



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización de la unión específica a macrófagos de péptidos derivados de lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis* y análisis de la respuesta inmune

Marisol Ocampo Cifuentes

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2014

**Caracterización de la unión específica a
macrófagos de péptidos derivados de
lipoproteínas de *Mycobacterium
tuberculosis* y análisis de la respuesta
inmune**

Marisol Ocampo Cifuentes

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Doctor en Biotecnología

Director:
Profesor Manuel Elkin Patarroyo M., MD.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2014

Dedicatoria

A mis hijas Lina Paola y María José, el motor que me impulsa a salir adelante, por existir y ser el regalo más grande y valioso que Dios me ha dado.

Agradecimientos

A Dios y la vida por las oportunidades de cada día, por las dificultades en el camino que siempre dejaron enseñanzas. A mi familia por su apoyo incondicional.

A mis hijas Lina Paola y María José, por comprender que se hay sacrificios que valen la pena...

A mis compañeros y amigos de tanto tiempo Hernando, Magnolia por su apoyo y a aquellos que desde la distancia han contribuido en mi crecimiento personal y profesional.

Al Dr. Manuel Elkin Patarroyo por su apoyo y guía constante, al Dr. Manuel Alfonso Patarroyo y al Dr. José Manuel Lozano por sus sugerencias, comentarios, correcciones y valiosos aportes en la realización de este trabajo.

A todos y cada uno de los investigadores de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia que en algún momento hicieron la pregunta adecuada y ayudaron a encontrar respuestas acertadas.

A la Universidad Nacional y todas las personas, maestros, estudiantes y administrativos, que contribuyeron en esta nueva etapa de formación.

A los miembros del Comité tutorial por el acompañamiento, sugerencias y recomendaciones para la culminación de este trabajo.

Al Doctorado en Biotecnología por la colaboración y comprensión en las diferentes etapas del desarrollo de este trabajo.

Resumen

La tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades infecciosas de mayor incidencia en salud pública a nivel mundial. Se ha considerado que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo causante de la tuberculosis pulmonar (*Mycobacterium tuberculosis*) aunque solo 5 a 10% de las personas infectadas desarrollan la enfermedad.

El proceso infeccioso se inicia en las vías respiratorias, siendo los principales blancos las células epiteliales y los macrófagos localizados en los alvéolos pulmonares, este proceso requiere de la interacción patógeno – hospedero. Se han estudiado los eventos que permiten al bacilo evadir la respuesta inmune y la activación apropiada de los macrófagos una vez son infectados y se ha establecido la importancia de la respuesta inmune celular en el control de la enfermedad.

En este trabajo se presenta el diseño metodológico que permite la identificación de secuencias derivadas de proteínas de superficie de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv que podrían estar involucradas en la interacción patógeno hospedero. El análisis *in silico* del genoma de esta micobacteria permitió la identificación de lipoproteínas que potencialmente podrían localizarse en la superficie de la bacteria. Posteriormente se verificó la presencia de los genes que codifican para las proteínas de interés y su expresión en la cepa de laboratorio, *M. tuberculosis* H37Rv, bajo condiciones normales de cultivo. A continuación se identificaron las secuencias peptídicas de dichas proteínas que se unían específicamente y con alta afinidad a células blanco de infección y que podrían estar involucradas en su reconocimiento. Como parte de la caracterización funcional de estas secuencias de alta capacidad de unión específica se determinó, en ensayos *in vitro*, su capacidad de inhibir la entrada de la micobacteria a células blanco de infección así como su capacidad para promover la internalización de microesferas cubiertas con los péptidos a células no fagocíticas A549. Además se estableció la capacidad de los pools de péptidos de cada una de

las lipoproteínas para inducir una respuesta de linfoproliferación y se determinó el perfil de citocinas secretadas. Finalmente se determinó la capacidad de mismos pools de péptidos para inhibir el crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, efecto que podría asociarse con el potencial protector que pueden presentar los péptidos de las proteínas de interés en el modelo murino.

El desarrollo del presente trabajo se fundamenta en los promisorios resultados obtenidos en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia -FIDIC-, donde se han podido establecer las pautas que permiten el diseño racional de una vacuna subunitaria, multiantigénica, basada en péptidos sintéticos, efectiva contra enfermedades infecciosas como la malaria. A pesar de las diferencias entre estos patógenos, aquí se presentan los resultados aplicando la misma metodología, ahora en la selección de antígenos que potencialmente pudieran ser la base de una vacuna eficiente contra tuberculosis.

Palabras clave: Tuberculosis, péptido sintético, alta capacidad de unión específica, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, macrófagos derivados de monocitos U937, células endoteliales A549.

Abstract

Tuberculosis continues being one of the infectious diseases having the greatest incidence regarding worldwide public health. It has been considered that a third of the world's population are infected with the bacillus causing pulmonary tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), even though just 5% to 10% of the infected people develop the full-blown disease.

Infection begins in the respiratory tract, epithelial cells and alveolar macrophages located in the pulmonary alveoli being the main target; this requires a pathogen–host interaction. The events allowing the bacilli to evade the immune response have been studied, as have the appropriate activation of the macrophages once they have become infected whilst the importance of a cellular immune response in controlling the disease has also been established.

This work presents the methodological design which led to the identification of sequences derived from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv surface proteins involved in the pathogen-host interaction. *In silico* analysis of this mycobacterium's genome facilitated the selection of lipoproteins which might possibly formed part of its surface. The presence of genes encoding proteins of interest were then determined, as well as their expression in the *M. tuberculosis* H37Rv laboratory strain in normal culture conditions. Such proteins' peptide sequences binding specifically and with high affinity to target cells for the infection were then identified as they could have been involved in its recognition. Part of the functional characterisation of these high specific binding capacity sequences was determined, in *in vitro* assays, if they inhibited mycobacteria entry to target cells of infection and whether such sequences promoted the internalisation of peptide-covered microspheres in non-phagocytic A549 cells. Their lymphoproliferation induction capacity and cytokine profile were also established, as well as their protective potential as *Mycobacterium*

tuberculosis H37Rv intracellular growth inhibitors which could present peptides from proteins of interest in a murine model, in *in vitro* assays.

The development of the present work was based on promising results obtained at the Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) where guidelines have been established which have led to the rational design of a subunit, multi-antigen, synthetic peptide-based vaccine which would be effective against malaria. In spite of the differences between these pathogens, an attempt has been made to apply an appropriate methodology for selecting potential antigens to be included in an effective anti-tuberculosis vaccine.

Key words: Tuberculosis, synthetic peptide, high specific binding activity, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, human macrophage-like (U937) cell line, human lung adenocarcinoma epithelial (A549) cell line.

Contenido

Resumen.....	V
Abstract.....	VII
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas.....	XIV
Lista de abreviaturas.....	XV
1. Introducción.....	1
2. Formulación del problema.....	4
3. Estado del arte.....	6
3.1. Epidemiología de la tuberculosis.....	7
3.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
3.3. Proteómica de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
3.4. Lipoproteínas en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
3.5. Respuesta inmune frente a tuberculosis.....	15
3.6. Péptidos sintéticos como vacuna contra tuberculosis.....	19
4. Objetivos	
4.1. Objetivo General.....	24
4.2. Objetivos Específicos.....	24
5. Hipótesis.....	25
6. Metodología.....	26

6.1. Selección de proteínas.....	26
6.2. Detección de la presencia de los genes codificantes.....	29
6.3. Determinación de la expresión de proteínas	
6.3.1. Predicción de epitopes B lineales.....	30
6.3.2. Síntesis de péptidos poliméricos.....	31
6.3.3. Inmunización de conejos.....	31
6.3.4. Obtención de lisado y fracciones subcelulares de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	32
6.3.5. SDS-PAGE e inmunoblot.....	33
6.3.6. Microscopía Inmunoelectrónica.....	34
6.4. Identificación de secuencias con alta capacidad de unión (High Activity Binding Peptides –HABPs-)	
6.4.1. Cultivo de líneas celulares.....	35
6.4.2. Síntesis de péptidos.....	35
6.4.3. Dicroísmo Circular de péptidos.....	31
6.4.4. Radiomarcaje de péptidos.....	35
6.4.5. Ensayo de unión.....	36
6.4.6. Ensayo de saturación.....	37
6.5. Determinación de la capacidad de inhibición de los HABPs	
6.5.1. Marcación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
6.5.2. Ensayo de inhibición de la entrada de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
6.6. Determinación de internalización de microesferas en las células blanco en presencia de los HABPs.....	39
6.7. Análisis de la respuesta inmune mediada por péptidos <i>in vitro</i>	
6.7.1. Inmunización de ratones BALB/c.....	40

6.7.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica de ratones BALB/c.....	40
6.7.3. Ensayo de proliferación y detección de citocinas.....	40
6.8. Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv por co-cultivo	
6.8.1. Obtención de células de médula ósea de ratones no-inmunizados.....	42
6.8.2. Obtención de esplenocitos de ratones inmunizados	42
6.8.3. Infección de macrófagos con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y co-cultivo con esplenocitos...	43
6.9. Análisis Estadísticos.....	43
6.10. Consideraciones Éticas.....	44
7. Resultados	
7.1. Selección de proteínas de interés.....	45
7.2. Presencia de los genes codificantes.....	48
7.3. Expresión y localización de lipoproteínas.....	49
7.4. Identificación de secuencias con alta capacidad de unión específica a células blanco.....	51
7.4.1. Características de la interacción HABP – célula.....	56
7.5. Capacidad de los HABPs para inhibir la entrada de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>in vitro</i>	58
7.6. Entrada de microesferas fluorescentes en células A549 en presencia de HABPs.....	62
7.7. Elementos de estructura secundaria de los péptidos derivados de las lipoproteínas seleccionadas.....	64
7.8. Proliferación celular por péptidos de las diferentes lipoproteínas.....	65
7.9. Inhibición del crecimiento intracelular de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	70
8. Discusión de Resultados	
8.1. Selección de lipoproteínas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	72
8.2. Localización de lipoproteínas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	74

8.3. Secuencias de unión específica de lipoproteínas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv con actividad inhibitoria	75
8.4. Respuesta inmune generada por péptidos de lipoproteínas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	77
9. Conclusiones y Recomendaciones	
9.1. Conclusiones.....	81
9.2. Recomendaciones.....	83
10. Anexos.....	84
11. Referencias.....	93

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis para 2012.....	7
Figura 2. Perspectiva de la envoltura celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
Figura 3. Generalidades de la respuesta inmune en tuberculosis.....	16
Figura 4. Esquema del diseño metodológico.....	28
Figura 5. Selección de proteínas de Mtb H37Rv.....	46
Figura 6. Determinación de los genes codificantes <i>rv1411</i> , <i>rv1911</i> , <i>rv2270</i> y <i>rv3763</i>	48
Figura 7. Reconocimiento de lipoproteínas por Western blot.....	49
Figura 8. Reconocimiento de lipoproteínas por Microscopía inmunoelectrónica.....	50
Figura 9. Patrones de unión de péptidos sintéticos a células blanco.....	53
Figura 10. Ensayos del tipo Receptor – ligando.....	55
Figura 11. Curvas de saturación para los HABPs 37070, 37094, 37768 y 37779.....	57
Figura 12. Inhibición de la entrada de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	59
Figura 13. Internalización de microesferas acopladas al péptido 37096 por células A549.....	62
Figura 14. Porcentaje de internalización de microesferas acopladas a péptido, por células A549.....	63
Figura 15. Estructura secundaria de los péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763.....	64
Figura 16. Efecto de péptidos de las lipoproteínas sobre la linfoproliferación de PBMCs de ratones BALBc.....	66
Figura 17. Infección de macrófagos murinos en presencia de esplenocitos de animales inmunizados.....	70

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Secuencias de los epitopes B lineales sintetizados para cada una de las proteínas candidatas.....	32
Tabla 2. Predicción de características de las lipoproteínas seleccionadas.....	47
Tabla 3. Constantes de Unión de HABPs de las lipoproteínas a células U937 y A549.....	58
Tabla 4. Inhibición de la entrada de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	60
Tabla 5. Producción de citocinas secretadas por PBMCs murinos estimulados con péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763.....	68

Lista de abreviaturas

BCG: *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

DC: Dicroísmo circular

HABPs: High activity binding peptides

INF γ : Interferón γ

IL: Interleucina

LM: Lipomano

LAM: Lipoarabinomano

Lpp: Lipoproteína

Mce: Mammalian cell entry

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBMCs: Peripheral blood mononucleated cells

PDIM: Phthiocerol dimycocerosate

PGL: Phenolic glycolipids

PIM: Phosphatidylinositol Mannoside

PNGs: Polymorphonuclear granulocytes

SBP: Solute binding proteins

SL: Sulfolípidos

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

TB: Tuberculosis

TB- MDR: Tuberculosis multiresistentes a los fármacos

TB- XDR: Tuberculosis extremadamente resistentes a los fármacos

TGF- β : Transforming growth factor β

TLRs: Toll-like receptors

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

1. Introducción

La tuberculosis (TB) es considerada, después del sida, como la segunda causa mundial de mortalidad causada por un agente infeccioso: el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). En 2012, se reportaron 8,6 millones de personas que adquirieron tuberculosis y 1,3 millones murieron por esta causa (1).

Aunque la TB es curable y se puede prevenir, se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, están infectadas por *Mtb* pero aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección. *Mtb* usualmente afecta los pulmones (TB pulmonar) pero puede afectar a otros órganos (TB extrapulmonar). Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo de un 10% de desarrollar la enfermedad a lo largo de la vida y este riesgo es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmunitario sea deficiente, como ocurre en casos de infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), desnutrición o diabetes, o en quienes consumen tabaco.

La mejor manera de evitar la enfermedad tendría que ser con una vacuna totalmente eficiente que prevenga la entrada de la micobacteria en las células blanco de infección, o con vacunas que protejan a los individuos de la infección inicial, que prevengan la progresión a TB activa en los individuos recientemente infectados, o que disminuya la capacidad para la transmisión por aquellos con enfermedad activa.

Desde hace casi 100 años se ha venido empleando la vacuna BCG (*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette – Guérin), para prevenir la TB; y si bien ésta protege contra las formas graves de TB en niños (TB meningea y TB miliar), su eficacia en la prevención de la TB pulmonar en adultos es muy variable (2). No se recomienda el uso de BCG en pacientes infectados con VIH, debido al riesgo de infección diseminada por la cepa *Mycobacterium bovis* empleada en esta vacuna. Aunque a la fecha hay alrededor de 12 candidatos a vacuna contra tuberculosis en ensayos clínicos, dentro de los obstáculos que se presentan en el desarrollo de vacunas eficientes contra TB se pueden mencionar, la baja correlación entre la

protección en modelos animales que pueda ser aplicada a estudios en humanos, la imposibilidad de validar un modelo animal ya que no se conoce aún una vacuna eficiente que prevenga la tuberculosis pulmonar, el costo y tamaño de muestra en ensayos clínicos debido a la baja incidencia regional a pesar de la alta prevalencia de la enfermedad. Muchos aspectos de la respuesta inmune natural en humanos a la infección permanecen desconocidos y no es claro aún cuál es el modelo adecuado que permita escoger los mejores antígenos para una vacuna contra la TB (3).

En la búsqueda de antígenos con potencial profiláctico o de diagnóstico, el cultivo *in vitro* de *Mtb* se ha identificado un conjunto de proteínas en el sobrenadante de cultivo (CFP, *culture filtrate proteins*) cuya característica principal es su inmunodominancia. Algunos antígenos han sido implicados en respuesta inmune protectora o en la activación de células T en humanos infectados y en modelos animales por lo que han sido considerados buenos candidatos a vacuna; estos antígenos han sido identificados por aproximaciones bioquímicas y se caracterizan por ser proteínas abundantes, secretadas al medio de cultivo (4, 5). A pesar de los grandes esfuerzos que se han dedicado a la investigación de antígenos con potencial inmunoprofiláctico, solo unos pocos han superado la fase II de experimentación; recientemente se ha reportado que una de las vacunas en desarrollo que presentaba los estudios clínicos más avanzados (MVA85A), no alcanza a superar la protección que hasta ahora ofrece la BCG (6). Algunos antígenos con potencial inmunogénico se han identificado mediante el uso de péptidos sintéticos lo que demuestra la versatilidad en el empleo de éstos para el desarrollo de alternativas contra la TB (4, 7-9).

