tuberculosis: 1. A partir de conocimiento del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv publicado en 1998 ([41-43](#)), Se seleccionan proteínas de superficie y promisorias en la interacción hospedero-patógeno haciendo uso de herramientas bioinformáticas 2. Se determina la presencia y transcripción de genes codificantes para las proteínas seleccionadas mediante ensayos de PCR, 3. Se determina la expresión de las proteínas seleccionadas mediante inmunoensayos como western blot e inmuno-microscopía electrónica, 4. Se sintetizan péptidos de 20 aminoácidos que cubren la secuencia completa de las proteínas y realizan ensayos para identificar secuencias de alta capacidad de unión específica a células blanco, 5. Se evalúa la capacidad de inhibición de la entrada de *M. tuberculosis* H37Rv a células blanco *in vitro* que presentan los péptidos previamente identificados, y 6. Se determina la estructura secundaria de los péptidos por dicroísmo circular con el fin de establecer una correlación estructura-función. Los péptidos de alta unión específica que inhiban la entrada de *M. tuberculosis* y que presenten características de estructura secundaria determinadas deben ser

analizadas en cuanto a la respuesta inmune que puedan generar *in vitro* y en modelos animales para determinar posteriormente su capacidad protectora.

Siguiendo la metodología descrita, el grupo funcional de Tuberculosis de la FIDIC ha publicado los resultados obtenidos para 29 proteínas, dentro de las cuales se encuentran: Rv0180c, Rv0227c, Rv0679c, Rv1268c, Rv1411c, Rv1490, Rv1911c, Rv1980c, Rv2004c, Rv2270, Rv2301c, Rv2560, Rv2707, Rv3166c, Rv3494c, Rv3629, con secuencias peptídicas que han sido propuestas como antígenos candidatos para el diseño de la vacuna sintética contra tuberculosis ([44-52](#)).

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 General**

Determinar la respuesta inmune celular a partir de ensayos de linfoproliferación de células mononucleares humanas generada por péptidos sintéticos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv.

## **2.2 Específicos**

- Seleccionar péptidos sintéticos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* que hayan sido reportados como de alta unión específica y a su vez estén involucrados en la inhibición a la invasión a líneas celulares A549 y U937.
- Evaluar la división celular *in vitro* de linfocitos T derivados de PBMC inducida por péptidos sintéticos en pacientes sanos clasificados por prueba de Quantiferon.

## **3. DISEÑO METODOLOGICO**

### 3.1 Universo, Población, Muestra

- **Universo:** Péptidos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv.
- **Población:** Péptidos sintéticos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv.
- **Muestra:** Péptidos sintéticos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv, sintetizados en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC- HABPs de por lo menos una línea celular blanco de infección con *M. tuberculosis*.

### 3.2 Selección de péptidos

Se utilizaron 31 péptidos de las proteínas de *M. tuberculosis* Rv0180c, Rv0227c, Rv0679c, Rv1268c, Rv1411c, Rv1490, Rv1911c, Rv1980c, Rv2004c, Rv2270, Rv2301c, Rv2560, Rv2707, Rv3166c, Rv3494c y Rv3629, los cuales presentaban secuencias funcionalmente importantes para la interacción *M. tuberculosis*-célula blanco HABPs y que inhiben la entrada de *M. tuberculosis*, estos péptidos (pureza>90%) fueron suministrados por el grupo funcional Síntesis química de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC.

### 3.3 Obtención de muestras de sangre periférica

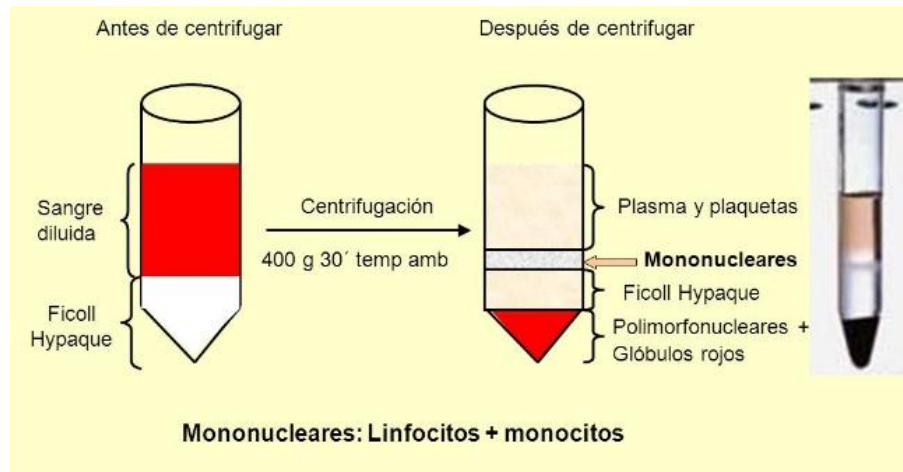
Se tomaron muestras de sangre periférica a 8 individuos (con firma previa de consentimiento informado y registro en base de datos) a los que previamente se les había aplicado prueba de Quantiferon®. Los individuos 1 a 4 presentan prueba Qf+ y los individuos 5 a 8 presentan prueba Qf-, como se muestra en la tabla 3. Por individuo se extrajeron 5 tubos de sangre heparinizados de 10ml.

### 3.4 Separación de Células Mononucleares (PBMC)

Las muestras de sangre total, se centrifugaron a 400xg durante 10 minutos para separar la fracción plasmática de la fracción celular, a continuación, se recolectó el plasma y guardó debidamente rotulado a -20°C, con pipeta pasteur se retiró la capa blanca de células (Buffy coat) y transfirió a un tubo de 15ml completando 4ml con RPMI suplementado. El concentrado leucocitario se sometió a gradiente de Ficoll-Hypaque en una relación 2:1 (4ml muestra, 2ml ficoll), La muestra fue vertida cuidadosamente sobre la superficie del Ficoll-Hypaque sin perturbar la interface, deslizándola lentamente por la pared del tubo inclinado, se evidenciaron dos fases, una inferior con Ficoll-Hypaque y una superior con la mezcla de células y medio (figura 6), las muestras fueron centrifugadas a 2800 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente, con pipeta pasteur se descartó la capa superior (medio RPMI + plaquetas) y se succiono cuidadosamente la capa intermedia correspondiente a las células mononucleares (PBMCs) que se transfirieron a otro tubo de 15ml para resuspenderlas en 5 ml de RPMI 10% de Suero Fetal Bovino (SFB). Se realizaron 2 lavados con RPMI 10% SFB, centrifugando a 30000 rpm durante 5 min. Finalmente se descartó sobrenadante, resuspendió el pellet en 5ml de RPMI suplementado y por medio de la técnica de azul de tripán en cámara de Neubauer se realizó conteo celular y evaluó la viabilidad durante todo el ensayo (viabilidad del 84 – 96%) (53).

$$\text{No. Células} = (\text{Suma de células contadas por campo}/4) * \text{Factor de dilución} * \text{Volumen} * 10.000$$

**Figura 6.** Obtención de células mononucleares de sangre periférica por Ficoll-Hypaque. Tomado y modificado (54)



### 3.5 Ensayos de Linfoproliferación

#### 3.5.1 Ensayos preliminares utilizando MTT

En el ensayo de linfoproliferación se usa la sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide), un compuesto fotosensible que es convertido por las células en cristales de formazan, la reacción se da gracias a la enzima succinato deshidrogenasa de la mitocondria. La cantidad de cristal formado es proporcional con el número de células presentes, midiendo tanto la viabilidad como el número de células.