Por otra parte, la bioinformática como una disciplina reciente que integra gran cantidad de información biológica acumulada en bases de datos, obtenidos para diferentes microorganismos, con su significado biológico, ha sido empleada para seleccionar de una forma racional aquellas secuencias que parezcan ser mejores candidatos inmunomoduladores de entre los miles de genes que posee un microorganismo. La bioinformática puede contribuir entonces para limitar el número de candidatos a ser probados (10).

Estos antecedentes plantean la necesidad de aplicar una metodología lógica y racional que permita identificar antígenos promisorios en la profilaxis de la TB. Es así como se toman como base los estudios que la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) ha adelantado en los últimos 30 años en la búsqueda de antígenos que puedan ser empleados en

una vacuna subunitaria basada en péptidos sintéticos y multiantigénica contra malaria (11-15). De la investigación en el modelo de malaria por *Plasmodium falciparum* se han derivado una serie de reglas y principios para obtener una vacuna química, multiepitópica, basada en secuencias mínimas que podrían aplicarse a diferentes patógenos causantes de diversas enfermedades infecciosas.

Con este trabajo de tesis se plantea la aplicación de dichas reglas y principios en una metodología que permita identificar secuencias de proteínas de *Mtb* H37Rv, cuya característica sea que presenten alta capacidad de unión específica a células blanco y a la vez capacidad para inhibir la entrada del bacilo (en ensayos *in vitro*) a éstas células. Estos péptidos pueden posteriormente ser modificados y analizados con respecto a su capacidad inmunogénica y protectora contra la TB en ensayos *in vitro* y finalmente *in vivo*.

Es así como ahora se presentan los resultados obtenidos en el estudio de las secuencias de 4 lipoproteínas (Lpp) de *Mtb* H37Rv (Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763); siendo éstas una clase de proteínas bacterianas, que se caracterizan por poseer un motivo lipídico N-terminal que podría permitir su anclaje a la superficie celular se puede postular que participen en la interacción con las células hospederas para *Mtb*. En el diseño metodológico propuesto, inicialmente se emplearon herramientas bioinformáticas que permitieron determinar características para la selección de las proteínas a estudiar; posteriormente se determinó la presencia de los genes que codifican para dichas proteínas y se verificó la expresión y localización de las mismas en *Mtb* H37Rv en condiciones normales de cultivo. En la siguiente fase de la metodología propuesta, se emplearon péptidos sintéticos secuenciales, no traslapados que cubrían la secuencia completa de cada una de las proteínas, a fin de identificar las secuencias de unión específica a células blanco de infección de *Mtb* H37Rv y mediante la aplicación de modelos de interacción receptor-ligando se caracterizó la interacción péptido - célula hospedera. La importancia funcional de estas secuencias, de alta unión específica, se evaluó determinando la capacidad de inhibir la entrada de la micobacteria a las células blanco en ensayos *in vitro*. Mediante la técnica de difracción circular se establecieron los elementos de estructura secundaria presentes en los péptidos de las lipoproteínas. Por último, se hizo un acercamiento al análisis de la respuesta inmune generada por los péptidos que conforman las proteínas seleccionadas en el modelo murino.

2. Formulación del problema

Más de 100 años después de que Robert Koch descubriera la existencia del bacilo *Mtb* (en 1882), la publicación de su genoma para la cepa H37Rv en 1998 (16) proporcionó información con un gran potencial para identificar, entre todo el repertorio de genes, aquellos que son claves para la virulencia, patogénesis, supervivencia y latencia de la micobacteria. Este avance hacía pensar en la posibilidad de diseñar nuevos medicamentos contra la enfermedad, vencer las resistencias a los fármacos y sobre todo, obtener una vacuna efectiva. Sin embargo, a pesar de conocer los aproximadamente 4000 genes que conforman este microorganismo y tenerlos disponibles en enormes bases de datos, la información funcional de las proteínas que codifican es todavía muy limitada (4).

La investigación de métodos profilácticos contra la TB se ha basado en aquellos antígenos que son reconocidos por pacientes con la enfermedad y que generan una respuesta inmune celular, sin embargo los resultados más recientes han permitido concluir que *Mtb* es un patógeno muy complejo y que al parecer la respuesta de células T no es suficiente para el control de la enfermedad en humanos (17).

Por otra parte, la única vacuna aprobada contra la TB (BCG) sigue siendo controvertida por la variabilidad de resultados de protección entre el 0 y el 80%, siendo especialmente eficaz previniendo la meningitis tuberculosa infantil pero no la TB pulmonar en adultos. A pesar de la intensa investigación en la búsqueda de candidatos a vacuna que puedan mejorar o reemplazar el uso de la BCG, los resultados más recientes han permitido concluir que aún falta por conocer los mecanismos de interacción entre *Mtb* y las células blanco de infección, aunado a esto los modelos animales empleados no permiten extrapolar los resultados a pruebas en humanos y se debe tener en cuenta el conjunto de factores del hospedero en la respuesta inmune resultante.

Una alternativa promisorio para la vacuna es la búsqueda de secuencias funcionalmente relevantes en la interacción de *Mtb* H37Rv y células blanco de infección (monocíticas y epiteliales), mediante el uso de péptidos sintéticos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el modelo de malaria, 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 de la estructura secundaria de estas secuencias mejora su capacidad antigénica y las convierte en moléculas potencialmente prometedoras en la prevención de la infección por el patógeno.

Si se aplica lo anterior en la interacción *Mtb* – célula hospedera, deberían identificarse secuencias de proteínas de *Mtb* con alta capacidad de unión específica a la célula hospedera y que inhiban la entrada de la micobacteria *in vitro*. Por otra parte, teniendo en cuenta que la respuesta inmune celular del tipoTh1 se ha descrito como protectora contra TB, se debe determinar si los péptidos sintéticos pueden generar éste tipo de respuesta y si la respuesta inmune permite reconocer las secuencias importantes en la interacción hospedero-patógeno en la micobacteria de tal manera que al bloquear dicha interacción se pueda prevenir la infección.

3. Estado del arte

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la TB como una enfermedad infecto-contagiosa que suele afectar los pulmones y que es causada por una bacteria: *Mtb*. Se transmite de una persona a otra a través de gotas generadas en el aparato respiratorio de pacientes con tuberculosis pulmonar activa. No obstante, no todas las personas infectadas por estos bacilos enferman. El sistema inmunitario puede eliminar a los bacilos de la TB, o bien puede mantenerlos en un estado de latencia durante años. Si el sistema inmunitario no logra controlar la infección, los bacilos de la TB se multiplican, produciendo la forma activa de la enfermedad. Si no recibe tratamiento, cada persona con tuberculosis infecciosa transmitirá los microorganismos patógenos a unas 10 a 15 personas cada año.

Actualmente, la TB es controlada con el uso de antibióticos, sin embargo, el panorama socioeconómico de las áreas endémicas, el extenso periodo de tiempo que representa su tratamiento, junto con los intensos efectos secundarios producidos por los medicamentos antituberculosos, así como la aparición de casos de TB multirresistente, hacen de esta una solución limitada con respecto al enorme problema que representa la enfermedad. Hasta hoy, la única vacuna existente contra la TB es *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), que con solo una protección parcial, hace necesaria y urgente la creación de una nueva vacuna que ayude a prevenir la aparición de nuevos casos de esta enfermedad (18).

Gran parte de la comprensión de los mecanismos patogénicos e inmunológicos en tuberculosis se deriva de estudios en animales de experimentación. Sin embargo, cada vez es más claro que en la tuberculosis, así como en otras enfermedades infecciosas, existen diferencias sustanciales en las respuestas inmunológicas de los seres humanos que no se encuentran y no pueden ser predichos por los estudios en animales (19).

3.1. Epidemiología de la tuberculosis

La TB es hoy la principal causa de mortalidad por enfermedades infecciosas en el mundo, causando la muerte a más adultos cada año que cualquier otra enfermedad transmisible, incluso más que el SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida), la diarrea, la malaria y otras enfermedades tropicales combinadas. El aumento de casos de TB a nivel mundial se ha atribuido a múltiples factores, entre ellos la reemergencia de la enfermedad en países donde se consideraba casi eliminada, la aparición de casos de TB multirresistente a medicamentos (TB- MDR) y TB extremadamente resistente a medicamentos (TB-XDR), el creciente número de personas infectadas con el VIH y el debilitamiento de los programas de control. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *Mtb*, siendo la TB una emergencia sanitaria global que afecta a la población en la edad más productiva, con la ulterior repercusión en la economía y sobrecarga de los servicios de salud, a pesar de existir las herramientas de diagnóstico y de tratamiento para detener su progresión en la comunidad.

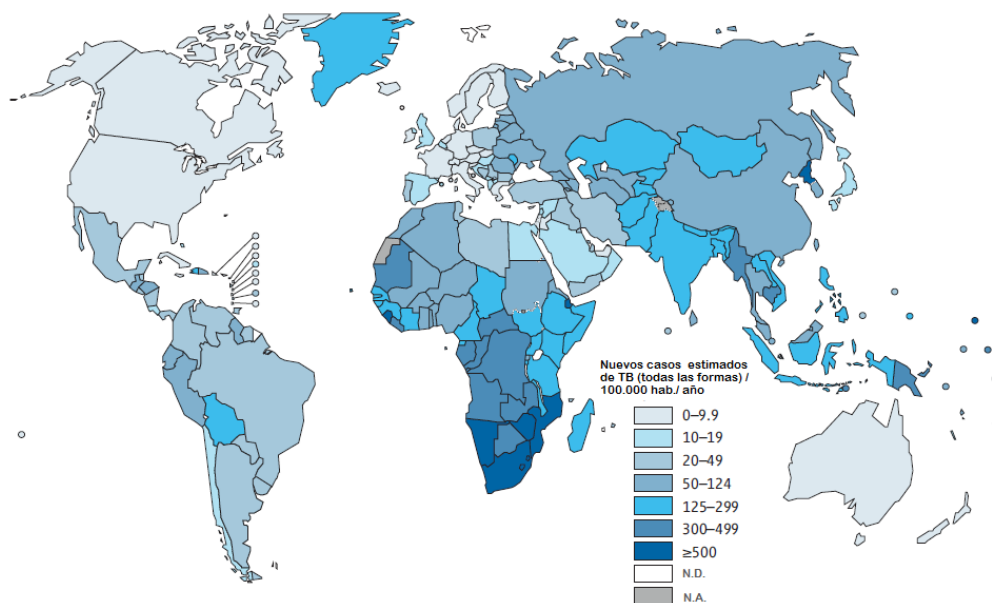


Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis para 2012. Tomado de Global Tuberculosis Report, World Health Organization (1).

En 2012 se estimó una incidencia de 8,6 millones de casos y 1,3 millones las muertes causadas por TB de las cuales 940.000 fueron VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana)

negativas y 320.000 VIH positivas (1). Como se observa en la figura 1, la región africana presenta aproximadamente un cuarto de los casos de TB en el mundo mientras que India y China tienen el mayor número de casos (26% y 12% del total global, respectivamente).

Las Américas son responsables de menos del 10% de los casos de TB en el mundo, sin embargo esta enfermedad sigue siendo una de las principales amenazas para la salud pública de la región, generando más de 200.000 nuevos casos y 50.000 defunciones cada año, la gran mayoría de personas en las edades de mayor productividad económica (20). En Colombia, el perfil epidemiológico de la TB ubica la enfermedad como un problema prioritario para la salud pública del país (21): en el 2013, con corte a la semana epidemiológica 51, se han reportado 10.463 casos nuevos de TB pulmonar y 2.369 de TB extrapulmonar (22). La tasa de incidencia estimada por la OMS difiere de las tasas reportadas por las secretarías locales de salud, lo cual indica que, en Colombia, sigue transmitiéndose esta enfermedad y que, en realidad, las tasas serían mayores, teniendo en cuenta que en el país ha disminuido la búsqueda de los pacientes sintomáticos respiratorios (23) y existen deficiencias en el seguimiento de los pacientes para la búsqueda de contactos lo que finalmente ocasiona el retraso en el diagnóstico e inicio de un tratamiento oportuno (24).

3.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Las bacterias del género *Mycobacterium* son no-móviles y no-esporuladas, se agrupan en el supragénero de actinomicetos que en una forma inusual tienen un alto contenido de guanidina y citosina (G+C) en su ADN y probablemente el más alto contenido de lípidos en la pared celular, dentro de los cuales se destacan los ácidos micólicos. Estos lípidos característicos pueden actuar como reserva de energía y de carbono para la micobacteria y pueden estar involucrados en la estructura y función de membranas y organelos membranosos en la célula. Los lípidos constituyen más de la mitad del peso seco de la micobacteria. La cubierta cerosa confiere las características propias del género: ácido resistencia, hidrofobicidad, resistencia al daño, incluido el ocasionado por antibióticos, diferentes propiedades inmunológicas y también podría contribuir al lento crecimiento de algunas especies por la toma restringida de nutrientes (25).

La envoltura de *Mtb*, 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 (26). Esta membrana provee protección osmótica y regula el tráfico de solutos específicos entre el citoplasma y el ambiente. Se conoce poco acerca de la membrana de *Mtb*: está rodeada por una pared que protege el contenido celular, proporciona el soporte mecánico y es responsable de la forma característica de la micobacteria. 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, presentando algunos residuos químicos particulares y un número inusual de entrecruzamientos. Unido covalentemente al peptidoglicano, se encuentra el arabinogalactano esterificado con ácidos micólicos, la disposición de estos ácidos micólicos es específica de cada especie, siendo en *Mtb* alfa, ceto y metoximicolatos que contienen 76 a 82, 84 a 89 y 83 a 90 átomos de carbono respectivamente. La capa exterior de la pared contiene lípidos libres como tiocerol dimicocerosatos (PDIM), glicolípidos fenólicos (PGL), glicolípidos que contienen trehalosa y sulfolípidos (SL). Algunos glicolípidos, como fosfatidil-mioinositol manósidos, lipomanan (LM) y lipoarabinomanan (LAM), 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 estar siendo exportadas u otras ser responsables de la construcción de la pared celular durante el ciclo de vida de la micobacteria. También se encuentran porinas formando canales hidrofílicos que permiten el paso pasivo de solutos acuosos a través de la capa de ácidos micólicos. La cápsula contiene proteínas, polisacáridos y en menor cantidad lípidos internos en rotación constante. La habilidad que distingue a *Mtb* de sobrevivir en el macrófago, su patogenicidad y sus propiedades inmunogénicas se derivan, al menos en parte, de la naturaleza de algunas de las moléculas de la pared bacteriana (27). Todas 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 bacteriana y posiblemente estén involucradas en la virulencia de *Mtb* (28, 29), siendo alrededor del 2,5% de su proteoma por lo que se cree que esta clase de proteínas de la envoltura celular esté involucrada en interacciones entre la micobacteria y el hospedero.