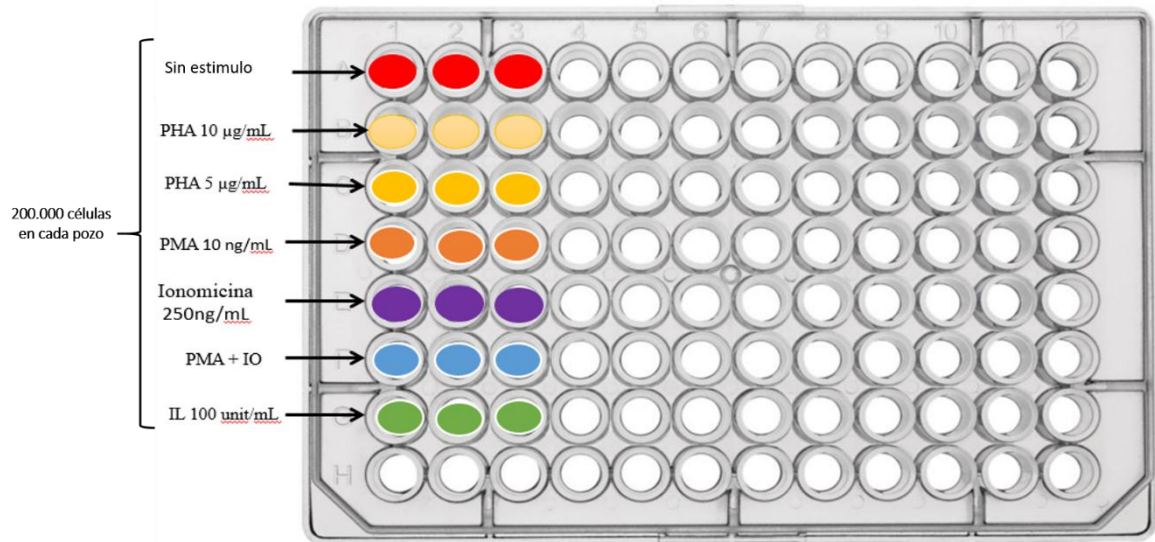
Se evaluaron por triplicado 6 estímulos para seleccionar el control positivo de la prueba. En un platos de 96 pozos fondo redondo, se depositaron 200.000 células de un solo donante por cada pozo, resuspendidas en 100µl de RPMI 10% SFB, seguido a esto se adicionaron los estímulos fitohemaglutinina (PHA) 5 y 10 µg/mL, IL-2 100 U/mL (humana recombinante), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 10ng/mL, Ionomicina 250 ng/mL, PMA 10ng/mL+ Ionomicina 250ng/mL Cada

estímulo fue resuspendido en un volumen final de 100µl en RPMI 10% SFB. Las células con los estímulos fueron incubadas durante 5 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>., pasados los días de incubación se retiraron de cada pozo 50 µl de sobrenadante y se adicionaron 10 µl de reactivo MTT disueltos en 40 µl de medio. La caja se incubó esta vez en oscuridad a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 12 horas hasta que se evidenció la formación de cristales de formazan.

Para disolver los cristales de formazan se adicionaron 100µl por pozo del detergente dodecilsulfato sódico (SDS) y se dejó en oscuridad a temperatura ambiente y sin agitación durante 12 horas. Finalmente se realizó lectura en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570nm (máxima absorción) y los datos obtenidos fueron analizados en Excel. Se tomó como significativo valores de Índice de Estimulación (IE) >2.0, ya que refiere que las células se han dividido por lo menos una vez (positivos ante proliferación) ([55](#), [56](#)).



**Figura 7.** Esquema montaje ensayo Linfoproliferación por MTT. Se montan estímulos por triplicado para determinar control positivo.



Siguiendo la misma metodología se determinó la concentración ideal en la cual el estímulo con mayor índice de estimulación es óptimo para ser usado como control positivo, se ensayaron las concentraciones de 1, 5 10 y 20 µg/mL).

El índice de estimulación se calculó con la siguiente formula:

$$\text{Índice de Estimulación (IE)} = \frac{\text{Promedio de absorbancias de estímulos}}{\text{Promedio de absorbancias del control negativo}}$$

### 3.5.2 Ensayos utilizando CFSE

El ensayo de linfoproliferación usa CFSE (diacetato de carboxifluoresceína succinimidil-éster) que permite medir división celular de linfocitos unidos covalentemente a fluoróforos. Una célula marcada con CFSE se divide y todas sus generaciones están marcadas con la mitad de la carboxifluoresceína de la generación anterior y por tanto cada división celular puede ser evaluada midiendo la disminución de fluorescencia por citometría de flujo.

Para la marcación fluorescente de las células, se ajustó la concentración de células a 19.800.000 células/mL (para una concentración final de 200.000 células por pozo) resuspendidas en medio RPMI 10% SFB y se les adicionó CFSE a una concentración final de 1 $\mu$ M, se homogenizó y, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado este tiempo se adicionó el mismo volumen de RPMI 20% SFB, se homogenizó y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, se realizó dos lavados con 5mL de RPMI 10% SFB centrifugando a 30000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 30000 rpm durante 5 minutos, descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en medio RPMI 10% SFB, y se pusieron las muestras en cajas de 96 pozos fondo redondo a un volumen de 100 $\mu$ l por pozo. Se realizaron ensayos preliminares para seleccionar control positivo evaluando PHA 5 y 10  $\mu$ g/mL, IL-2 100 uni/mL, PMA 10ng/mL, Ionomicina 250 ng/mL, PMA 10ng/mL+ Ionomicina 250ng/mL, confirmatorios; ya que anteriormente se habían evaluado por kit *MTT*. Se adicionaron triplicados de cada uno de los estímulos (péptidos sintéticos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv a una concentración de 100 $\mu$ g/ml c/u, control positivo de PHA a 10 $\mu$ g/ml) y como control negativo se usaron células marcadas con CFSE sin estímulo. El esquema de montaje del ensayo se muestra en la Figura 8. Las células fueron incubadas con los estímulos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 3 días en el caso del control positivo y durante 5 días para las células estimuladas con los péptidos sintéticos. Cumplido el tiempo de incubación se centrifugaron las placas de 96 pozos a 30000 rpm por 5 minutos, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se almacenó a -20°C en tubos Eppendorf de

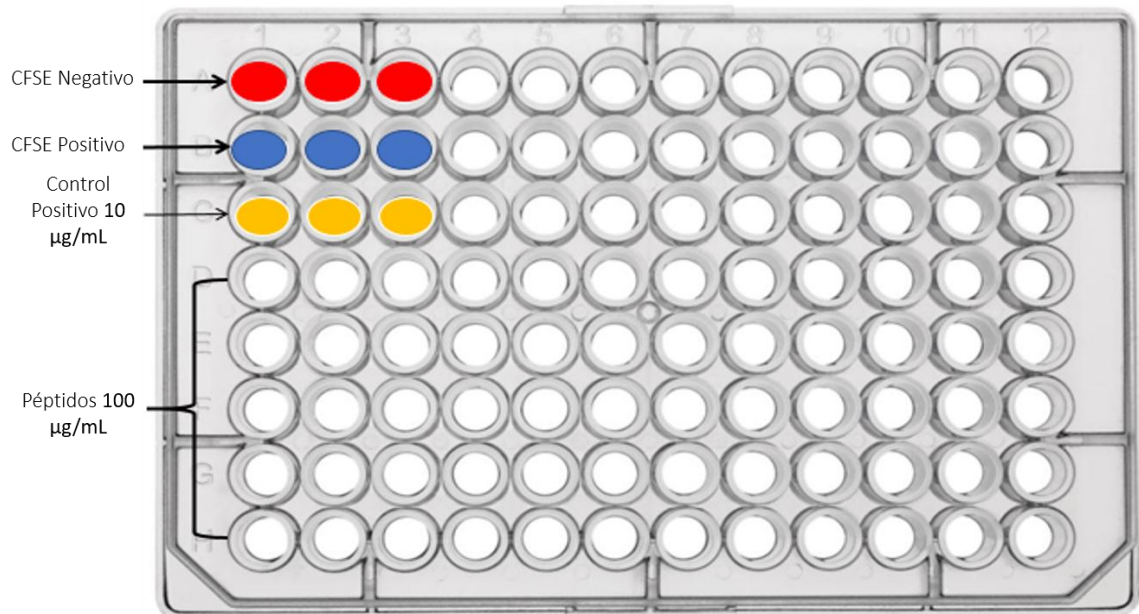
200uL para posterior determinación de citocinas (no hace parte de los objetivos planteados en este trabajo). Las células se transfirieron a tubos de citometría de flujo y se llevó a volumen final de 300µl con PBS 1X ([57-59](#))

Las muestras fueron leídas en un citómetro de flujo FACScan II (Becton-Dickinson, NJ, USA) adquiriendo 10.000 eventos acumulables dentro de la población de linfocitos. Para fijar y confirmar ubicación de la población de linfocitos se ejecutó un ensayo marcando células con anti-CD3-PercPe humano (Biolab).

El índice de estimulación se calculó con la siguiente formula:

$$\text{Índice de Estimulación (IE)} = \frac{\text{Promedio de generaciones con estímulos}}{\text{Promedio de generaciones del control negativo}}$$

**Figura 8.** Esquema montaje ensayo Linfoproliferación por CFSE. Rojo: Control negativo de Células (Células sin marcar con CFSE); Azul: Control Positivo Marcaje de Células (Células marcadas con CFSE); Amarillo: Control Positivo Estímulos (Células marcadas con CFSE más control positivo de estímulo); Blanco: Células marcadas con CFSE más péptidos sintéticos de *M. tuberculosis* H37Rv. Por pozo 200.000 células resuspendidas en 100µl de RPMI 10% SFB.



### 3.5.3 Procesamiento y análisis de datos

Los datos obtenidos en el citómetro fueron procesados en la plataforma de análisis FLOWJO v.8 (BD), opción linfoproliferación. Todas las gráficas y cálculos comparativos en los ensayos de linfoproliferación se realizaron en Excel 2016.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Selección de péptidos

Se seleccionaron 31 péptidos sintéticos (HABPs) derivados de 16 proteínas de superficie de *M. tuberculosis* H37Rv que cumplen con los criterios de presentar alta capacidad de unión específica a las células blanco de infección y a su vez inhibir la entrada de la micobacteria, de manera dependiente de la concentración, en ensayos *in vitro* (11, 44-52). En la tabla 4 se registran el número asignado a cada péptido según la codificación interna de la FIDIC, la secuencia de cada péptido, la ubicación de los aminoácidos en la proteína y el nombre de la proteína de la cual son derivados.

**Tabla 3.** Péptidos sintéticos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv usadas en el estudio.

PROTEINA	PEPTIDO	SECUENCIA
<b>Rv0180c</b>	31024	<sup>41</sup> AALYLGGILNPMTNLRHFPI <sup>60</sup>
	31025	<sup>61</sup> ALVNEDAGPAGQQMDGLVSY <sup>80</sup>
	31028	<sup>121</sup> RDFGASAVTPTRTDRPAIT <sup>140</sup>
	31032	<sup>201</sup> KSTAYNPLPNGTGNLSAFY <sup>220</sup>
	31039	<sup>341</sup> LGLPSAGATVPLEAVPAFFRY <sup>360</sup>
	31044	<sup>433</sup> EHQAQYQARQSARESSEQP
<b>Rv0227</b>	16945	<sup>281</sup> LKPEVTFADYQVTSTEETVE <sup>300</sup>
	16951	<sup>402</sup> AQPPPPPDAGHPDPGPERRY <sup>421</sup>
<b>Rv0679c</b>	30987	<sup>146</sup> YKNGDPTIDNLGAGNRINKE <sup>165</sup>
<b>Rv1268c</b>	37964	<sup>21</sup> ANALGLASPADAAAGIMYGD <sup>40</sup>
<b>Rv1411c</b>	37096	<sup>181</sup> APPFATQPVPATVWIQETGY <sup>200</sup>
<b>Rv1490</b>	11073	<sup>282</sup> FGRVESHADYHDWVCEHVTP <sup>300</sup>
<b>Rv1911c</b>	37763	<sup>1</sup> MESPMTSTLHRTPLATAGLAY <sup>16</sup>
	37765	<sup>37</sup> YPKATTVDATTPAPAAEPL <sup>56</sup>
	37767	<sup>77</sup> GANVAPPLTWSSPAGAAELAY <sup>96</sup>
<b>Rv1980c</b>	36827	<sup>42</sup> TQIQMSDPAYNINISLPSY <sup>60</sup>
	31101	<sup>41</sup> CQIQMSDPAYNINISLPSY <sup>60</sup>
	31107	<sup>161</sup> IVQGELSKQTGQQVSIAPNAY <sup>180</sup>
<b>Rv2004c</b>	9111	<sup>261</sup> AGYAVRSGDTAPASLRDFY <sup>280</sup>
<b>Rv2270</b>	37775	<sup>22</sup> TSSNGARGGIASNMMNPTNPY
	37777	<sup>61</sup> ETWINLQVGDTLADLPPADLY <sup>80</sup>
	37780	<sup>121</sup> GFAPYTGQSVDTSPYSVAYL <sup>140</sup>
<b>Rv2301c</b>	30960	<sup>112</sup> CPNTRLVPGGYSLGAAVTDV <sup>131</sup>
<b>Rv2560</b>	11024	<sup>121</sup> VVALSDRATTAYTNTSGVSS <sup>140</sup>
<b>Rv2707</b>	16084	<sup>301</sup> RIGVGTTTTYSSTAQHSAAVY <sup>320</sup>
<b>Rv3166c</b>	16295	<sup>181</sup> LITSRRQRKSAPARISGDRIY <sup>200</sup>
	16298	<sup>241</sup> MERELSHVPGVAPQDFDTPY <sup>260</sup>
	16300	<sup>281</sup> VSLFAEARFSPHVMNEEHREY <sup>300</sup>
<b>Rv3494c</b>	38373	<sup>81</sup> HMLNSGTAIPSNVTATVRSY <sup>100</sup>
<b>Rv3629</b>	16645	<sup>81</sup> VFPLAIWTTAGLDPVRAE <sup>100</sup>
	16646	<sup>101</sup> LALRPPAHGALEFADGSPSY <sup>120</sup>

(\*) Los números en superíndice indican la posición del aminoácido en la proteína.

## 4.2 Obtención de PBMC

El porcentaje de viabilidad celular para todos los individuos se estableció entre el 84% y el 96% con un promedio de PBMC de  $2,7 \times 10^7$ .

**Tabla 4.** *Viabilidad celular*

Resultado Qf	Individuo	PBMC	Viabilidad %
+	1	27.800.000	92
+	2	27.200.000	86
+	3	25.670.000	84
+	4	29.500.000	89
-	5	23.008.000	90
-	6	27.070.000	85
-	7	26.800.000	87
-	8	30.400.000	84

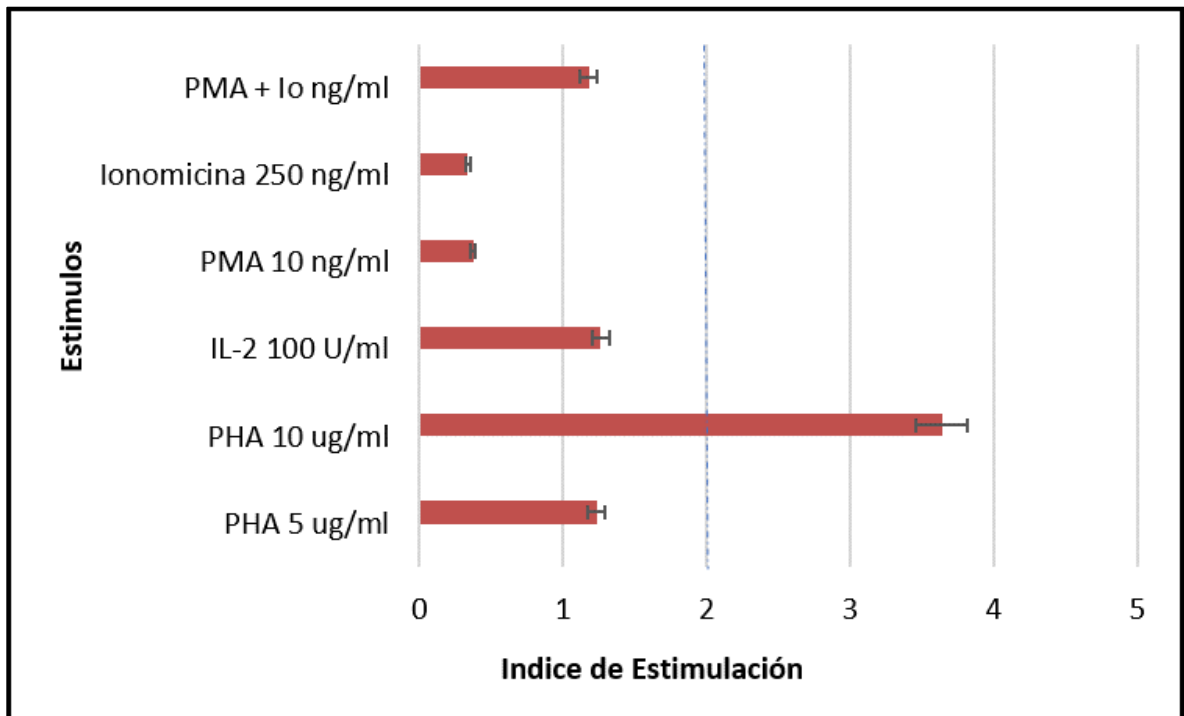
## 4.3 Ensayos de Linfoproliferación

Para este estudio, un Índice de estimulación  $> 2.0$  se consideró positivo ([60](#)). De acuerdo con este criterio tenemos que:

### 4.3.1 Ensayos preliminares utilizando MTT

Mediante ensayos con MTT se determinó como control positivo el estímulo PHA 10  $\mu\text{g/ml}$  con índice de estimulación 3.6 como se observa en la figura 9.