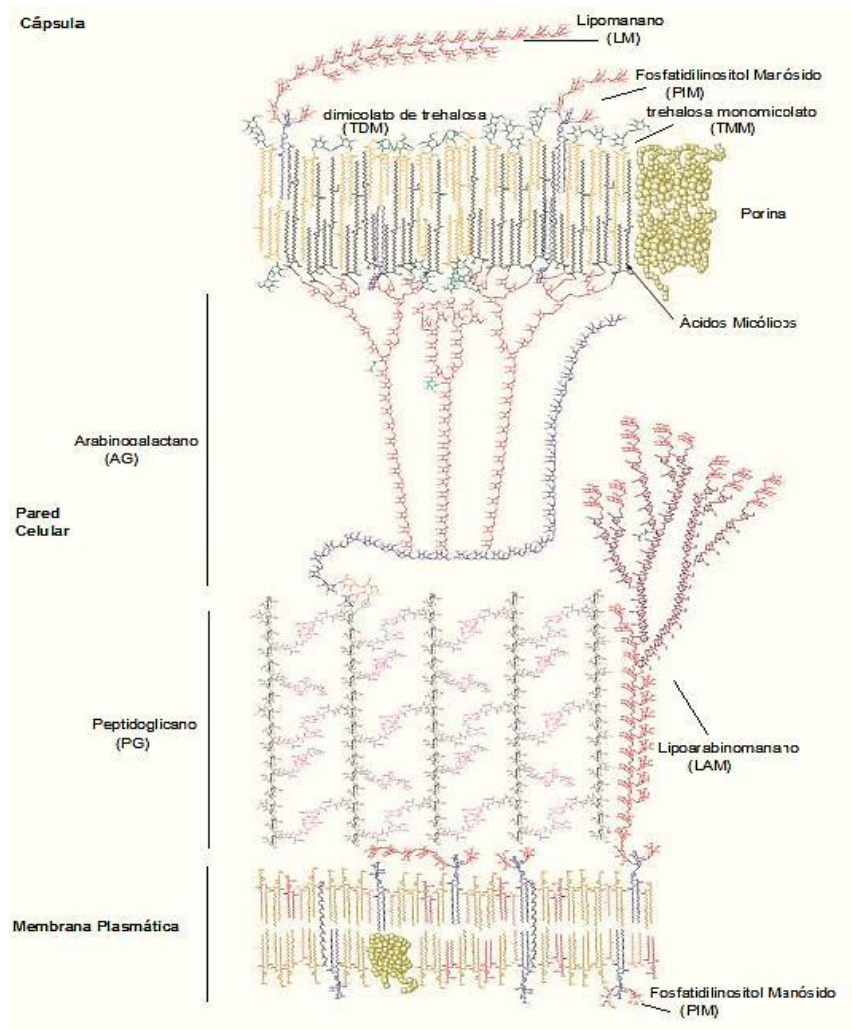


Figura 2. Perspectiva de la envoltura celular de *Mtb*. Modelo teórico de la membrana externa donde se observan lípidos presentes en ambas caras así como meromicolatos que comprenden una región altamente hidrofóbica. Otros modelos proponen que las cadenas de meromicolatos se enrollan en sí mismas para crear una estructura más compacta lo que explicaría el espesor que se ha observado y que permitiría explicar la presencia de proteínas (porinas) en la membrana externa (30). En el esquema se muestran los residuos de galactosa (azul), arabinosa (rojo), residuos succinil y galactosamina (verde) en el arabinogalactano; PIM, LM, LAM en rojo y residuos de arabinosa (púrpura). Adaptado de Kaur D *et al.* (31).

3.3. Proteómica de *Mycobacterium tuberculosis*

La proteómica es el análisis de las proteínas codificadas en el genoma de una célula y refleja su estado funcional en respuesta a estímulos ambientales, por lo tanto, sirve como un valioso complemento a la genómica (32, 33). Sin embargo, la metodología para llevar a cabo estos estudios presenta limitaciones en cuanto a pasos como el aislamiento, la solubilización y la separación de las proteínas de diferentes fracciones subcelulares (34, 35).

En el caso de *Mtb*, los estudios de proteómica se iniciaron con la caracterización de las proteínas de sobrenadante de cultivo (36, 37) y continuaron con el estudio de las proteínas expresadas en el bacilo completo, lo que llevó a la identificación de más de 300 proteínas distintas (33, 38).

La membrana contiene muchas proteínas importantes para la fisiología de la bacteria, varios trabajos de proteómica han permitido identificar centenares de estas proteínas, incluyendo proteínas integrales con dominios transmembranales y proteínas periféricas a la membrana. La mayoría de estas proteínas intervienen en procesos catabólicos de obtención de energía, degradación de ácidos grasos y síntesis de lípidos, o en el metabolismo de macromoléculas. Otro grupo importante lo constituyen las proteínas implicadas en procesos celulares de transporte y de división celular. Empleando diferentes técnicas para la extracción de proteínas de membrana Sinha en 2002 identificó 15 proteínas integrales de membrana de *Mtb*, con la técnica de solubilización en Tritón X114 (39). Estudios posteriores que partieron de la fracción subcelular de membrana de *Mtb* permitieron encontrar 739 proteínas, de las cuales aproximadamente 480 eran proteínas que no habían sido identificadas previamente; de ellas, 79 integrales de membrana y más de 100 proteínas asociadas a membrana (proteínas sin anclaje transmembranal). Además mediante el uso del servidor TMHMM 2.0 (TransMembrane prediction using Hidden Markov Models) se identificaron 85, del total del proteínas, como proteínas transmembranales (34).

Recientes aproximaciones con fracciones subcelulares y la aplicación de herramientas predictivas de anclaje a membrana (TMHMM y TMPRED), permitieron la identificación de nuevas proteínas de membrana. Estos estudios se complementaron con el mapeo de algunas características inmunogénicas de las proteínas identificadas (40). El empleo de diferentes técnicas ha permitido además el análisis de proteínas integrales de membrana, lipoproteínas (41), proteínas de pared celular y citosol (42). El mejoramiento en la técnicas de extracción para las diferentes fracciones subcelulares (pared celular, membrana, citosol, lisado y

sobrenadante de cultivo) han permitido definir nuevas proteínas que potencialmente podrían estar mediando interacciones patógeno–hospedero (43).

En el estudio de *Mtb*, la proteómica también se ha empleado para la identificación sistemática de nuevas proteínas con propiedades antigénicas con potencial protector o de diagnóstico (44) y en el análisis comparativo de cepas como H37Rv – CDC1551 (45), H37Rv – H37Ra (46).

3.4. Lipoproteínas en *Mycobacterium tuberculosis*

Las lipoproteínas (Lpp) son una clase de proteínas bacterianas secretadas y funcionalmente diversa, que se caracterizan por un motivo lipídico N-terminal que sirve para anclarlas a la superficie celular. Las lipoproteínas se sintetizan como pre-prolipoproteínas y maduran por modificaciones pos-traduccionales que están dirigidas por una secuencia de aminoácidos conservada conocida como “lipobox” ([LVI][ASTVI][GAS]C) localizada en la región del péptido señal. Esta secuencia es modificada mediante la unión covalente de un motivo diacilglicerol al grupo tiol de la cadena lateral de la cisteína (Cys), catalizada por la transferasa Lgt (lipoprotein diacylglyceryl transferase). El resultado es una pro-lipoproteína que puede ser clivada por la peptidasa Lsp (lipoprotein signal peptidase), quedando ahora la Cys del motivo “lipobox” como residuo amino-terminal de la lipoproteína final (47). La inactivación de genes involucrados en la síntesis de lipoproteínas disminuye la patogenicidad de una variedad de bacterias nocivas. En bacterias, las lipoproteínas cumplen una gran variedad de funciones dentro de las cuales han sido estudiadas ampliamente la resistencia a antibióticos, señalización celular y unión al sustrato en sistemas transportadores ABC, exportación de proteínas, esporulación, conjugación bacteriana, etc (47).

La aplicación de herramientas bioinformáticas ha permitido la identificación de 99 lipoproteínas putativas, lo que representa el 2,5% del proteoma de *Mtb*. Entonces, las lipoproteínas representan una clase importante de proteínas en la envoltura celular que pueden contribuir en la virulencia de este patógeno (28). Aparentemente, todas las bacterias localizan proteínas específicas en sus envolturas celulares a través de modificaciones lipídicas post-traduccionales para producir lipoproteínas ancladas a membrana. En micobacterias, la modificación con lípidos representa un mecanismo importante por el cual las proteínas se localizan en la envoltura celular y posiblemente sean factores de virulencia.

Las lipoproteínas putativas en *Mtb* pueden ser clasificadas desde el punto de vista funcional en diferentes categorías (28):

1. *Proteínas de unión a solutos (SBP por sus siglas en inglés Solute binding proteins) de sistemas de transporte ABC.* Este grupo de lipoproteínas es abundante en los genomas de bacterias Gram-positivas como componentes de sistemas de transporte ABC (transporte primario dependiente de ATP o vía del “ATP-binding cassette”) y en *Mtb* ya han sido reportadas 17 SBPs, algunas de los cuales son adyacentes a genes que codifican permeasas y componentes de unión a ATP de sistemas típicos de transporte ABC (48). Algunas de estas SBPs han sido investigadas como candidatos a vacunas (PstS-1 y PstS-2), tanto proteicas como de DNA. Se ha sugerido que lipoproteínas como Rv1166 y Rv3666c actúan como SBPs para péptidos y otras como Rv2041 y Rv2833 sean SBPs para azúcares y se requieren para un óptimo crecimiento *in vitro* de *Mtb*. También se han encontrado SBPs que no están claramente asociadas con sistemas típicos de permeasas, pero que pueden interactuar con componentes del transportador ABC localizados en otros cromosomas (48).

2. *Lipoproteínas como enzimas.*

- Enzimas involucradas en el metabolismo de la pared celular. Se han descrito 7 Lpp involucradas con esta función, lo cual es de esperar si se tiene en cuenta la predicción de la localización de esta clase de proteínas en la interfaz de la membrana celular y la capa de peptidoglicano. Se encuentran aquí algunas peptidasas y transpeptidasas, como Rv2068c, involucradas en la resistencia a antibióticos β -lactámicos (49). También se les ha asignado un rol en el entrecruzamiento y remodelamiento de peptidoglicano requerido para el crecimiento óptimo en medios definidos.
- Enzimas degradativas. Se incluyen en este grupo estearasas (Rv0671 y Rv3298c), proteasas/peptidasas (Rv0418, Rv0419, Rv2224c y Rv2672), una fosforilasa putativa (Rv2293c) e hidrolasas (Rv0237); aunque el sustrato específico para estas proteínas putativas no se ha determinado, la predicción de su localización en el pseudoperiplasma de *Mtb* sugiere que puedan estar involucradas en el metabolismo de nutrientes (28).
- Otras enzimas y actividades metabólicas. En este grupo se encuentra la dismutasa superóxido de Cu y Zn (SodC o Rv0432) que se localiza en la envoltura celular de *Mtb* y es inducida luego de la fagocitosis de la micobacteria en los macrófagos, como respuesta

al estrés oxidativo (50). En este grupo también se predicen miembros de la familia de mutasas fosfoglicerato/bisfosfoglicerato con funciones que aún no son claras y localización citoplasmática. Comparando algunas Lpp de *Mtb* con las encontradas en otros microorganismos se concluye que pueden estar implicadas en reacciones redox (tioredoxinas, ferroxidasas) y ubicadas en el espacio periplásmico

3. Lipoproteínas con funciones putativas en adhesión e invasión celular.

- Adhesina putativa MTP83 (Rv2873). Aunque su homóloga en *M. bovis* BCG (MPB83) ha sido ampliamente estudiada, en *Mtb* se ha establecido que la presencia del gen y la expresión de la lipoproteína con características similares sugieren su papel en la adhesión (51). Adicionalmente junto con MPT70 (Rv2875) se ha involucrado en el tropismo óseo.
- Lipoproteínas miembros putativos de la familia Mce. El locus *mce*, de *Mtb*, confiere a *E. coli* la habilidad para invadir células de mamífero y hace parte de un operon que compromete 8 genes (52). Sin embargo, la relación de estas lipoproteínas con la virulencia no es clara, se encuentran también en micobacterias no-patogénicas (53), aparentemente estas proteínas son antigénicas ya que son reconocidas por pacientes con TB.

4. Lipoproteínas con funciones putativas en señalización y de detección de condiciones ambientales.

- Proteínas accesorias a la quinasa sensor de potasio (KdpD). Son proteínas que están localizadas en la membrana (Rv1368 y Rv1690) y que posiblemente actúan como sensores/receptores para señales en la región extracitoplasmática que interactúan con la proteína integral de membrana KdpD (histidin-quinasa dependiente de potasio) que participa en sensar el estrés osmótico (54).
- Factor promotor de crecimiento, Rv1009. Dentro de la familia de los factores promotores de resucitación (Rpf, resuscitation-promoting factor) en *Mtb* se encuentran proteínas secretadas y específicamente Rv1009 (RpfB) implicada en la cinética de crecimiento de la micobacteria *in vitro* (55).
- Otras lipoproteínas involucradas en sistemas sensores y de señalización. *Mtb* fue una de las primeras bacterias en donde se mostró la utilización de una familia de serin/treonin

proteín quinasas similares a las de otras eucariotas que responden a señales ambientales por la vía de dominios sensores en el extremo C-terminal extracitoplasmático. Dentro de este grupo se encuentran proteínas como Rv1911c, Rv2403c y Rv3576.

5. *Lipoproteínas con función desconocida*. En este grupo se encuentran lipoproteínas que han sido ampliamente estudiadas por su carácter inmunogénico, como el antígeno glicosilado 19kDa (56-60) , y aquellas que presentan alta homología con proteínas secretadas en otras cepas de micobacterias (Rv0583c, Rv1016c, Rv2116). También se han encontrado lipoproteínas cuya expresión es diferencial en diversas cepas de *Mtb* (parálogos) pero cuya función no ha sido determinada. Se encuentran 28 lipoproteínas putativas de función desconocida, de éstas la mayoría son conservadas hipotéticas aunque en muchos casos comparten homología significativa con secuencias de otros genomas micobacteriales. La modificación genética de *Mtb* ha permitido identificar a las lipoproteínas como una clase de antígenos inmunodominantes asociados a la pared celular que generan respuesta policlonal de células T (61)

En los modelos que presentan una estructura compleja de la envoltura de la micobacteria, las lipoproteínas podrían localizarse en un espacio pseudoperiplásmico, de manera similar con la organización de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas. Aún no se ha determinado si un gran número de lipoproteínas están asociadas con los micolatos externos soportados en la capa lipídica de la envoltura celular de la micobacteria pero ya que se ha evidenciado la secreción o la localización periférica de estas lipoproteínas en *Mtb*.

3.5. Respuesta inmune frente a tuberculosis

El agente causal de la TB, *Mtb*, es un patógeno intracelular obligado que se replica dentro de las células alveolares. *Mtb* entra al hospedero humano por vías aéreas altas y es fagocitado por macrófagos alveolares en los pulmones.

Hoy en día es claro que la clave del éxito de esta micobacteria radica en su habilidad de ingresar, residir y proliferar dentro de macrófagos alveolares y otros tipos de células no fagocíticas, como neumocitos tipo II, células endoteliales y fibroblastos, que pueden actuar como un potencial reservorio de la bacteria (62, 63). Sin embargo, actualmente se proponen novedosas teorías para la interacción de la micobacteria con el hospedero, donde se propone

considerar a *Mtb* como un patógeno extracelular considerando que parte de su ciclo de vida se lleva a cabo en el ambiente del pulmón antes de iniciar la infección intracelular (64).

Se ha descrito que la infección con *Mtb* sigue una secuencia de eventos claramente definidos donde el bacilo infeccioso es inhalado en forma de gotas por vía aérea. En el pulmón, la bacteria es fagocitada por macrófagos alveolares e induce una respuesta proinflamatoria localizada, que produce el reclutamiento de células mononucleares desde los vasos sanguíneos más próximos. Estas células van a ser la base para la formación del granuloma, o tubérculo, característico de la enfermedad. El granuloma está formado por un núcleo de macrófagos infectados, rodeado por macrófagos espumosos ("foamy giant cells") envueltos con linfocitos que delinean la periferia de la estructura. Este tejido es característico de contención de la fase de infección, durante la cual no hay signos de la enfermedad y el hospedero no transmite la infección a otros. La contención puede fallar después de un cambio en el sistema inmune, lo cual usualmente es causado por edad avanzada, malnutrición o co-infección con VIH. En tales circunstancias, el centro del granuloma sufre una caseificación y libera bacilos infecciosos, viables a las vías aéreas (65). Esto conduce al desarrollo de una tos productiva que facilita la dispersión de aerosoles del bacilo infeccioso como se ilustra en la figura 3.

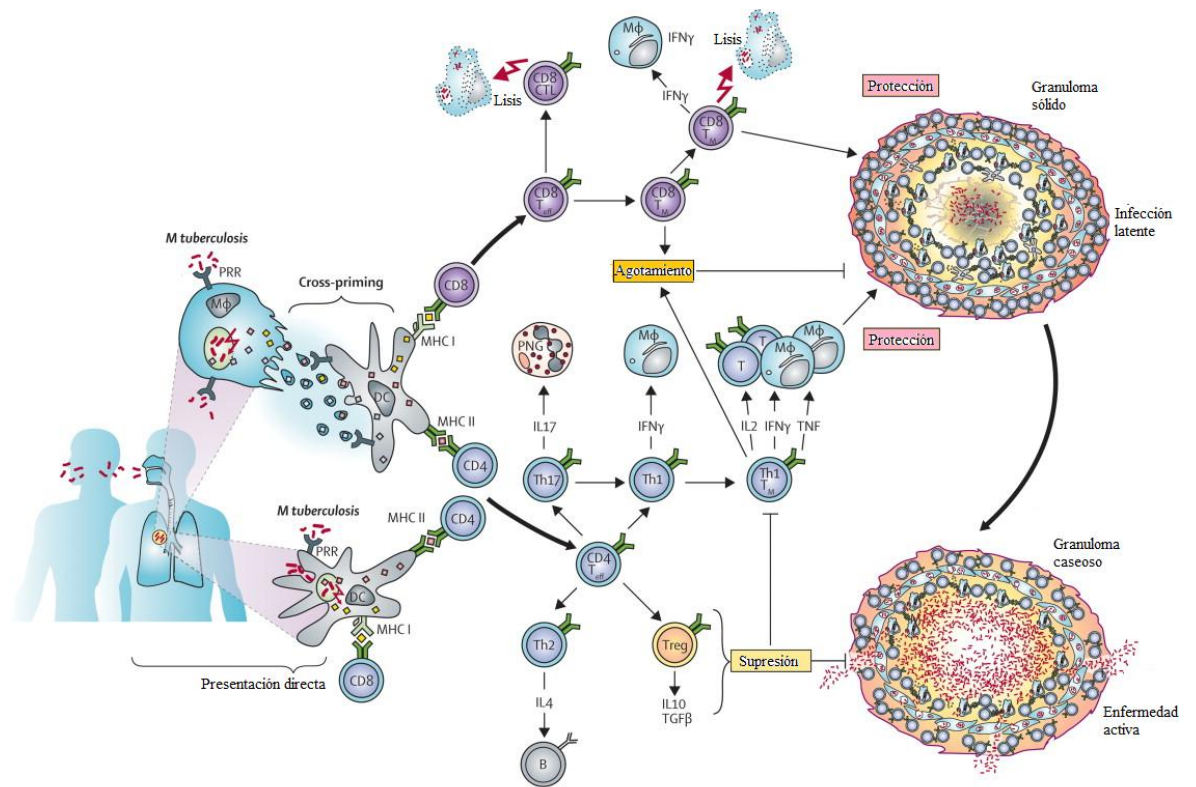


Figura 3. Respuesta inmune en tuberculosis. El control de *Mtb* es el resultado de la participación de diversas poblaciones de células T, células B y macrófagos. PRR, receptores de patrones de reconocimiento (Pattern recognition receptors); interferon γ (IFN γ); TNF, factor de necrosis tumoral; PNGs, granulocitos polimorfonucleares; TGF, factor de crecimiento transformante β . Adaptado de Kaufmann SH *et al.* (66)

En la interacción inicial entre la micobacteria y el macrófago intervienen una gran variedad de receptores de la célula hospedera, dentro de los que se encuentran los receptores para la fracción Fc de inmunoglobulinas (FcR), receptores del complemento (CR), receptor de manosa (MR), receptores de proteínas surfactantes del pulmón (SP-A, y SP-D), antígeno CD14, así como también han sido involucrados receptores TLR (Toll-like receptor) (67). TLR-2 y TLR-4 interactúan con componentes de la pared micobacteriana, incluyendo el LAM (68). Se ha propuesto que la selección del receptor usado para la entrada al macrófago influye en la respuesta celular: la entrada de la micobacteria opsonizada con IgG vía FcR activa los sistemas antimicrobiales del macrófago, mientras que la internalización vía CR3 no activa la célula hospedera apropiadamente. El colesterol, al parecer, facilita el acople de la micobacteria al macrófago.

La respuesta inmune adecuada para el control de la tuberculosis busca ser protectora contra la progresión de la enfermedad o bien ser protectora contra la infección. *Mtb* es el clásico ejemplo de un patógeno para el cual la respuesta protectora recae en la inmunidad mediada por células. En el modelo murino, dentro de la primera semana de infección con una cepa de *Mtb* virulenta, el número de células CD4⁺ y CD8⁺ activadas en los nódulos linfáticos que drenan al pulmón aumentan (69). Entre la segunda y cuarta semana después de la infección las células CD4⁺ y CD8⁺ migran a los pulmones y muestran un fenotipo efector/de memoria. Los granulomas tuberculosos contienen estos dos tipos celulares que mantienen la infección dentro del granuloma y previenen la reactivación de la enfermedad.

Estudios en animales y humanos han demostrado la gran variedad de componentes del sistema inmune involucrados en una respuesta inmune efectiva contra *Mtb*. Estos componentes incluyen a las células T, citocinas (principalmente interferón- γ (IFN- γ), interleucina 12 (IL-12), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6)) y células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas). Debido a la ubicación fagosomal de *Mtb*, sus antígenos son rápidamente presentados a células CD4⁺. Las células CD4⁺ del tipo Th1, las cuales producen IFN- γ , son mediadores críticos de la protección contra la TB. Las células CD8⁺ también tienen un papel importante en la resistencia adquirida contra este patógeno ya que secretan granulisin y perforina que pueden lisar las células blanco infectadas con la micobacteria y son potentes productoras de IFN- γ . Recientemente se ha mostrado como se pueden estar presentando antígenos cargados en moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH I): la micobacteria induce apoptosis, lo cual resulta en la formación de vesículas que están cargadas con proteínas micobacteriales y glicolípidos; estas vesículas son tomadas por células dendríticas, las cuales son las células presentadoras de antígenos más eficientes del sistema inmune. La toma de las vesículas permite que se carguen moléculas MHCI, MHCII (complejo mayor de histocompatibilidad clase II) y CD1, estimulando así las respectivas poblaciones de células T. Además, el alto contenido glicolípido de estas vesículas estimula células dendríticas por la vía de los Toll-like receptors (TLRs) aumentando su capacidad de presentar antígenos (70), (figura 3).

Adicionalmente a las células T convencionales con especificidad por los complejos MHC/péptido, en la inmunidad contra tuberculosis también participan otras células T como las células T γ/δ , las cuales expresan un receptor de células T (TCR) alternativo, y las células

T con especificidad por complejos CD1/lípido. Se ha establecido que las células T γ/δ reconocen pequeñas moléculas que contienen fosfatos (71). Las células T restringidas a CD1 son específicas para glicolípidos que son abundantes en la micobacteria pero que no se encuentran en otros patógenos microbianos.

Aunque existe un consenso general de que se requiere una respuesta inmune contra la TB mediada por células del tipo Th1 donde participen tanto los linfocitos CD4 + como los CD8+, y durante mucho tiempo se ha considerado que los anticuerpos no están involucrados en la inmunidad que es protectora contra esta enfermedad (72, 73), no obstante que se conoce que la terapia de suero se utilizó ampliamente para el tratamiento de la TB antes de la era de los antibióticos (74). Recientemente se ha reconocido el papel complementario en la inmunidad protectora que pueden presentar anticuerpos circulantes del tipo IgG y secretados por mucosas (IgA) contra antígenos de *Mtb* (75). Adicionalmente, el diseño de vacunas ha sido tradicionalmente orientado por el paradigma de que una respuesta inmune contra los patógenos extracelulares está dada principalmente por mecanismos humorales que implican producción de anticuerpos específicos, mientras que la protección frente a patógenos intracelulares requiere mecanismos efectores de la inmunidad celular. Sin embargo, tal distinción paradigmática entre el tipo Th1 y Th2 de respuesta de células del hospedero presenta a un gran desafío ya que varios antígenos o inmunógenos vacunales inducen respuestas mixtas con la participación efectores inmunes tanto humorales como celulares. Por otra parte, sigue siendo incierta la independencia funcional de las respuestas inmunes mediadas por anticuerpos y por células en condiciones fisiológicas *in vivo*.

3.6. Péptidos sintéticos como vacuna contra tuberculosis

En la actualidad, la única vacuna contra la tuberculosis es la BCG (*Bacillus Calmette Guérin*), una vacuna viva atenuada derivada de *Mycobacterium bovis* que se ha utilizado desde 1920. Se ha demostrado que BCG protege contra la TB durante la primera infancia (76, 77). Sin embargo, su eficacia protectora en la prevención de TB pulmonar contagiosa en adultos varía considerablemente. Aunque controvertido, se ha estimado que el efecto de la vacunación con BCG sigue siendo no-significativa después de los 10 años (78) y por lo tanto dicha vacuna no ha tenido el impacto necesario sobre la epidemia mundial de tuberculosis. BCG es segura en individuos inmunocompetentes, pero como es una vacuna viva representa

un riesgo de infección en individuos inmunocomprometidos. Esto se ha demostrado recientemente en niños infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en una zona endémica en Sudáfrica, donde ambas infecciones no son controladas (79, 80). Por ello, la OMS ha dejado de recomendar la vacunación con la BCG viva atenuado de los lactantes expuestos al VIH, aun cuando exista un riesgo de exposición a la tuberculosis a temprana edad (81).

Los posibles candidatos vacunales contra este patógeno han sido diseñados teniendo diversas aproximaciones: las vacunas recombinantes, vacunas auxotróficas y vacunas de ADN (82-84). Orme I. et al., han reportado que de alrededor del 50 % de los 170 candidatos o combinaciones de los candidatos que han sido probados, caen en la categoría de "vacunas de subunidades", lo que refleja el aumento de conocimiento sobre las proteínas del bacilo y un mayor acceso a las técnicas que ayudan a la identificación de las proteínas inmunogénicas (85). Numerosos grupos de investigación están trabajando en vacunas de subunidades contra la tuberculosis, ya sea utilizando proteínas recombinantes o rDNA codificante para tales proteínas/antígenos. Esta clase de vacunas también incluye proteínas de fusión que constan de varios antígenos. Todos ellos necesitan adyuvantes potentes, una característica inherente que comparten con carbohidratos conjugados a proteínas. El mayor problema con las vacunas de subunidades es la selección de los antígenos. Como es poco probable que una única proteína de fusión o un péptido largo que contenga hasta dos o tres diferentes cadenas de péptidos pueda ser suficiente para generar respuestas inmunes que garanticen la protección, se supone que un conjunto de antígenos más grande que contenga varios de las subunidades de antígenos actuales considerados como candidatos vacunales tendrán una mayor probabilidad de ser eficaz. La construcción de una "vacuna de cocktail de antígenos" actualmente parece ser un problema, ya que cada grupo de investigación tiene sus propios antígenos y adyuvantes preferidos que, además de los asuntos relacionados con patentes, complica aún más el desarrollo de una vacuna de este tipo optimizado de "antígeno mixto". En su mayor parte, estas vacunas 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 *Mtb*. Los principales tipos de estos candidatos de vacunas son antígenos de *Mtb* en vectores virales y antígenos de proteínas recombinantes en combinación con adyuvantes.

Las proteínas recombinantes pueden ser poco inmunogénicas cuando se administran solas, 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 subunidades, 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, pero suficientemente seguros para ser utilizados en seres humanos. Los únicos adyuvantes de vacunas aprobados para uso humano hoy son las sales de aluminio AS03/04 y MF59, que promueven principalmente una respuesta humoral o Th2 (86, 87).

La aproximación de la Fundación Instituto de Inmunología, en la que se basa este trabajo, surge como una alternativa en la búsqueda de candidatos vacunales. Se plantea el uso de péptidos sintéticos teniendo en cuenta sus ventajas como herramientas para la producción de vacunas:

- a) las vacunas sintéticas son química y físicamente muy bien definidas, a nivel de un solo átomo, por numerosas técnicas físicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectroscopia de masas (MS), dicroísmo circular (CD), espectroscopia infrarroja (IR), resonancia magnética nuclear (^1H RMN), cristalografía de rayos X, y por métodos química disponibles en la actualidad, garantizando su pureza y la reproducibilidad de los resultados obtenidos con dichas moléculas.
- b) Pueden estar libres de contaminantes tales como endotoxinas, análogos peptídicos, derivados, reactivos, etc, que pueden ser fácilmente detectados por HPLC, MS, o ensayos biológicos, y pueden poner en peligro su uso en seres humanos conduciendo a reacciones secundarias adversas perjudiciales.
- c) Se pueden sintetizar fácilmente, en cantidades ilimitadas, en una manera reproducible y automatizada, utilizando tecnologías muy simples, baratas y asequibles.
- d) Sus productos liofilizados se mantienen estables a temperatura ambiente durante varios años y no requieren refrigeración o mantenimiento en una cadena de frío, facilitando así su entrega y almacenaje en las áreas más subdesarrolladas del mundo.
- e) Se pueden modificar a voluntad, siguiendo los principios que se han descrito para inducir o mejorar su inmunogenicidad y eficacia protectora (88, 89).

Con estas características nuestros esfuerzos se han enfocado en emplear péptidos sintéticos

en la búsqueda de epítomos que pertenecen a algunas proteínas que podrían estar involucrados en la interacción de células micobacterias-célula hospedera. Estas regiones identificadas como HABPs que, en la mayoría de los casos, son capaces de inhibir la entrada de la micobacteria en ensayos *in vitro* cuando se utilizan líneas celulares modelo (macrófagos derivados de monocitos U937 y células epiteliales A549) son la base de los posibles candidatos vacunales. Lo anterior surge de lo que se ha denominado el decálogo de reglas y principios para el diseño de una vacuna sintética (89), obtenidos a lo largo de más de 30 años de investigaciones en malaria y que se resumen en:

- 1) Deben usarse HABPs (péptidos con alta capacidad de unión específica), debidamente modificados, cortos (15 a 20 aminoácidos de longitud), sintetizados químicamente, conservados para inducir inmunidad esterilizante, debido a su alta especificidad y a las características estructurales tridimensionales exquisitamente adoptadas.
- 2) Se deben identificar claramente los HABPs involucrados en diferentes procesos de invasión ya sea en la misma proteína, en diferentes dominios de la misma o en diferentes proteínas ubicada en diferentes compartimentos celulares.
- 3) Empleando técnicas tan sencillas como el dicroísmo circular es posible identificar péptidos relevantes, teniendo en cuenta que los HABPs pueden tener una estructura compartimentalizada.
- 4) Los HABPs deben ser modificados apropiadamente para encajar en las moléculas del CMH para evitar el denominado “silencio inmunológico”.
- 5) La polaridad de algunos residuos críticos en la unión de los HABPs debe desplazarse en la secuencia nativa para romper su silencio inmunológico y hacerlos inmunogénicos e inductores de protección.
- 6) Luego de modificar los residuos de unión críticos se deben cambiar aquellos residuos que permitan establecer enlaces de Hidrógeno entre los átomos del esqueleto peptídico y las moléculas receptoras, o componentes de sitios enzimáticos
- 7) Estas modificaciones sitio-dirigidas deben hacerse para inducir cambios en la estructura tridimensional de los HABPs permitiendo su ajuste dentro del surco de unión de las moléculas del CMH.
- 8) Una vez se han hecho las modificaciones, debe haber $\sim 3 \text{ \AA}$ de distancia entre los átomos más distantes del HAPB inmunogénico, inductor de protección para que los residuos ajusten en los bolsillos P1 a P9 del MHC.
- 9) Se debe tener en cuenta la participación de residuos de aminoácidos expuestos al

solvente o de contacto con el receptor de células T (TCR), las modificaciones también deben conducir a la unión con el TCR para la presentación de HABPs modificados a los diferentes haplotipos o alelos.