**Figura 9.** Linfoproliferación de PBMC de un donante medida por MTT. Evaluación de diferentes mitógenos.



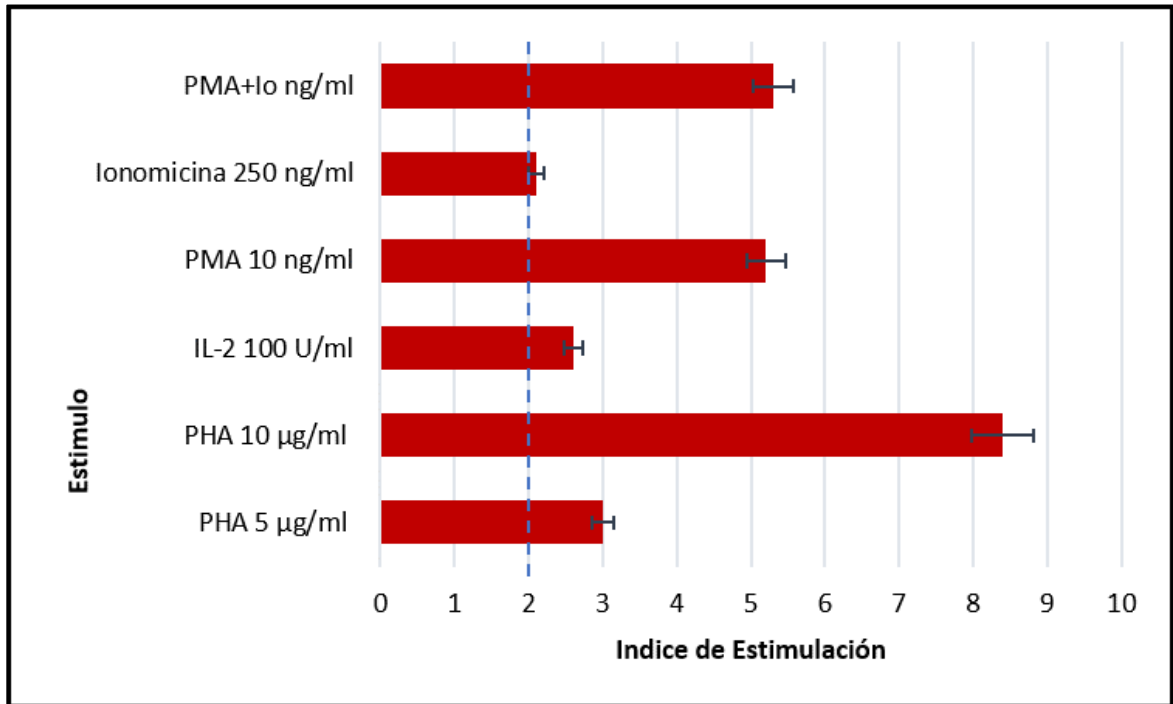
Por otra parte al evaluar diferentes concentraciones de PHA se determinó que la concentración con mejor I.E fue de 10  $\mu\text{g/ml}$ , siguiendo con el método de MTT, como se observa en la figura 10 con índice de estimulación de 3.7.

#### 4.3.3 Ensayos utilizando CFSE

Se determinó que el mejor control positivo es PHA a 10  $\mu\text{g/ml}$  para los ensayos donde se empleó CFSE; en esta condición se obtuvo un índice de estimulación de 8.4 como se observa en la figura 10.

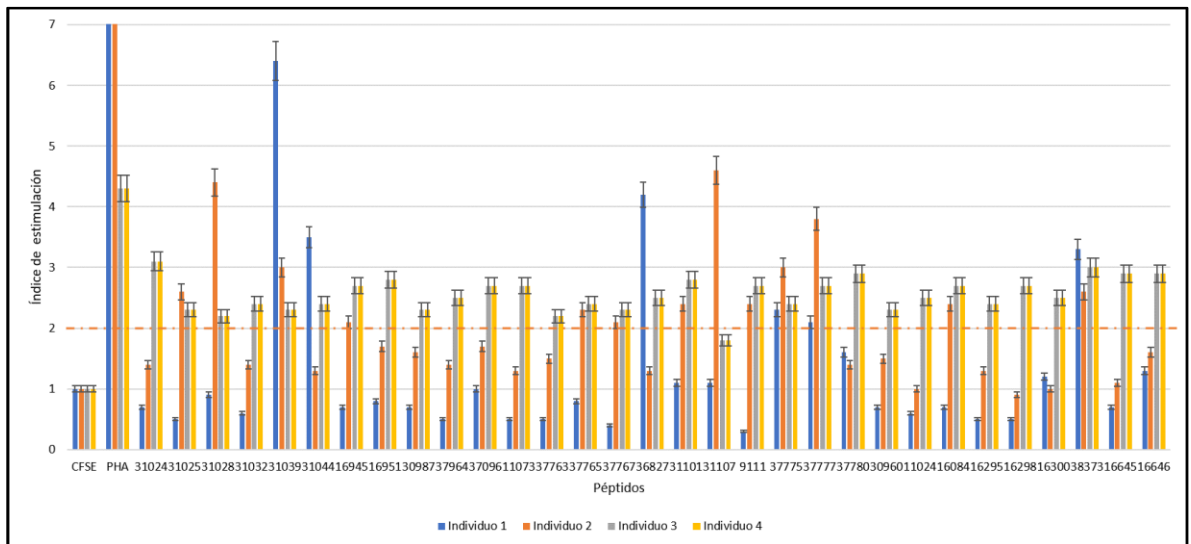


**Figura 11.** Linfoproliferación de PBMC de un donante medida por CFSE. El control negativo fueron PBMC marcadas con CFSE sin estimulación.

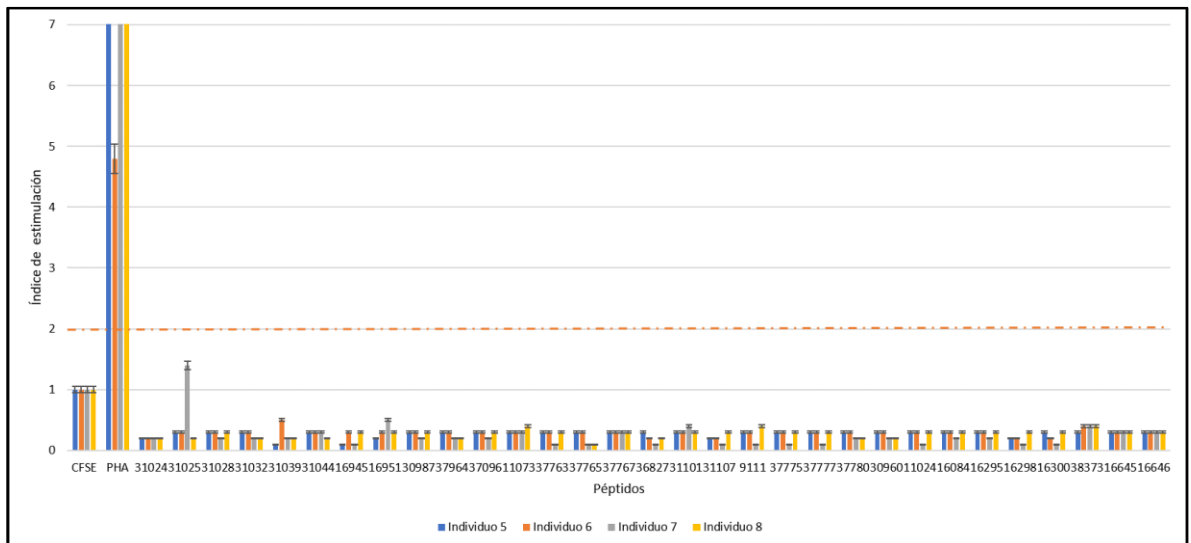


Como una aproximación a la respuesta inmune celular generada por los 31 péptidos derivados de proteínas de *M. tuberculosis*, se evaluó la linfoproliferación de PBMC aisladas de 8 individuos sanos clasificados en dos grupos por prueba de Qf. De acuerdo con el criterio antes mencionado se evidenció linfoproliferación particularmente alta en PBMC aisladas de individuos Qf+ (individuos 1 a 4) en comparación a los Q- (individuos 5 a 8), como se observa en las figura 11, 12 y 13.

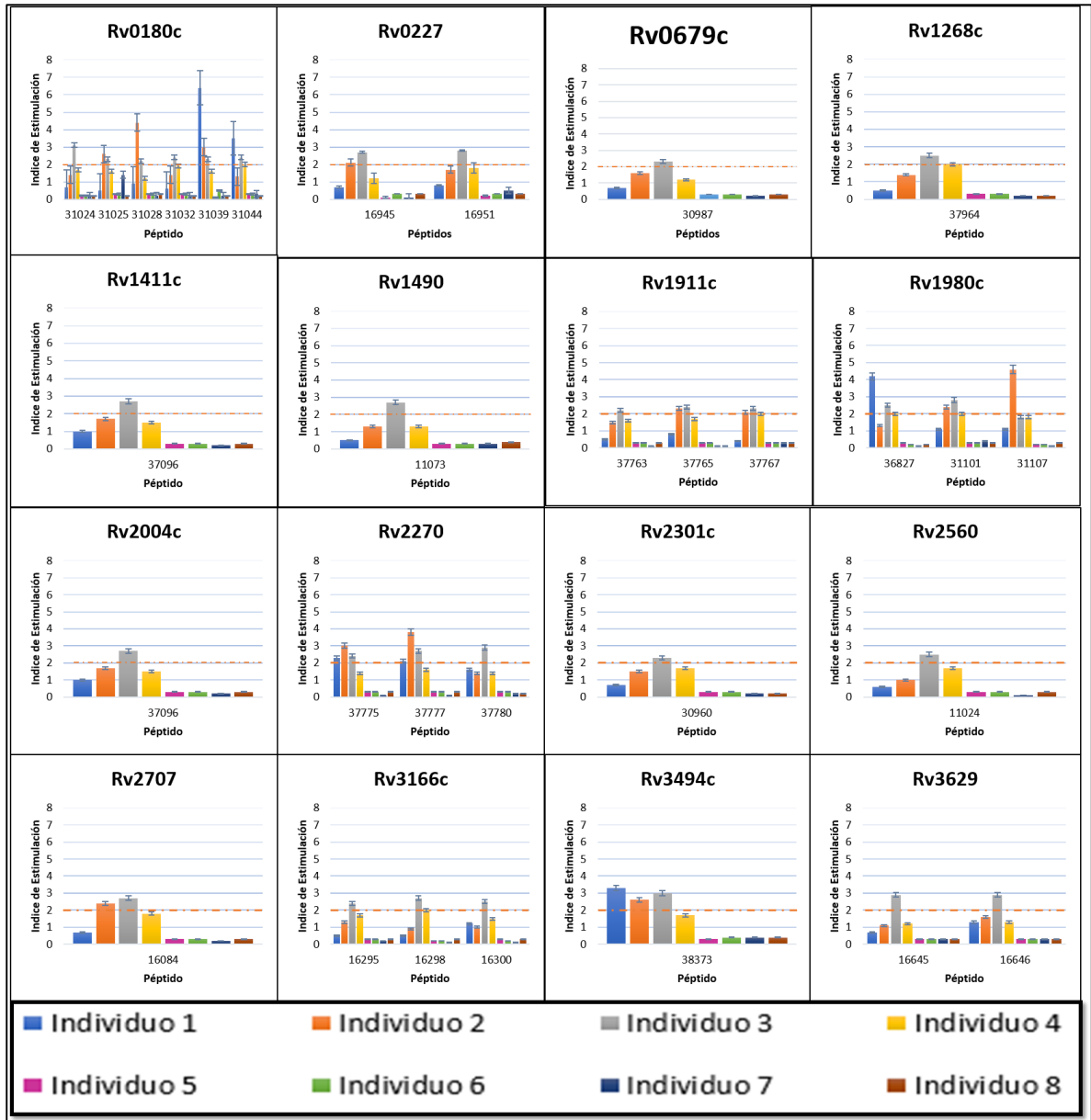
**Figura 11.** Linfoproliferación de PBMC de donantes Qf+ con péptidos sintéticos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv.



**Figura 12.** Linfoproliferación por estímulo de PBMC de donantes Qf- con péptidos sintéticos derivados de proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv.



**Figura 13.** Evaluación respuesta inmune ante estímulo de péptidos en PBMC de donantes sanos. Qf+ (individuos 1 a 4) y Qf-(individuos 5 a 8).



## 5. DISCUSIÓN

Las investigaciones dirigidas a desarrollar tratamientos inmunoproliféricos contra la tuberculosis (TB) son muchas, sin embargo, no se han encontrado estrategias eficientes contra esta enfermedad debido a los mecanismos de patogenia y evasión de la respuesta inmune de la micobacteria; por lo que siendo una de las enfermedades humanas más antiguas aún es catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema de salud pública (2). Considerando lo anterior, se han propuesto diversas vacunas que buscan mediante múltiples estrategias inducir inmunidad protectora con la intención de reemplazar, potenciar o servir como refuerzo a la vacuna BCG. Esa vacuna se caracteriza por ser variablemente efectiva (0-80%) y tener un buen desempeño previniendo la meningitis tuberculosa en infantes, no obstante, no atiende a las necesidades que plantea la TB pulmonar en adultos (4).

Ahora bien, la metodología planteada por FIDIC, se basa en el estudio de proteínas localizadas en la envoltura celular de la micobacteria que podrían estar implicadas en la interacción hospedero – patógeno. Este trabajo presenta los resultados obtenidos para 31 péptidos sintéticos derivados de 16 proteínas de superficie de *M. tuberculosis H37Rv*, enfocados a determinar la capacidad que presentan los péptidos de inducir la proliferación de linfocitos T de una población de pacientes agrupados por prueba de liberación de INF- $\gamma$  como criterio serodiagnóstico.

De acuerdo con los resultados, para todos los individuos, se puede inferir que el ser Qf+ o Qf- no influye sobre el número de células (PBMC) obtenidas de sangre periférica ni sobre su viabilidad. La cantidad de PBMC se encuentran dentro de los rangos normales reportados para individuos sanos.

Preliminarmente fue necesario establecer cuál de los agentes mitógenos para proliferación de linfocitos T reportados en la literatura (PHA-M, PMA, IL-2 e Ionomicina) presentaría un índice de estimulación mayor, con el objetivo de seleccionarlo como control positivo de nuestro ensayo de linfoproliferación. Con el método de cuantificación por MTT solamente se evidenció un IE mayor a 2 para PHA a una concentración de 10µg/mL, mientras que los demás mitógenos y PHA a 5µg/mL presentaron IE menor a 1,5 contrario a lo referenciado en la literatura (61). La concentración óptima de PHA se confirmó posteriormente en un ensayo a diferentes concentraciones donde también se pudo determinar el tiempo de incubación con mitógeno que evitaba muerte celular. Por otra parte, implementando la cuantificación por citometría de flujo empleando CFSE, se encontró que todos los estímulos evaluados presentan IE mayor a 2 lo que los cataloga como buenos mitógenos y se confirmó como mejor mitógeno PHA a 10µg/mL. Estas discrepancias en cuanto a estos resultados se deben muy probablemente, a la falta de especificidad y estandarización del uso de MTT en la cuantificación de la proliferación celular. Además la técnica de MTT presenta dificultades metodológicas que afectan su reproducibilidad.