- 10) Se debe tener especial cuidado cuando se realizan estas modificaciones, ya que el acortamiento inapropiado de la longitud del péptido y la variación de la orientación los residuos para inducir un cambio en la estructura y en las características funcionales respecto HABPs modificados, puede inducir la unión a un haplotipo diferente.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Establecer la capacidad de unión específica de secuencias de lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis* a macrófagos y análisis de la respuesta inmune.

4.2. Objetivos específicos

- Seleccionar lipoproteínas con base en la información de genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, mediante el uso de herramientas bioinformáticas.
- Determinar la presencia de genes codificantes de dichas proteínas y su expresión en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
- Identificar secuencias con alta capacidad de unión (High Activity Binding Peptides –HABPs-) a macrófagos mediante ensayos *in vitro* del tipo receptor-ligando.
- Establecer la capacidad de inhibición de HABPs derivados de lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la infección *in vitro* a macrófagos humanos y murinos.
- Evaluar la respuesta inmune mediada por péptidos de las lipoproteínas de interés, en el modelo murino *in vitro*.

5. Hipótesis

Los péptidos sintéticos derivados de las lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis* que presenten una alta capacidad de unión a los macrófagos serán capaces de modular la respuesta inmune y podrían inducir una respuesta inmunitaria protectora contra este agente patógeno.

6. Metodología

El esquema de la figura 4 resume de manera general la metodología utilizada en el desarrollo del presente proyecto y constituye una manera lógica y racional para la búsqueda de secuencias con un papel funcional en la interacción patógeno – hospedero:

6.1. Selección de proteínas

Las secuencias proteicas de *M. tuberculosis* H37Rv se obtuvieron de la base de datos del Instituto J. Craig Venter (JCVI) en <http://www.jcvi.org/> y están reportadas en el genoma de *Mtb* H37Rv (16). Para seleccionar las proteínas a ser estudiadas se emplearon herramientas bioinformáticas de dos tipos: las específicas basadas en características propias de las proteínas y las de localización subcelular.

Para la primera se realizó la búsqueda de secuencias señal características teniendo en cuenta cada una de las vías de transporte descritas para las bacterias (Sec, Tat y “lipobox”) que han sido validadas para su uso en *M. tuberculosis* (90, 91); para este análisis se emplearon las herramientas computacionales disponibles: SignalP 3.0 (92) <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; TatP 1.0 (93) <http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/> y LipoP 1.0 (94) <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>. Para la predicción de proteínas secretadas por vías no-clásicas se empleó el servidor SecretomeP 2.0 (95) <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>.

Se llevó a cabo la predicción de la topología transmembranal e hidrofobicidad para cada una de las proteínas candidatas resultantes en cada una de las vías de secreción por medio de las herramientas bioinformáticas TMHMM versión 2.0 (96) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y el predictor de topología transmembranal y péptido señal Phobius (97) <http://phobius.sbc.su.se/>.

Para la segunda, se realizó el análisis predictivo basado en la clasificación por localización subcelular general; para ello, se emplearon las herramientas Gpos-PLoc (98) (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Gpos/>), PSORTb v.2.0.4 (99) (<http://www.psort.org/psortb/>) y PA-SUB v.2.5 (100) (<http://pasub.cs.ualberta.ca:8080/pa/Subcellular>).

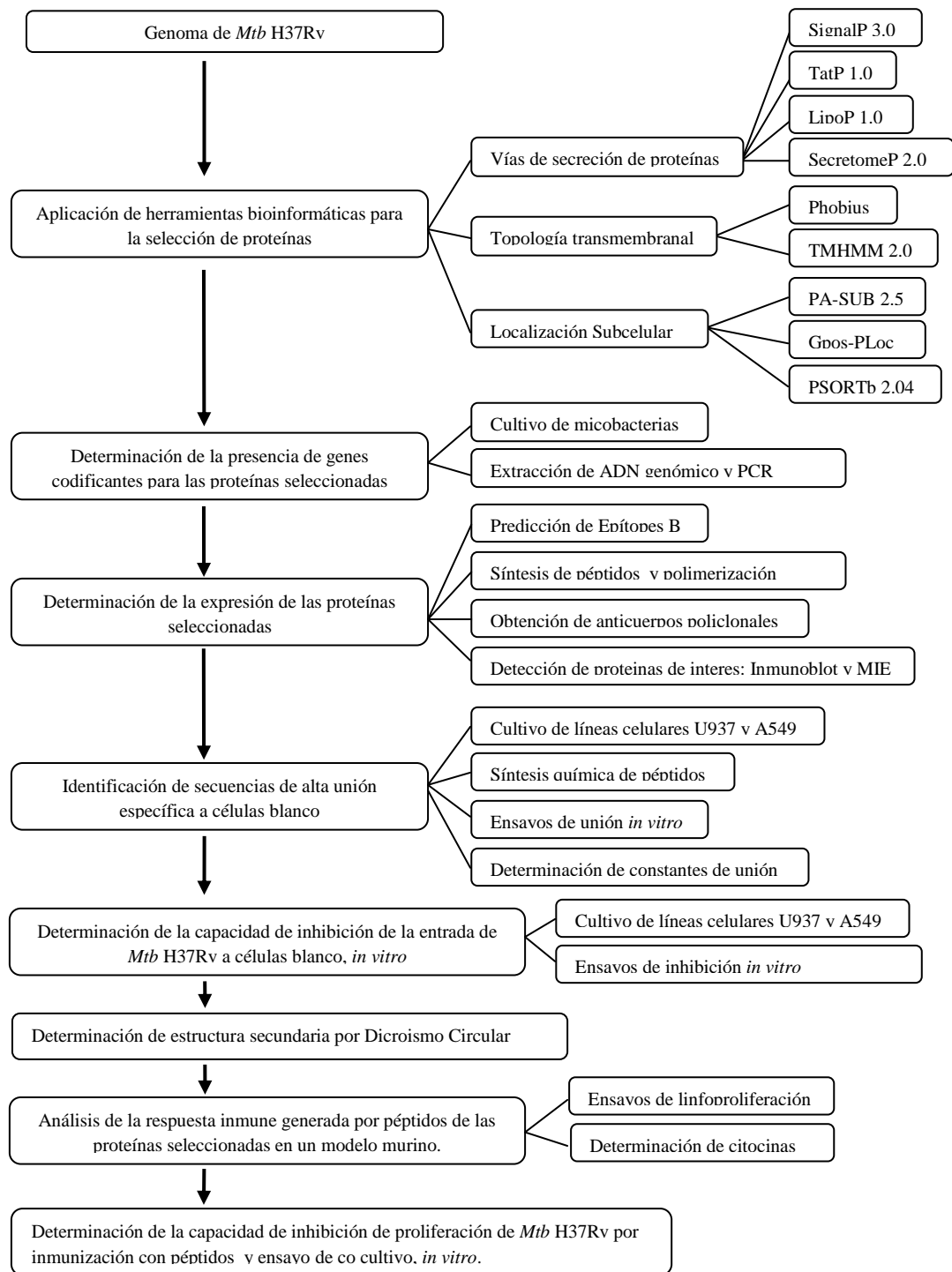


Figura 4. Esquema del diseño metodológico. Se observa de manera esquemática la metodología empleada para la búsqueda de secuencias funcionalmente importantes para la interacción *Mtb*-célula blanco.

Una vez se seleccionaron las proteínas predichas como secretadas y ancladas a la superficie de *Mtb*, se utilizó la herramienta BLink ("BLAST Link") para buscar secuencias similares en otras cepas o especies de *Mycobacterium*, que se encuentran almacenadas en la base de datos Entrez Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/blink.cgi?mode=query>); siendo de interés aquellas que se encuentran reportadas en cepas y aislados de *Mtb* y en cepas patógenas de *Mycobacterium*.

6.2. Detección de la presencia de los genes codificantes

Se realizó la extracción del ADN cromosómico y ensayos de PCR (polymerase chain reaction) con el fin de determinar la presencia de los genes que codifican para las proteínas preseleccionadas en las cepas *Mtb* H37Rv (ATCC 27294), *Mtb* H37Ra (ATCC 25177), *M. bovis* (ATCC 19210) y *M. bovis* BCG (ATCC 27291, subcepa Pasteur) bajo condiciones normales de cultivo. Las cepas y especies de micobacterias se cultivaron de 5 a 15 días en medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementado con ácido oleico, albumina, dextrosa, y cloruro de sodio (10% OADC), incubándose a temperatura óptima hasta alcanzar una densidad óptica DO₆₀₀ de 0.5 a 1.0. La micobacteria, inactivada por calentamiento a 80°C, se cosechó cuando ésta se encontraba en la fase de crecimiento logarítmica, se centrifugó a 12.500 g por 20 min a 4°C, se suspendió en PBS y se almacenó a -20°C.

El ADN genómico (ADNg) se aisló de la micobacteria usando el kit Ultra Clean Microbial DNA Kit (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo de PCR se llevó a cabo en un termociclador LABNET MultiGene Thermal Cycler (Woodbridge, NJ, USA) incubando 100ng de gADN con la mezcla que contiene 1.25 unidades de BioTaq™ DNA polimerasa (Bioline, London, UK), buffer de reacción para Taq polimerasa 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.25mM y cada primer (1 µM) en un volumen final de reacción de 25-µL.

La calidad del ADN extraído se probó amplificando un fragmento de 360pb del gen *rpoB*, que codifica la subunidad B de la ARN polimerasa, usando los primers directo: 5'-TCAAGGAGAAGCGCTACGA-3' e inverso: 5'-GGATGTTGATCAGGGTCTGC-3'.

Para determinar la presencia de los genes que codifican para las proteína seleccionadas se usaron cuatro pares de primers específicos con las secuencias: *rv1411-D* (5'-

ATGCGGACCCCCAGACG-3') y *rv1411-R* (5'- GTGACCTGGACCTTCTCG-3'); *rv1911-D* (5'- CGGTGACAGTCGAGAGAC-3') y *rv1911-R* (5'- CCTGTGCTATCGCCTGTG-3'); *rv2270-D* (5'-CGTGGCGGCATTGCGTC-3') y *rv2270-R* (5'-GCAGCAAACAGATGACGG-3'); *rv3763-D* (5'-GTCGACTACAGGAAGCGG-3') y *rv3763-R* (5'-GCGGTCCCAGTGATCTTG-3').

La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: paso denaturante a 95°C por 5min, seguida por 35 ciclos que consistieron de 1min a 56°C (para *rv1411* y *rv1911*) o a 58°C (para *rv2270* y *rv3763*), 1 min a 72°C y 1 min a 95°C. Se realizó un ciclo final de extensión a 72°C por 5 min. En cada ensayo se usó agua libre de nucleasas como control negativo, manteniendo las mismas condiciones de reacción. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

6.3. Determinación de la expresión de proteínas.

Una vez se ha determinado la presencia de los genes que codifican para las proteínas seleccionadas, se buscó establecer si dichas proteínas se expresan en *Mtb* H37Rv en condiciones normales de cultivo, en fase logarítmica de crecimiento. Para esto se obtuvieron sueros en conejos, por inoculación de péptidos sintéticos en forma polimérica de los epítopes B derivados de cada una de las proteínas seleccionadas. Para establecer la localización de las proteínas de interés se realizaron estudios de inmunomicroscopía electrónica en *Mtb* H37Rv intacta e inmunoblots contra fracciones subcelulares de la micobacteria.

6.3.1. Predicción de epítopes B lineales

Sobre las secuencias reportadas en GeneBank para cada una de las proteínas seleccionadas se hizo la predicción de epítopes B lineales empleando la herramienta ANalyse THE PROTEins (AntheProt) disponible en <http://antheProt-pbil.ibcp.fr/> y el servidor BepiPred 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) (101). La secuencia de los epítopes lineales predichos por BepiPred se comparó con los valores dados para cada aminoácido por AntheProt teniendo en cuenta los 3 perfiles fisicoquímicos: antigenicidad combinada, hidrofiliidad y accesibilidad al solvente. Los valores obtenidos para cada perfil se

promediaron en grupos de 20 aminoácidos. Para cada proteína, las regiones con los mejores promedios se consideraron como un buenos epitopes de células B y para seleccionarlos se tuvo en cuenta que estuvieran presentes exclusivamente en *Mtb*, basados en los análisis de homología dados por la herramienta BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

6.3.2. Síntesis de péptidos poliméricos

Basados en las predicciones de epitopes B para cada proteína, se llevó a cabo la síntesis múltiple de péptidos en fase sólida (102), de 3 péptidos de 20 aminoácidos de longitud no sobrelapados, se empleó resina 4-metilbencilhidrilamina, BHA (sustitución 0,7meq/mg) y aminoácidos protegidos con el grupo t-Boc. Los péptidos fueron liofilizados, purificados por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) y caracterizados por espectrometría de masas MALDI –TOF (Bruker, USA). Durante la síntesis, se adicionaron residuos de cisteína y glicina en los extremos N- y C- terminal de cada uno de los péptidos y se llevó a cabo la oxidación a pH 7,5 para permitir su polimerización.

6.3.3. Inmunización de conejos

Se seleccionaron dos conejos hembras *New Zealand*, que no presentaron reactividad al lisado total de *Mtb* H37Rv detectada por Western blot, por cada lipoproteína. Se inocularon con la mezcla de los péptidos poliméricos emulsificados con adyuvante incompleto de Freund (concentración final 0,5 mg/mL), administrada por vía subcutánea los días 0, 20 y 40. Los sueros fueron obtenidos a partir de la sangre recolectada, por la vena marginal de la oreja, antes de la primera inmunización (suero pre-inmune) y después de 20 días de la tercera inoculación (suero inmune). En la tabla 1 se muestran las secuencias de los péptidos sintetizados para cada una de las proteínas y su numeración de acuerdo con la base de datos de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC.