Es así como se seleccionó la marcación con CFSE como el método apropiado para la valoración de la capacidad de estímulo celular que presentan los HABPs de proteínas de *M. tuberculosis H37Rv*. Otros factores que favorecen el uso de la citometría de flujo son la selección de la población celular de interés, la especificidad por biomarcadores de superficie, la cuantificación por emisión de fluorescencia y la posibilidad de tinción fluorescente intracelular sin afectar la viabilidad celular y/o morfología (62, 63).

Teniendo en cuenta lo anterior, con el fin de determinar si los péptidos son capaces de generar respuesta inmune celular, se evaluaron los HABPs de las proteínas Rv0180c (31024; 31025; 31028; 31032; 31039; 31044), Rv0227c (16945; 16951),

Rv0679c (30987), Rv1268c (37964), Rv1411c (11073), Rv1911c (37763; 37765; 37767), Rv1980c (36827; 31101; 31107), Rv2004c (9111), Rv2270 (37775; 37777; 37780), Rv2301c (30960), Rv2560 (11024), Rv2707 (16084), Rv3166c (16295, 16298, 16300), Rv3494 (38373) y Rv3629 (16645; 16646). Estas proteínas tienen en común su posible localización en la superficie de la micobacteria lo que hace pensar que puedan estar involucrados en interacciones hospedero-patógeno y los péptidos ensayados corresponden a secuencias con alta capacidad de unión específica a células blanco de infección (macrófagos derivados de monocitos y células epiteliales alveolares humanas) que inhiben la entrada de la micobacteria en ensayos *in vitro*.

A partir de los resultados obtenidos se estableció que las diferentes poblaciones celulares de todos los individuos respondieron de manera adecuada al estímulo inespecífico con PHA.

La linfoproliferación, como parte de la respuesta inmune celular, generada por los péptidos sintéticos mostró un índice de estimulación mayor en PBMC de individuos Qf+ en contraste con lo observado en individuos Qf-. Este resultado podría explicarse teniendo en cuenta que la prueba de Quantiferon indica que los individuos Qf+ producen INF- $\gamma$  gracias a la memoria conferida por el contacto previo con el agente etiológico de la TB, determinación que se hace con antígenos específicos (ESAT-6, CFP-10 y TB7.7) procedentes de *M. tuberculosis* de donde se derivan también los péptidos objeto de este estudio (64). Mientras que los individuos Qf- no responden ante ningún estímulo con péptidos derivados de proteínas de *M. tuberculosis*.

Al analizar de manera individual, los resultados por cada péptido se encuentra que los péptidos 31039 (<sup>341</sup>LGLPSAGATVPLEAVPAFFRY<sup>360</sup>) de la proteína Rv0180c, 37777 (<sup>61</sup>ETWINLQVGDTLADLPPADLY<sup>80</sup>) de la proteína Rv2270 y 38373

(<sup>81</sup>HMRLNSGTAIPSNVTATVRSY<sup>100</sup>) de la proteína Rv3494c generan IE superiores a 2 en PBMC de por lo menos 3 de los 4 individuos clasificados como Qf+, mientras que los demás péptidos aunque generan mayor respuesta que en los PBMC QF-, no superan el umbral de positividad. Se hace necesario confirmar estos resultados en poblaciones de individuos más numerosas.

Aunque aún no se han determinado las citocinas en los sobrenadantes del ensayo de linfoproliferación, cabe suponer que los péptidos estudiados presentan capacidad de estimular PBMC, probablemente favoreciendo la producción de TNF- $\alpha$ , citocina que se encuentra directamente relacionada con la proliferación de timocitos. Además de citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y el IFN- $\gamma$ .

Para las proteínas Rv0180c, Rv2270 y Rv3494c no se encuentran reportes previos de evaluación de respuesta inmune generada por éstas o por secuencias derivadas de ellas, a excepción de las publicaciones realizadas por el grupo de la FIDIC que identifican los HABPs, refiriendo que dichas secuencias no comparten elementos comunes en relación estructura-función ([48](#), [50](#), [65](#)). Teniendo en cuenta los resultados de los estudios de malaria que la FIDIC ha adelantado en los últimos 30 años, los péptidos con alta capacidad de unión específica a las células blanco que inhiben la entrada del patógeno en ensayos *in vitro* no son inmunogénicos. Sin embargo, la modificación estructural secundaria de estas secuencias mejora su capacidad antigénica y las convierte en moléculas potencialmente prometedoras en la prevención de la infección por el patógeno. Estudios posteriores permitirán corroborar esta hipótesis.

## 6. CONCLUSIONES

- De las 16 proteínas caracterizadas por la FIDIC, 31 péptidos sintéticos derivados de estas son de unión específica y a su vez tienen capacidad de inhibir la invasión a células blanco.
- A pesar de que los 31 péptidos sintéticos derivados de las proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv inducen respuesta linfoproliferativa en PBMC de donantes sanos clasificados como QF+, solo los péptidos 31039 (Rv0180c), 37777 (Rv2270) y 38373 (Rv3494) presentan un IE  $\geq 2$  en PBMC de por lo menos 3 de los 4 individuos.
- Ninguno de los péptidos seleccionados induce linfoproliferación en PBMC de ninguno de los donantes clasificados como Qf-, por lo cual se establece una posible técnica de diagnóstico para diferenciar pacientes que hayan tenido contacto con *M. tuberculosis* de pacientes que no.



## 7. RECOMENDACIONES

- Determinar la respuesta inmune con la técnica de CFSE empleando como estímulo los péptidos 31039, 37777 y 38373 con una corte más grande de pacientes para corroborar su uso como posible técnica de diagnóstico que permita diferenciar pacientes que hayan tenido contacto con *M. tuberculosis* de aquellos pacientes que no.
- Cuantificar las citocinas secretadas cuando se llevó a cabo el estímulo con los péptidos sintéticos para determinar si existe un perfil relacionado con la linforpoliferación.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Kovacs-Simon A, Titball R, Michell SL. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infection and immunity*. 2011;79(2):548-61.
2. WHO. Global Tuberculosis Report. Report. World Health Organization, 2017.
3. Enfermedades CpeCylPdI. Factores de Riesgo de la Tuberculosis. 01-02-2018; Available from: <https://www.cdc.gov/tb/esp/topic/basics/risk.htm>.
4. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *The Lancet*. 1995;346(8986):1339-45.
5. Evans TG, Brennan MJ, Barker L, Thole J. Preventive vaccines for tuberculosis. *Vaccine*. 2013;31:B223-B6.
6. Lozano JM, Patarroyo ME. A rational strategy for a malarial vaccine development. *Microbes and infection*. 2007;9(6):751-60.
7. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. *Accounts of chemical research*. 2008;41(3):377-86.
8. Patarroyo M, Cifuentes G, Bermudez A, Patarroyo M. Strategies for developing multi-epitope, subunit-based, chemically synthesized anti-malarial vaccines. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(5b):1915-35.
9. Patarroyo ME, Cifuentes G, Martínez NL, Patarroyo MA. Atomic fidelity of subunit-based chemically-synthesized antimalarial vaccine components. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2010;102(1):38-44.
10. Cifuentes G, Bermudez A, Rodriguez R, Patarroyo M, Patarroyo M. Shifting the polarity of some critical residues in malarial peptides' binding to host cells is a key factor in breaking conserved antigens' code of silence. *Medicinal Chemistry*. 2008;4(3):278-92.
11. Ocampo M, Patarroyo MA, Vanegas M, Alba MP, Patarroyo ME. Functional, biochemical and 3D studies of Mycobacterium tuberculosis protein peptides for an effective anti-tuberculosis vaccine. *Critical reviews in microbiology*. 2014;40(2):117-45.
12. Dorronsoro I, Torroba L, editors. *Microbiología de la tuberculosis*. Anales del sistema sanitario de Navarra; 2007: SciELO Espana.
13. Chan VL. Bacterial genomes and infectious diseases. *Pediatric research*. 2003;54(1):1-7.
14. García JG, Gutiérrez JP, Antuña AS. Respiratory infections caused by environmental mycobacteria. 2005 [cited 41 4]; 206-19]. Available from: <http://www.aeras.org/annualreport2016>.
15. L. B. The Basic of Clinical Bacteriology. In: Palomino JC CLS, Ritacco V Editors, editor. 2007;Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007.