Tabla1. Secuencias de los epitopes B lineales sintetizados para cada una de las proteínas seleccionadas

Proteína	Péptido	Secuencia
Rv 1411c	37079	CGSKPSGGPLPDAKPLVEEATAQTGC
	37080	CGVNQIAPPFNATQPVPATVWIGC
	37081	CGSDFGPAADIYDPAQVLNPDTGC
Rv 1911c	37797	CGTTVDATTPAPAAEPLTIASPGC
	37798	CGSGSTADGQTPAGGHSVPNSGGC
	37799	CGALQLPPGATGVQAAQAIQAGC
Rv 2270	37800	CGSNGARGGIASSTNMNPTNPPAGC
	37801	CGTAETATVSPTPAPQSARTETGC
	37803	CGIDSHQDRTGADPTPSTVITLGC
Rv 3763	37086	CGYTSGTGQGNASATKDGSHYKIGC
	37378	CGAGLSGTSSNKSTTGSETTTGC
	37379	CGAAVLTDGNPPEVKSVGLGNVGC

6.3.4. Obtención de lisado y fracciones subcelulares de *M. tuberculosis* H37Rv

Después de un periodo de incubación de ~20 días a 37°C en agitación en medio líquido 7H9 con Tween 80 al 0,05% y glicerol al 0,2%, enriquecido con 10% de OADC, la micobacteria se cosechó por centrifugación a 12.500 g durante 20 min a 4°C y se resuspendió en PBS 1X. Para la obtención del lisado total, las micobacterias fueron resuspendidas en un volumen mínimo de solución de PBS que contenía ADNasa, ARNasa e inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo -PMSF-1 mM, EDTA 1 mM, Leupeptina 1 mg/mL y Pepstatina A 1mg/mL). Se sonicó dos ciclos de 15 min cada uno, con una amplitud de 3,0 y un ciclo de trabajo del 80% en baño de hielo, usando un sonicador *Branson Sonifier® Ultrasonic Cell Disruptor 450* (Branson Ultrasonics Co, Danbury, CT, USA). El sonicado se centrifugó a 3.000 g por 5 min a 4°C para eliminar células sin lisar y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 36.000 g por 45 min a 4°C. La concentración de las proteínas solubilizadas en el sobrenadante se determinó por la técnica del ácido bicinónico , BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) usando como estándar albúmina sérica bovina (BSA) en un lector de ELISA (Multiskan® EX, Waltham, MA, USA).

Para la obtención de las fracciones subcelulares se siguió el protocolo descrito por Rezwan (103). Alícuotas de cultivo de *Mtb* H37Rv se centrifugaron a 100.000 g por 20 min a 4°C, el sobrenadante se filtró por membrana de 0,2 µm para obtener sobrenadante de cultivo. El pellet resultante se lavó 3 veces con PBS y se resuspendió en buffer con inhibidores de proteasas, se sonicó bajo las condiciones ya descritas y el sobrenadante obtenido, después de descartar las células sin lisar, se centrifugó a 27.000 g por 1 h a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer con lisozima (sin DNAsa y RNAsa) y se centrifugó una vez mas por 1 h a 4°C y 27.000 g. El pellet obtenido de esta centrifugación, que corresponde a la **pared celular**, se resuspendió en bicarbonato de amonio, mientras que se reunieron los sobrenadantes de las primera y segunda centrifugaciones y se centrifugaron de nuevo a 100.000 g por 4 h a 4°C. Este nuevo sobrenadante obtenido corresponde a la **fracción citosólica** que es centrifugado de nuevo a 100.000 g por 4 h a 4°C para remover las trazas de proteínas de membrana (pellet). Se reunieron todos pellets que contenían las proteínas de **membrana**. Las fracciones obtenidas se lavaron con buffer de lisis libre de DNAsa-RNAsa y se dializaron en membranas de 3500 MWCO (Spectra, CA, USA) contra bicarbonato de amonio 10mM por 24 h a 4°C, realizando 3 cambios de buffer. Las fracciones dializadas se concentraron y cuantificaron por BCA, luego se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Además de las fracciones separadas en el laboratorio se contó con las fracciones de pared, membrana y citosol obtenidas del *National Institute of Health* (NIH) *Biodefense and Emerging Infection Research Resources Repository*, *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID).

6.3.5. SDS-PAGE e Inmunoblot

Las proteínas tanto del sonicado total como de las fracciones subcelulares de *Mtb* (500 mg/mL) se separaron por SDS-PAGE, usando un gradiente de acrilamida del 10 al 20%, posteriormente el gel se transfirió a membrana de nitrocelulosa (Hybond, Pharmacia, GE Healthcare, UK) (104). Las membranas se incubaron con solución de bloqueo que contiene leche descremada al 5% en TBS-T (0.02 M Tris-HCl a pH 7.5, 0.05 M NaCl y 1% Tween 20) por 2 h con agitación suave. Luego de 3 lavados con TBS-T, se cortaron tiras de 0.5 cm que se incubaron con los sueros (pre e inmune) diluidos 1:50 en solución de bloqueo, por 1h. Al terminar el tiempo de incubación, las tiras se lavaron y se incubaron con anticuerpo anti-

IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina (Vector Laboratories, Inc. CA, USA) por 1h, seguido por 5 lavados con TBS-T. La reacción se reveló con el kit NBT/BCIP (Promega, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.3.6. Microscopía inmunoelectrónica.

La localización subcelular de cada una de las proteínas, se realizó fijando la micobacteria en solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,5% en PBS a pH 7,2, manteniendo a 4°C por 2 h. La deshidratación se llevo a cabo haciendo ciclos de centrifugación (10.000 g por 10 min) seguidos de la inmersión de la bacteria en etanol al 50%, 70%, 90% y 100% por 15 min. La inclusión de la bacteria se llevó a cabo en resina LR-White (SPI supplies, PA, USA). Se montaron cortes ultradelgados (400 nm) sobre rejillas de níquel de 300 mesh. Para el inmunomarcaje, la muestra se bloqueó por incubación con solución de BSA 5% - Tween 0.4% en PBS, a temperatura ambiente por 30 min. Después de varios lavados, se incubaron las rejillas con el anticuerpo primario, correspondiente a suero de conejo inoculado con péptidos (pre o inmunes), diluido 1:50 en solución bloqueadora durante toda la noche a 4°C. Posteriormente y después de 3 lavados se incubó con el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo acoplado a oro coloidal de 10nm) (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 1 h a temperatura ambiente (105). Finalmente, se adicionó acetato de uranilo al 5% para aumentar el contraste de imagen, luego de lavados con agua destilada y secado las muestras se analizaron en microscopio electrónico de transmisión CM 10 operado a 100 kV (Hitachi HU-12A).

6.4. Identificación de secuencias con alta capacidad de unión (High Activity Binding Peptides –HABPs–)

Una vez se reconoció la presencia de los genes que codifican para las proteínas seleccionadas y la expresión de las mismas en la superficie de *Mtb* H37Rv, se realizó la determinación de las secuencias de unión específica a diferentes líneas celulares (A549 epiteliales alveolares y U937 macrófagos derivados de monocitos humanos), posibles blancos de infección por esta micobacteria. Se llevaron a cabo ensayos del tipo receptor ligando empleando la metodología previamente reportada, donde se usan péptidos sintéticos

que cubren la secuencia completa de cada una de las proteínas seleccionadas, los cuales son radiomarcados y probados en ensayos de unión. Para aquellos que presentaron alta capacidad de unión específica se realizaron ensayos de saturación como una forma de caracterizar su interacción con la célula blanco.

6.4.1. Cultivo de líneas celulares

La línea celular U937 (ATCC CRL-1593.2, derivados de linfoma histiocítico humano) se diferenció a macrófago adherente por incubación con forbol miristato 200 nM (PMA, Sigma-Aldrich) durante 3 días a 37°C y 5% de CO₂. Las células A549 (ATCC CLL-185, epiteliales basales alveolares derivadas de adenocarcinoma humano) y las U937 adherentes se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Eugene, OR, USA), suplementado con 5% de SFB (Suero Fetal Bovino) a 37°C y 5% de CO₂. Las células se desprendieron por incubación con el reactivo Cell Dissociation Solution Non-enzymatic (1X) (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 3min a 37°C. Las células se centrifugaron a 500 g por 5 min y se resuspendieron en medio RPMI 1640 sin suero hasta su uso.

6.4.2. Síntesis de péptidos

Los péptidos se sintetizaron por el método de síntesis múltiple en fase sólida (102), empleando resina BHA (0.5 meq/g) y aminoácidos protegidos con el grupo t-Boc. Los péptidos se separaron de la resina y de sus grupos protectivos por la técnica de clivaje con ácido fluorhídrico (HF) bajo - alto, fueron liofilizados, purificados por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), y caracterizados por espectrofotometría de masas MALDI-TOF (Bruker, Ettlingen, Alemania). La longitud de cada uno de los péptidos fue de 20 aminoácidos, no sobrelapados cubriendo la secuencia completa de las proteínas seleccionadas. Se adicionó un residuo de tirosina en el extremo C terminal a aquellos péptidos que no la contenían para permitir su radiomarcaje con Na¹²⁵I.

6.4.3. Dicroísmo Circular de péptidos

Para determinar si se encuentran elementos de estructura secundaria en los péptidos que conforman cada una de las proteínas de interés y establecer si existe alguna relación con su

actividad biológica se realizaron experimentos de dicroísmo circular. Se prepararon soluciones 0,1 mM de péptido en agua y en mezcla acuosa de trifluoroetanol (TFE, 30%). Los espectros de dicroísmo circular se tomaron en celda de cuarzo de 1cm en un espectropolarímetro Jasco J-810 termostatado (Jasco, Easton, MD, USA). El espectro final fue el resultado de tres corridas a intervalo de 0,1 nm de 260 a 190 nm a 20 °C.

Los resultados se expresaron como elipticidad residual media $[\Theta]$, cuyas unidades están dadas por grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}$, de acuerdo con la expresión:

$$[\Theta] = \frac{\Theta\lambda}{100lc n} \quad (\text{ec. 1})$$

Donde $\Theta\lambda$ es la elipticidad medida, l es la longitud del paso de luz, c concentración de péptido y n el número de aminoácidos en la secuencia peptídica particular.

6.4.4. Radiomarcaje de péptidos

El radiomarcaje con Na^{125}I se realizó de acuerdo con técnicas previamente descritas (106), se adicionaron 15 μL de cloramina T (2,75 mg/mL) y 3 μL de Na^{125}I (100mCi/ml) a la solución de péptido. Después de 15 min de reacción a temperatura ambiente, se adicionaron 15 μL de solución de bisulfito de sodio (2.3 mg/mL). El péptido radiomarcado se separó de los subproductos de elución en columna de Sephadex G-10 (Pharmacia, GE Healthcare, UK). Cada fracción eluida se analizó en contador gamma (Packard Cobra II).

6.4.5. Ensayo de unión

Se incubaron $1,5 \times 10^6$ células U937 o A549 con concentraciones crecientes de péptido radiomarcado (0 a 950 nM), en presencia (unión no-específica) o ausencia (unión total) de un exceso de péptido no radiomarcado (40 μM) por 90 min a 4°C (107, 108). Luego de la incubación, se tomó una alícuota de la mezcla de reacción y se centrifugó a 4.500 g por 3 min, sobre un colchón de mezcla de dibutilftalato-dioctilftalato 60:40. Se empleó un contador gamma Packard Cobra II (Packard, Meriden, CT, USA) para cuantificar la radiación asociada a las células. Cada punto del ensayo de unión se hizo por triplicado. Los

valores de unión específica se obtuvieron sustrayendo los valores de la unión no-específica de los correspondientes a la unión total; para cada péptido se graficaron los valores de unión específica en función de la concentración del péptido radiomarcado adicionado, la pendiente de esta gráfica permitió la identificación de los péptidos con alta capacidad de unión específica HABP por sus siglas en inglés: High Activity Binding Peptide) como aquellos con cuya pendiente fuera mayor o igual a 1%.

También se realizaron ensayos de unión con péptidos análogos (misma composición de aminoácidos pero con diferente orden en su secuencia) a los que resultaron HABPs para determinar si la alta capacidad de unión específica del péptido se debe a la secuencia específica o a la composición del mismo.

6.4.6. Ensayo de saturación

Para los péptidos que resultaron con alta capacidad de unión (HABP) en el ensayo anterior se hizo el ensayo de saturación. $1,5 \times 10^6$ células U937 o A549 se incubaron con concentraciones crecientes (0 a 7.000 nM) de péptido radiomarcado en ausencia o presencia del mismo péptido no radiomarcado. Después de la incubación, el péptido no unido se removió de las células pasando la mezcla de incubación a través de un colchón de dibutilftalato-dioctilftalato. La radiación unida a las células se leyó en contador gamma. Las curvas de saturación obtenidas se analizaron y se determinaron constantes de disociación (K_D), número de sitios de unión y coeficientes de Hill (nH) para cada una de las interacciones péptido-célula.

6.5. Determinación de la capacidad de inhibición de los HABPs

Una vez seleccionados los péptidos de alta capacidad de unión específica a las células blanco se determinó si éstos eran capaces de inhibir la entrada de *Mtb* H37Rv en ensayo *in vitro* que ha sido estandarizado previamente (109, 110). Los péptidos que mostraron actividad inhibitoria fueron de interés para continuar con la metodología propuesta.

6.5.1. Marcaje de *Mycobacterium tuberculosis*.

Las bacterias recolectadas previamente, se centrifugaron a 10.000 g por 10 min, se resuspendieron en PBS- Tween 80 (0.05%) y se les adicionó el reactivo SYBR® Safe (Invitrogen, Eugene,OR, USA) bajo agitación y luego se dejó en reposo en la oscuridad por 20 min a 37°C. Pasado este tiempo se centrifugó a 10.000 g por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la micobacteria marcada en RPMI completo.

6.5.2. Ensayo de inhibición de entrada de *Mycobacterium tuberculosis*

Las células U937 o A549 ($2,5 \times 10^5$) se sembraron independientemente en cajas de 24 pozos con medio RPMI 1640 suplementado con SFB y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ toda la noche, hasta permitir la formación de monocapa. Se retiró el sobrenadante de cada pozo y se adicionaron 200 µL del buffer Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) a las células, por cada concentración de péptido a probar se sembraron 3 pozos y un control de fluorescencia adicional. También se cuenta con triplicados de control de la invasión y control positivo de inhibición con citocalasina D (10 µM). El péptido a probar en diferentes concentraciones (2µM, 20µM y 200µM) se adicionó a la monocapa de células y se incubó a 37°C (A549) y 4°C (U937) durante 1 h. Se retiró el sobrenadante que contiene el péptido y se adicionó RPMI completo a los pozos que sirvieron como control de fluorescencia. La micobacteria marcada con SYBER® safe, resuspendida en medio RPMI y disgregada por sonicación (15 pulsos en salida 3/ciclos de trabajo al 30%), se adicionó en cada uno de los pozos manteniendo una multiplicidad de infección (MOI) de 1:10. La mezcla de células con la bacteria se incubó toda la noche a 37°C, luego se retiró el sobrenadante y se adicionó amikacina con el fin de eliminar la micobacteria extracelular y luego se adicionaron 500 µL de HBSS como solución de lavado. Se retiró el sobrenadante, se adicionó solución de tripsina para desprender la monocapa de células y se fijaron con una solución de p-formaldehído al 4%, 2 h a 4°C.

Previo a la lectura en el citómetro, las células se tiñeron con azul de metileno para evitar la emisión de autofluorescencia propia de las células. Las muestras se analizaron en un citómetro FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA), equipado con láser de argón de 488nm. Se tomaron un total de 5.000 eventos para cada muestra, la adquisición y el análisis de los

datos se realizó usando el software Cellquest (Becton Dickinson, NJ, USA). Las células infectadas se diferenciaron de las no infectadas, a partir de la mayor emisión de fluorescencia en FL1 que les confiere la bacteria marcada con SYBR safe. Los datos fueron analizados estadísticamente usando una prueba de T-Student.

Previamente a los ensayos de inhibición se determinó el posible efecto citotóxico que pudieran presentar los péptidos a ensayar con la técnica de la resazurina (*in vitro* toxicology assay kit, Sigma, St. Louis, MO, USA) donde las líneas celulares se incubaron con el reactivo por 2 h a 37°C en agitación constante luego de lo cual se realizó la lectura de fluorescencia a 590nm usando una longitud de onda de excitación de 560 nm.

6.6. Determinación de internalización de microesferas en las células blanco en presencia de los HABPs

Se llevó a cabo un ensayo de internalización que involucró la toma de microesferas fluorescentes de fluoresbrite® carboxilado GY 1.0 Micron Microspheres (Polysciences, Inc. Warrington, PA, USA) por células A549, basados en el procedimiento previamente descrito por El-Shazly (111). Aproximadamente $2,5 \times 10^6$ microesferas se incubaron con cada péptido a 2, 20 y 200 μM a 37°C por 1 h en RPMI incompleto para permitir la adsorción del péptido. Las microesferas recubiertas de péptido se incubaron con $2,5 \times 10^5$ células A549, que habían sido previamente adheridas en cajas de 96 pozos, a 37°C por 1 h con un MOI de 1:10 célula-microesfera. Luego de la incubación se removió el sobrenadante y las células se lavaron con HBSS para eliminar las microesferas extracelulares, se desprendieron las células con solución de tripsina al 0.3% y EDTA 0,017mM. Las células se centrifugaron a 2.500 rpm por 10 min y se resuspendieron en 200 μL de PBS para su posterior lectura por citometría de flujo. Se colectaron 5.000 eventos en el canal FL1, para determinar el porcentaje de fluorescencia (isocianato de fluoresceína, FITC) debido a las microesferas internalizadas.

Como control para determinar el efecto del péptido sobre las células, se incubaron inicialmente $2,5 \times 10^5$ células con cada uno de los péptidos y luego se adicionaron las microesferas sin péptido acoplado. Como control negativo se usaron microesferas sin péptido acoplado incubadas con células A549. Para algunas muestras se hizo el conteo por microscopía de fluorescencia, confirmando los datos obtenidos por citometría de flujo.

6.7. Análisis de la respuesta inmune mediada por péptidos *in vitro*

Para los péptidos que resultaron de interés: alta capacidad de unión específica a células blanco y capaces de inhibir la entrada de *Mtb* H37Rv a células blanco, se determinaron algunas características asociadas con el tipo de respuesta inmune celular que los péptidos generan en ensayos *in vitro* con células de ratón BALBc previamente inmunizados.

6.7.1. Inmunización de ratones BALB/c

Se seleccionaron 4 grupos de 4 ratones hembras BALBc de entre 5 y 6 semanas, que no presentaran reacción contra *Mtb* H37Rv determinada por Western blot. Los grupos se inocularon en los días 0, 15, 30, 45 y 60, por vía subcutánea con 0.5 µg de sonificado de *Mtb* H37Rv emulsificado con AIF, sonificado de *M. bovis* BCG emulsificado con AIF, solución salina en AIF y se mantuvo un grupo sin inmunizar (blanco).

6.7.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica de ratones BALB/c

Diez días después de la última inoculación, los animales se sacrificaron obteniéndose la sangría final por punción cardíaca en medio con anticoagulante. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés *peripheral blood mononucleated cells*) se separaron por gradiente de densidad con Ficoll Hypaque, se colocaron en medio RPMI suplementado con SFB al 10%, luego se realizaron dos lavados, por centrifugación a 1.800 rpm por 5 min. El pellet se resuspendió en medio RPMI sin SFB, se realizó el conteo y se determinó la viabilidad celular en cámara de Neubauer con azul de tripán.

6.7.3. Ensayo de proliferación y detección de citocinas

Se ajustó la concentración de células a 1×10^6 células/ mL en medio RPMI incompleto y se les adicionó el colorante fluorescente carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) a una concentración final de 1 µM y se incubó por 8 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. A continuación se adicionó un volumen igual de RPMI - SFB 20% y se incubó por 10 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, posteriormente se

centrifugó a 1.800 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en medio AIM V® (Gibco), y se colocaron las muestras en tubos de citometría de flujo. Finalmente, se adicionó cada uno de los antígenos a probar: Concanavalina A (50 µg/mL y 100 µg/mL) usado como control positivo de proliferación, lisado de *Mtb* H37Rv (10 µg/mL), *Mycobacterium bovis* BCG (10 µg/mL) y las cuatro mezclas (cada una de 10 péptidos) de los péptidos correspondientes a cada una de las proteínas a una concentración final de 10 µg/mL. Para el control negativo se usaron células marcadas con CFSE sin estímulo.

Las células se incubaron con los antígenos a 37°C con 5% de CO₂ por 48 h, cumplido el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 1800 rpm, se colectaron los sobrenadantes de cada tubo y se almacenaron a -20°C, para la posterior determinación de citocinas (BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante). Al pellet de células se les agregó medio AIMV y se hizo una nueva incubación a 37°C con 5% CO₂ durante 72 h. Se centrifugó a 1800 rpm durante 7 min, se resuspendió el pellet en PBS y se realizó la lectura por citometría de flujo en un equipo FACScan, (Becton-Dickinson, NJ, USA) adquiriendo ~1000 eventos acumulables dentro de la población de linfocitos.

6.8. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv por co-cultivo

Con base en el procedimiento reportado para la evaluación de potenciales vacunas contra *Mtb* (112) donde se cuantificó el crecimiento de *Mtb* H37Rv marcada con SYBR® Safe una vez que se permite la infección de macrófago derivados de médula ósea de ratones BALB/c. Se evaluó el efecto sobre el crecimiento intracelular de *Mtb*, que tiene la presencia de esplenocitos derivados de ratones BALB/c no inmunizados (como control) y el efecto de esplenocitos murinos obtenidos luego de la inmunización con los pools de péptidos de cada una de las lipoproteínas de interés.

6.8.1. Obtención de células de médula ósea de ratones no inmunizados.

Los macrófagos derivados de médula ósea son el blanco de infección de *Mtb* H37Rv. Las células de médula ósea se obtuvieron del fémur de ratones BALB/c no inmunizados, para lo cual se preparó una cámara saturada de éter, impregnando gasas estériles con éter y colocándolas en un recipiente de vidrio en el cual se introdujo cada ratón por 30 segundos, hasta que se notó la pérdida de la actividad motriz, se realizó dislocación cervical y se sumergió en etanol al 70% por unos segundos. Luego, se realizó la disección y extracción del fémur, el cual se depositó en una caja de petri con medio RPMI incompleto, sujetándolo de la parte media, se inyectó medio RPMI completo por uno de los extremos colectando las células hasta que el medio se tornó muy turbio. Una vez se terminaron de coleccionar las células, se centrifugaron a 2.500 rpm por 5 min, y se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio RPMI fresco para realizar el conteo.

En cajas de 96 pozos, se sembraron 1×10^6 células de médula ósea por pozo en un volumen de 200 μL de medio RPMI completo, se incubaron a 37°C y 5% CO_2 durante tres días. Al tercer día se hizo cambio de medio, retirando la mitad del volumen de cada uno de los pozos y reemplazando con 100 μL de medio RPMI completo nuevo (con antibiótico). De nuevo se incubaron a 37°C y 5% CO_2 durante 4 días más. Durante este tiempo se espera que se hayan adherido los macrófagos y no se tengan otras poblaciones celulares.

6.8.2. Obtención de esplenocitos de ratones inmunizados

Siguiendo el esquema de inmunización descrito (5 inoculaciones vía subcutánea, con 15 días de diferencia entre cada una, sección 6.7.1) se inocularon 4 grupos de 4 ratones BALB/c cada uno, con mezclas de los péptidos que cubren la secuencia de cada una de las cuatro proteínas en estudio, un grupo más se inoculó con AIF y se mantuvo un grupo control sin inmunizar.

Para realizar la extracción del bazo de los ratones inmunizados, éstos se sacrificaron por dislocación cervical, luego de permanecer en cámara saturada con éter como se mencionó anteriormente. Luego, se realizó la disección y extracción del bazo, el cual se depositó en

una caja de petri con 5 mL de medio RPMI incompleto, y después de segundos se realizó la perfusión el bazo, disgregando suavemente hasta que la membrana del bazo tomó un color blanco y se obtuvo la mayor cantidad de células. Se realizaron 2 lavados a los esplenocitos obtenidos con medio RPMI incompleto, centrifugando a 1.800 rpm por 5 min, descartando los sobrenadantes, las células se resuspendieron para realizar el conteo celular, en cámara de Neubauer usando tinción de azul de tripán.

6.8.3. Infección de macrófagos con *M. tuberculosis* H37Rv y cocultivo con esplenocitos

En cajas de 96 pozos se colocaron 7×10^5 macrófagos obtenidos anteriormente (sección 6.8.1) por pozo y micobacteria previamente marcada con SYBR Safe (numeral 6.5.1) en un MOI de 1:5, se incubaron por 4 h a 37°C, se retiraron los sobrenadantes (con micobacteria) y se hizo un lavado con HBSS. Se realizó una primera lectura de la infección (día 0) por citometría de flujo. Se agregaron 1×10^6 esplenocitos en cada uno de los pozos llevando a 200 μ L con RPMI completo, se incubaron durante 3 o 7 días a 37°C con recambio de medio al día 3. Al finalizar el tiempo de incubación, se desprendieron las células por pipeteo, se centrifugaron a 2.500 rpm por 5 min, se resuspendieron y se fijaron en paraformaldehído al 4% por 2 h a 4 °C para finalmente llevar a cabo la lectura por citometría de flujo. Para este ensayo se tuvieron controles de autofluorescencia con células de médula ósea sin micobacteria y sin esplenocitos, controles de invasión (macrófagos infectados en ausencia de esplenocitos) y controles con esplenocitos de ratones no-inmunizados.

6.9. Análisis Estadísticos.

Los datos se analizaron por la prueba t Student's, y valores de $P < 0.05$ se considerarán significativos. Los diferentes ensayos se llevaron a cabo por triplicado y los ensayos con animales se hicieron con grupos de 4 a 5 animales cada uno.

6.10. Consideraciones éticas.

Durante la ejecución de este trabajo se siguieron estrictamente todas las disposiciones nacionales e internacionales vigentes acerca de la preservación del medio ambiente y de la salud humana. El uso de animales de experimentación vivos es regulado en la República de Colombia por la Ley 84 de 1989 (Estatuto Nacional de Protección de los Animales) en el capítulo 6, concerniente al uso de animales vivos con propósitos de investigación y experimentación y por la resolución 8430 de 1993 correspondiente a Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, en su título V “La investigación Biomédica con Animales” expedida por el Ministerio de Salud y Protección Social colombiano. Los animales se mantuvieron siguiendo las condiciones dadas por la Directiva 86/609 del Consejo de Europa y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto de Salud de los Estados Unidos, NIH (National Health Institute) y que se aplican en los Procedimientos Operativos Estándar de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC).

Para el manejo de *Mtb* H37Rv se siguieron los protocolos establecidos para el manejo de muestras con microorganismos patógenos o material que pueda contenerlos, se contó con instalaciones, equipo y personal entrenado en el manejo de material biológico.

Este estudio puede ser clasificado como una “Investigación con riesgo mínimo” y durante el desarrollo del presente trabajo, no se generaron impactos ambientales negativos.

7. Resultados

7.1. Selección de proteínas de interés.

La validación de las herramientas bioinformáticas usualmente empleadas en proteínas de bacterias Gram (+) y bacterias Gram (-), permitió su aplicación en el estudio de los 3.924 marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas del inglés *Open Reading Frame*) que se encuentran en el genoma de *Mtb* H37Rv (16, 91). Es así como se identificaron 1213 proteínas que por predicción podrían ser secretadas hacia el exterior de la micobacteria o exportadas hacia la superficie de la misma. De éstas 1213, 556 no presentaron péptido señal por lo que fueron predichas exclusivamente por la herramienta SecretomeP 2.0 como proteínas secretadas por vía no clásica, 269 proteínas más presentaron secuencia señal y fueron predichas como de secreción por vía clásica, con motivos de secuencia exclusivos para las herramientas SignalP 3.0 (162 proteínas), TatP 1.0 (106 proteínas) y LipoP 1.0 (1 proteína). Para 388 proteínas adicionales se predijo secreción por vías tanto clásicas como no clásicas, es decir comparten más de una vía de secreción.

Teniendo en cuenta que la modificación postraducciona lipídica que presentan algunas proteínas favorecería que éstas se encuentren ancladas en la envoltura de la micobacteria, dadas sus características altamente hidrofóbicas, se decidió limitar el conjunto de proteínas de interés a aquellas que contiene el motivo lipobox, y que se muestran en la figura 5 en la región sombreada. Es decir que para el análisis de topología transmembranal y localización subcelular se partió de un conjunto de 69 proteínas preseleccionadas, de las 1213 secretadas por vía clásica o no clásica.

Los resultados del análisis de secuencias por las herramientas Gpos-PLoc, PSORTb v.2.0.4 y PA-SUB v.2.5 permitió seleccionar aquellas clasificadas como de membrana plasmática, sin

embargo se encontró para algunas de éstas la localización subcelular dependía de la herramienta empleada y que no había coincidencia entre ellas.

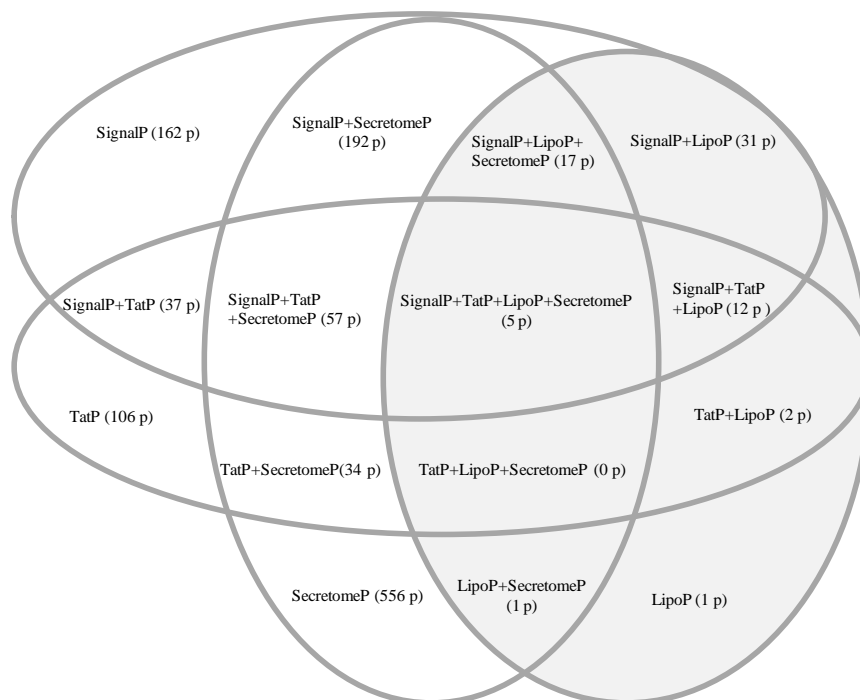


Figura 5. Selección de Proteínas de *Mtb* H37Rv. En la representación en el diagrama de Venn se muestra la clasificación de las 1213 proteínas predichas como exportadas (al medio o a la superficie de *Mtb* H37Rv) empleando las diferentes herramientas bioinformáticas: SignalP 3.0, TatP 1.0, LipoP 1.0 y SecretomeP. Entre paréntesis se encuentra el número de proteínas y la región sombreada corresponde a las 69 proteínas que contienen el motivo Lipobox y que se predicen como lipoproteínas. Adaptado de Restrepo *et al.* (76)

Dentro del grupo de las lipoproteínas con predicción de localización no citoplasmática y no extracelular se analizó la clasificación funcional propuesta por Cole *et al* (16) para excluir aquellas proteínas involucradas en procesos metabólicos o clasificadas como enzimas. Finalmente se escogieron aquellas que por su bajo peso molecular (\leq a 20 kDa) hacen posible llevar a cabo estudios posteriores de expresión y caracterización estructural por Resonancia Magnética Nuclear.

Teniendo en cuenta las características antes mencionadas se seleccionaron las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763 de *Mtb* H37Rv, algunas de cuyas características obtenidas por predicción se muestran en la tabla 2. Para las lipoproteínas Rv3763 y Rv1411c se encontró literatura disponible (4, 28, 56-60, 113-116) por lo cual se consideraron

controles de trabajo, mientras que para Rv1911c y Rv2270 éste es el primer estudio de análisis funcional.

Tabla 2. Características *in silico*, de las lipoproteínas seleccionadas.