16. Kaur D, Guerin ME, Škovierová H, Brennan PJ, Jackson M. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in applied microbiology*. 2009;69:23-78.
17. Gonzalo-A.Jesus MD, Martin Carlos and Aguilo Nacho. MTBVAC: Attenuating the Human Pathogen of Tuberculosis (TB) Toward a Promising Vaccine against the TB Epidemic. 2017.
18. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2003;83(1):91-7.
19. Trabajo INdSeHee. *Mycobacterium tuberculosis*: viabilidad, propagación y transmisión Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 23 de Septiembre de 2012.
20. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature reviews Immunology*. 2001;1(1):20.
21. Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. 2003;57(1):641-76.
22. García-Pérez BE, Mondragón-Flores R, Luna-Herrera J. Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microbial pathogenesis*. 2003;35(2):49-55.
23. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(1):39.
24. Kaufmann SH, Hussey G, Lambert P-H. New vaccines for tuberculosis. *The Lancet*. 2010;375(9731):2110-9.
25. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nature medicine*. 2003;9(8):1039.
26. Figueroa MCEG-S. Respuesta Inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2001;14(2):114-28.
27. Goicochea CR, Castillo SB, Tarazona PC, Narvaez CC, Última JC, Última RC, et al. Asociación de criterios de Stegen modificado por Toledo para el diagnóstico de tuberculosis pediátrica, Hospital Belén de Trujillo. *UCV-SCIENTIA*. 2015;4(1):64-71.
28. Tincopa Wong OW, Castro L, Lelie K, Plasencia Angulo WF, Valverde López JC. Tuberculosis cutánea: Rasgos clínicos, histopatológicos y epidemiológicos en un Hospital General de Trujillo, Perú. *Dermatol peru*. 2006;16(3):220-32.
29. Abbate E, Vescovo M, Natiello M, Cufre M, García A, Ambroggi M, et al. Tuberculosis extensamente resistente (XDR-TB) en Argentina: aspectos destacables epidemiológicos, bacteriológicos, terapéuticos y evolutivo. 2007.
30. Cavanaugh JS, Shah NS, Cain KP, Winston CA. Survival among Patients with HIV Infection and Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis-United States, 1993–2006. *PLoS One*. 2012;7(10):e47855.
31. Arteaga Arteaga A, Vélez Moncada E, Salazar Blanco OF, Morales Múnera OL, Cornejo Ochoa JW, Valencia Pino DC. Clinical and sociodemographic characteristics of children, younger than 13 years, with or without a confirmed diagnosis of pulmonary tuberculosis, at Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín, Colombia, 2007-2008. *Iatreia*. 2010;23(3):227-39.
32. Abbate EH, Palmero DJ, Castagnino J, Cufre M, Doval A, Estevan R, et al. Tratamiento de la tuberculosis: Guía práctica elaborada por la Sección Tuberculosis, Asociación Argentina de Medicina Respiratoria. *Medicina (Buenos Aires)*. 2007;67(3):295-305.

33. Garzón MC, Angée DY, Llerena C, Orjuela DL, Victoria JE. Vigilancia de la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos antituberculosos, Colombia 2004-2005. *Biomédica*. 2008;28(3):319-26.
34. Arias Guillén M, Palomar R, Arias M. Avances en el diagnóstico de la infección tuberculosa latente en pacientes en tratamiento renal sustitutivo. *Nefrología (Madrid)*. 2011;31(2):137-41.
35. Cardoso EM. Multiple drug resistance: a threat for tuberculosis control. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2004;16(1):68-73.
36. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(5):352.
37. Moliva JI, Turner J, Torrelles JB. Prospects in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette et Guerin (BCG) vaccine diversity and delivery: why does BCG fail to protect against tuberculosis? *Vaccine*. 2015;33(39):5035-41.
38. AERAS. GLOBAL CLINICAL PIPELINE OF TB VACCINE CANDIDATES. Information is self-reported by vaccine sponsors. 26/2017. Available from: <http://www.aeras.org/annualreport2016>.
39. Agger EM, Cassidy JP, Brady J, Korsholm KS, Vingsbo-Lundberg C, Andersen P. Adjuvant modulation of the cytokine balance in *Mycobacterium tuberculosis* subunit vaccines; immunity, pathology and protection. *Immunology*. 2008;124(2):175-85.
40. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and cell biology*. 2004;82(5):488.
41. Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Erratum: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;396(6707):190.
42. Song H, Sandie R, Wang Y, Andrade-Navarro MA, Niederweis M. Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2008;88(6):526-44.
43. Vizcaíno C, Restrepo-Montoya D, Rodríguez D, Niño LF, Ocampo M, Vanegas M, et al. Computational prediction and experimental assessment of secreted/surface proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *PLoS computational biology*. 2010;6(6):e1000824.
44. Patarroyo MA, Curtidor H, Plaza DF, Ocampo M, Reyes C, Saboya O, et al. Peptides derived from the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1490 surface protein implicated in inhibition of epithelial cell entry: Potential vaccine candidates? *Vaccine*. 2008;26(34):4387-95.
45. Ocampo M, Aristizábal-Ramírez D, Rodríguez DM, Muñoz M, Curtidor H, Vanegas M, et al. The role of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3166c protein-derived high-activity binding peptides in inhibiting invasion of human cell lines. *Protein Engineering, Design & Selection*. 2012;25(5):235-42.
46. Forero M, Puentes A, Cortés J, Castillo F, Vera R, Rodríguez LE, et al. Identifying putative *Mycobacterium tuberculosis* Rv2004c protein sequences that bind specifically to U937 macrophages and A549 epithelial cells. *Protein science*. 2005;14(11):2767-80.
47. Rodríguez DC, Ocampo M, Reyes C, Arévalo-Pinzón G, Muñoz M, Patarroyo MA, et al. Cell-Peptide Specific Interaction Can Inhibit *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Infection. *Journal of cellular biochemistry*. 2016;117(4):946-58.
48. Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Specific Interaction between *Mycobacterium tuberculosis* Lipoprotein-derived Peptides and Target Cells Inhibits Mycobacterial Entry In Vitro. *Chemical biology & drug design*. 2014;84(6):626-41.

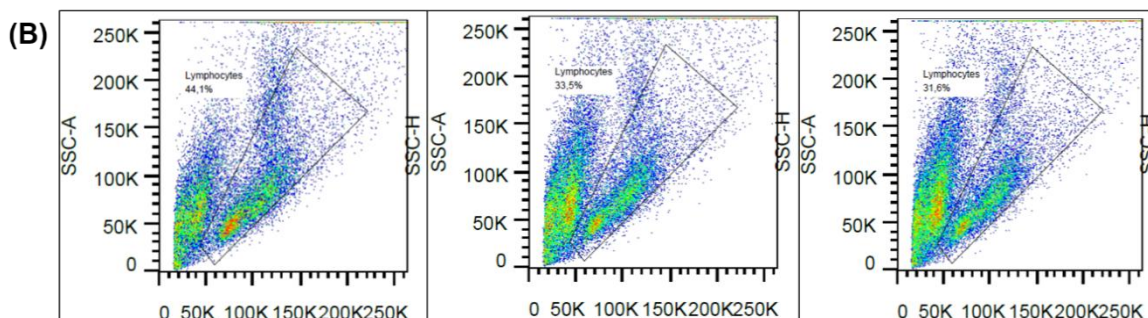
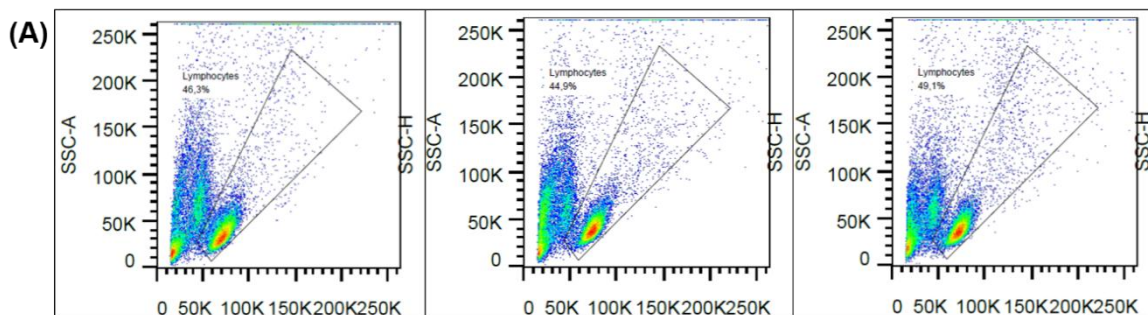
49. Plaza DF, Curtidor H, Patarroyo MA, Chapeton-Montes JA, Reyes C, Barreto J, et al. The Mycobacterium tuberculosis membrane protein Rv2560– biochemical and functional studies. *The FEBS journal*. 2007;274(24):6352-64.
50. Rodríguez DC, Ocampo M, Varela Y, Curtidor H, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Mce4F Mycobacterium tuberculosis protein peptides can inhibit invasion of human cell lines. *Pathogens and disease*. 2015;73(3).
51. Rodríguez DM, Ocampo M, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Mycobacterium tuberculosis surface protein Rv0227c contains high activity binding peptides which inhibit cell invasion. *Peptides*. 2012;38(2):208-16.
52. Rodríguez D, Vizcaíno C, Ocampo M, Curtidor H, Pinto M, Elkin Patarroyo M, et al. Peptides from the Mycobacterium tuberculosis Rv1980c protein involved in human cell infection: insights into new synthetic subunit vaccine candidates. *Biological chemistry*. 2010;391(2/3):207-17.
53. Profile BSD, Workstation BO, Controller BB, Controller BAS, Sensor BS. Product description. *Migration*. 2011;3:4.
54. Bøyum A. Separation of white blood cells. *Nature*. 1964;204(4960):793-4.
55. Profile BSD, Workstation BO, Controller BB, Controller BAS, Sensor BS. Product description. *Migration* 2011. p. 4.
56. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*. 1986;89(2):271-7.
57. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 1994;171(1):131-7.
58. Parish CR, Glidden MH, Quah BJ, Warren HS. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Current protocols in immunology*. 2009;4.9. 1-4.9. 13.
59. Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature protocols*. 2007;2(9):2049.
60. Martínez P, López C, Saravia C, Vanegas M, Patarroyo MA. Evaluation of the antigenicity of universal epitopes from PvDBPII in individuals exposed to Plasmodium vivax malaria. *Microbes and infection*. 2010;12(14-15):1188-97.
61. Arenas-Ramírez N, Woytschak J, Boyman O. Interleukin-2: biology, design and application. *Trends in immunology*. 2015;36(12):763-77.
62. Revelen R, D Arbonneau F, Guillevin L, Bordron A, Youinou P, Dueymes M. Comparison of cell-ELISA, flow cytometry and Western blotting for the detection of antiendothelial cell antibodies. *Clinical and experimental rheumatology*. 2002;20(1):19-26.
63. Nguyen XD, Eichler H, Dugrillon A, Piechaczek C, Braun M, Klüter H. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. *Journal of immunological methods*. 2003;275(1-2):57-68.
64. Behr MA. Comparative genomics of mycobacteria: some answers, yet more new questions. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(2):a021204.
65. Cáceres SM, Ocampo M, Arévalo-Pinzón G, Jiménez RA, Patarroyo ME, 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):1-10.

## ANEXOS

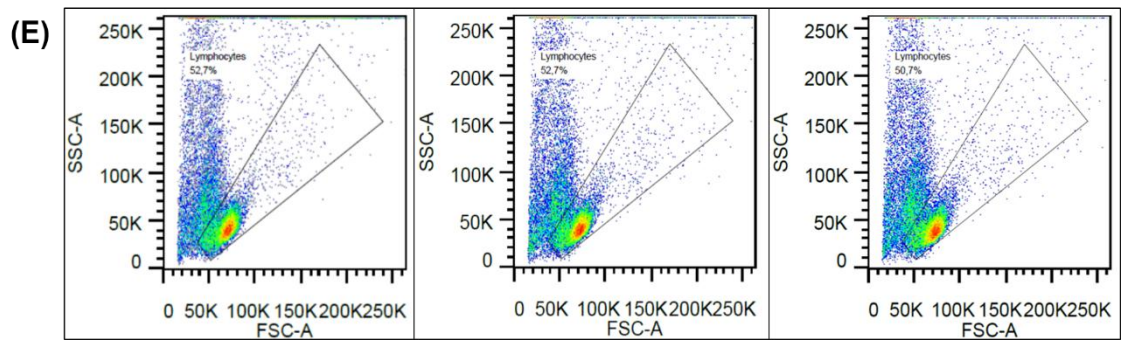
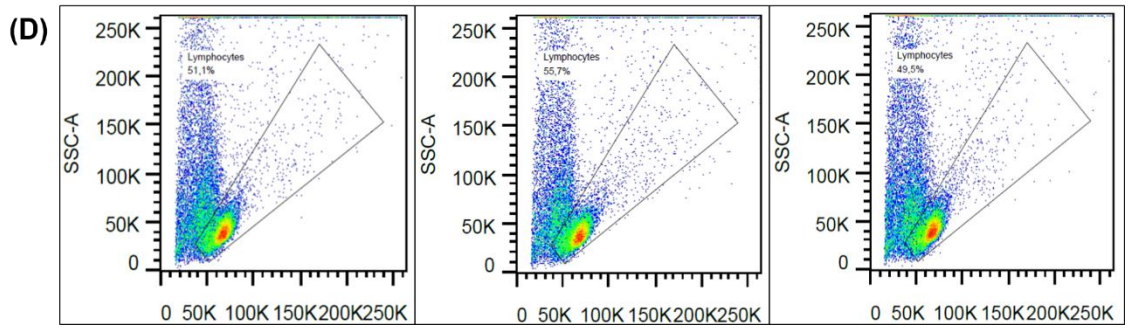
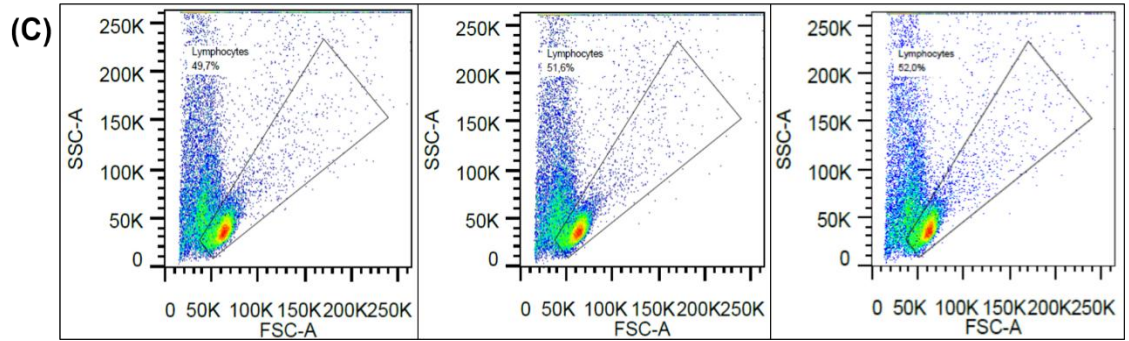
### ANEXO 1

#### REPRESENTACIÓN DE DATOS OBTENIDOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO ESTIMULO DE PBMC DEL INDIVIDUO 2 Qf+.

(A) Control CFSE sin estimulo, (B) Control positivo PHA, (C) Péptido 31039, (D) Péptido 37777, (E) Péptido 38373.







**ANEXO 2**  
**REPRESENTACIÓN DE DATOS EN HISTOGRAMA OBTENIDOS POR**  
**CITOMETRÍA DE FLUJO ESTIMULO DE PBMC DEL INDIVIDUO 2 Qf+**

**(A)** Control CFSE sin estimulo, **(B)** Control positivo PHA, **(C)** Péptido 31039, **(D)** Péptido 37777, **(E)** Péptido 38373.