Proteína	Descripción ⁽¹⁾	Peso Molecular, kDa	Secreción					Localización Subcelular				Topología transmembranal			
			Puntaje	LipoP Sitio de clivaje	Signal P	Tat P	SecretomeP	PA-SUB			Gpos-PLoc	PSORTb v.2.0.4	TMHMM 2.0 ⁽²⁾	Phobius	
								C	E	MP				TM	PS
Rv1411c	Probable Lipoproteína Conservada LPRG	24,6 - 21,8	19,73	26-27/Pos+2: S	x		x	-	-	x	Extracelular	Membrana citoplasmática	0	0	+
Rv1911c	Probable Lipoproteína LPPC	20,2 - 17,6	19,49	23-24/Pos+2: G	x		x	-	-	x	Extracelular	N.D.	0	0	+
Rv2270	Probable Lipoproteína LPPN	18,0 - 15,9	20,29	20-21/Pos+2: S	x	x		-	-	x	Extracelular	N.D.	0	0	+
Rv3763	19kDa Precursor del antígeno Lipoproteína LPQH	15,1 - 13,2	28,5	21-22/Pos+2: S	x		x	-	-	x	Extracelular	N.D.	0	0	+

(1): Basados en la base de datos Tuberculist, <http://tuberculist.epfl.ch/index.html>

(2): Número de hélices transmembranales predichas por TMHMM 2.0,

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

Las predicciones PA-SUB v.2.5 se clasifican en: NA: No Aplicable. C: citoplasmática; E: extracelular; MP: membrana plasmática.

En las predicciones por Phobius: TM indica la predicción del número de segmentos transmembranales, PS: indica si hay predicción de Péptido Señal.

En alineamiento múltiple de las secuencias reportadas para cada una de las lipoproteínas seleccionadas (Anexo 1. Figura 1) mostró que LpqH, LprG, LppC and LppN son conservadas en las cepas y especies del Complejo *Mtb* (MTBC) y solo se encuentran algunas variaciones no significativas en las secuencias de aminoácidos de las lipoproteínas de micobacterias que no pertenecen al MTBC, donde se intercambian aminoácidos con características fisicoquímicas similares. Estas secuencias también se encuentran presentes en diferentes aislados clínicos de *Mtb*. Se encuentra una delección de aminoácidos en el extremo N- terminal en las lipoproteínas, 3 aminoácidos en Rv1411c (MQG) y 41 aminoácidos en Rv1911c (MESPMTSTLHRTPLATAGLALVVALGGCGGGGDSRETPPY) con respecto de la secuencia reportada para *Mtb* H37Rv; esta delección puede atribuirse a que se trata de secuencias de proteínas maduras (sin la secuencia correspondiente al péptido señal) o a correcciones en las secuencias por depuración de las bases de datos. La proteína Rv2270 presenta la mayor cantidad de cambios en la secuencia de aminoácidos, aunque sigue teniendo una alta homología con la secuencia reportada para *Mtb* H37Rv, mientras que la proteína Rv3763 puede considerarse idéntica en las diferentes cepas donde se ha reportado.

7.2. Presencia de los genes codificantes.

La presencia de los genes que codifican para las proteínas Rv1411c y Rv3763 fue empleada como control de este ensayo teniendo en cuenta que la expresión de estas proteínas ya se ha comprobado experimentalmente por otros autores (116). Los experimentos de PCR mostraron una buena calidad de ADN micobacterial (Figura 6A) y permitió confirmar la presencia de los 4 genes estudiados en las cepas y especies de *Mycobacterium* evaluadas (*Mtb* H37Rv, *Mtb* H37Ra, *M. bovis* y *M. bovis* BCG), bajo condiciones normales de cultivo y en fase logarítmica de crecimiento. Los tamaños de los fragmentos amplificados obtenidos a partir del ADNg fueron 692, 479, 406 y 330 pares de bases (pb) para *rv1411*, *rv1911*, *rv2270* y *rv3763*, respectivamente (Figura 6B).

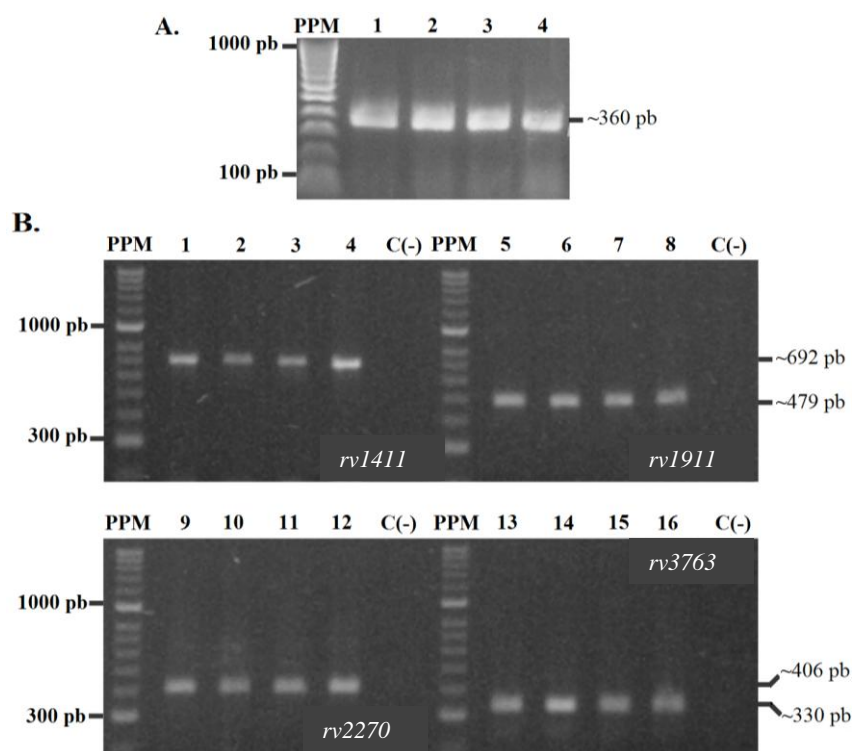


Figura 6. Determinación de los genes codificantes *rv1411*, *rv1911*, *rv2270* y *rv3763*.

(A) Amplificación del gen *rpoB* a partir del ADNg aislado de las cepas y especies de *Mycobacterium*. PPM: Patrón de Peso Molecular (1 kb); 1. *Mtb* H37Rv; 2. *Mtb* H37Ra; 3. *M. bovis*; 4. *M. bovis* BCG; C(-) control negativo de PCR. (B) PCR para la amplificación del ADNg aislado de las cepas y especies de *Mycobacterium* evaluadas. PPM: Patrón de Peso Molecular (1 kb); Líneas 1 a 4 muestran la presencia del gen *rv1411* en: (1) *Mtb* H37Rv, (2) *Mtb* H37Ra, (3) *M. bovis*, (4) y *M. bovis* BCG; Líneas 5 a 8 muestran la presencia del gen *rv1911*: (5) *Mtb* H37Rv, (6) *Mtb* H37Ra, (7) *M. bovis* y (8) *M. bovis* BCG. Líneas 9 a 12 muestran la presencia del gen *rv2270*: (9) *Mtb* H37Rv, (10) *Mtb* H37Ra, (11) *M. bovis* y (12) *M. bovis* BCG; Líneas 13 a 16 muestran la presencia del gen *rv3763*: (13) *Mtb* H37Rv, (14) *Mtb* H37Ra, (15) *M. bovis* y (16) *M. bovis* BCG. C(-) control negativo de la PCR.

7.3. Expresión y localización de lipoproteínas

Una vez se determinó la presencia de los genes que codifican para las lipoproteínas seleccionadas, se buscó establecer si dichas proteínas se expresan en *Mtb* H37Rv bajo las condiciones normales de cultivo y en la fase estacionaria de crecimiento. Con este fin se obtuvieron sueros policlonales de conejo por inoculación de mezclas de los péptidos sintéticos, en forma polimérica derivados de cada una de las proteínas seleccionadas (tabla 1). Con estos sueros se realizaron ensayos de Western blot para evaluar el reconocimiento de la presencia de las proteínas de interés tanto en el sonicado total como en las fracciones subcelulares de micobacteria.

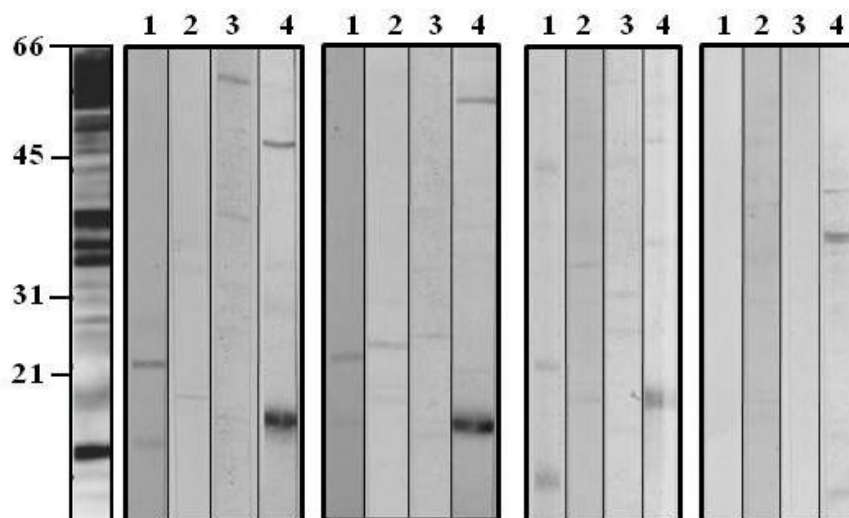


Figura 7. Reconocimiento de lipoproteínas por Western blot. Sueros obtenidos después de la tercera inoculación con péptidos poliméricos permiten reconocer las proteínas de interés en sonicado total de *M. tuberculosis* H37Rv y en fracciones subcelulares (Membrana, Pared celular y Citosol). Líneas 1 a 4 muestran los sueros pos-tercera inoculación: (1) Rv1411c; (2) Rv1911c; (3) Rv2270 y (4) Rv3763. HI: suero hiperinmune obtenido por inoculación con sonicado de *Mtb* H37Rv. El marcador de peso molecular se muestra en el lado izquierdo de la figura.

En la figura 7 se observa el reconocimiento de bandas entre 15 kDa y 30 kDa, rango dentro del cual se encuentran los pesos moleculares de las proteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763 de acuerdo con los pesos moleculares teóricos para cada una de ellas (tabla 2). En

este reconocimiento predominan bandas de ~21 kDa y ~18 kDa que corresponderían a las proteínas Rv1411c y Rv 3763 (carriles 1 y 4, respectivamente) tanto en el sonicado total como en la fracción de membrana principalmente y con un reconocimiento débil en pared celular, la proteína Rv1411c no se reconoce en el citosol, mientras que el suero dirigido contra la proteína Rv3763 no permite su reconocimiento en la altura del peso molecular teórico para esta proteína.

En cuanto a las proteínas Rv1911c y Rv2270 (carriles 2 y 3) solo se observa una reactividad débil tanto en el sonicado total como en las fracciones de membrana y pared celulares, no hay un reconocimiento en la fracción micobacteriana citosólica.

Con los anticuerpos séricos empleados anteriormente se llevó a cabo la microscopía inmunoelectrónica (Figura 8) con la cual se pudo identificar la presencia de partículas de oro coloidal en la superficie de *Mtb* H37Rv.

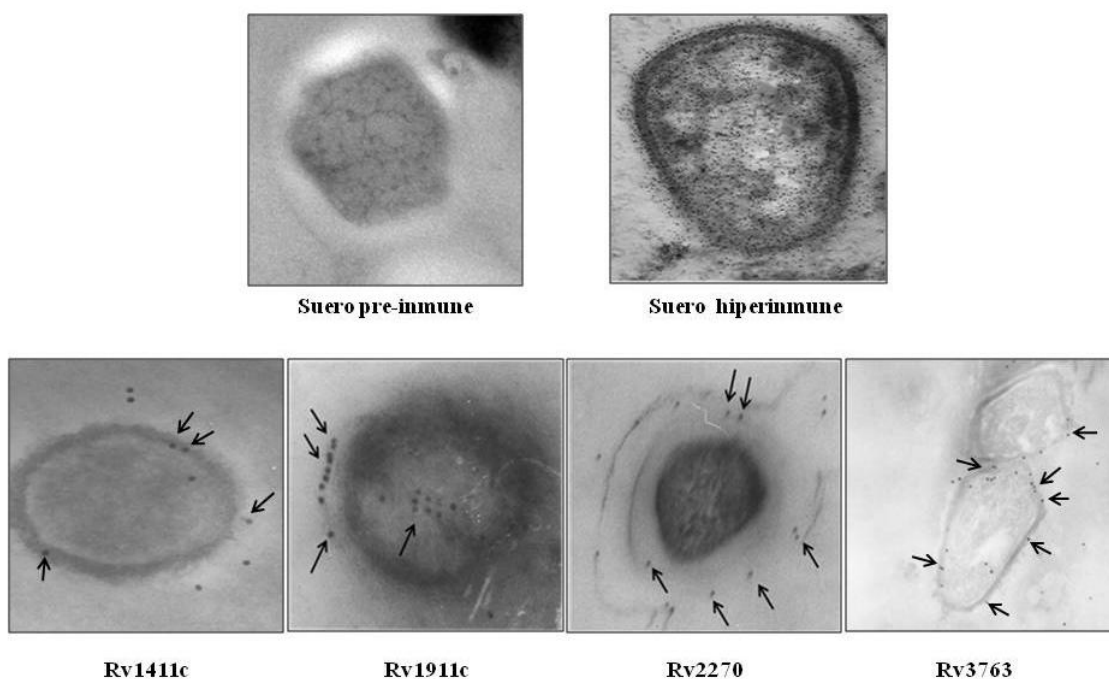


Figura 8. Reconocimiento de lipoproteínas por microscopía inmunoelectrónica. Aumento 6,000 x. La detección de las lipoproteínas se puede observar sobre la superficie del bacilo *Mtb* H37Rv, como lo indican las flechas negras. Como controles se muestran las micrografías obtenidas con suero pre-immune (control negativo) y suero hiperimmune obtenido por inoculación de sonicado total del bacilo.

Para las proteínas Rv1411c, Rv1911c y Rv3763 se observan partículas claramente definidas

en la superficie de la micobacteria, mientras que para la proteína Rv2270 el patrón de partículas se encuentra localizado en la parte más externa de la superficie micobacteriana. El reconocimiento de la proteína Rv1911c también se observa en la parte externa de la superficie de *Mtb* H37Rv.

7.4. Identificación de secuencias con alta capacidad de unión específica a células blanco.

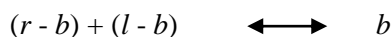
La determinación de las secuencias de unión específica a diferentes líneas celulares, posibles blancos de infección por *Mtb* H37Rv, se realizó empleando la metodología basada en ensayos del tipo receptor-ligando. Para esto se emplearon péptidos sintéticos, que cubren la secuencia completa de cada una de las proteínas seleccionadas, los cuales son radiomarcados e incubados con las células blanco de infección, bajo condiciones previamente estandarizadas.

La unión del anticuerpo monoclonal anti-CD45 (117), radiomarcado con Na¹²⁵I, a las células blanco sirvió como control para estandarizar esta metodología, aquellos péptidos que presentan unión específica superior o igual a la unión del anti-CD45 (1% de unión específica) se consideraron HABPs (por sus siglas en inglés *High Activity Binding Peptides*) para las células derivadas de monocitos U937 y/o para las células epiteliales A549.

La metodología se basa en las siguientes relaciones:



Reemplazando RL por b (ligando unido), R por $r - b$ (receptor no unido) y L por $l - b$ (ligando libre). Incluyendo estos términos en la ecuación, se tiene:



En el equilibrio, se puede calcular la constante de afinidad Ka como:

$$Ka = \frac{[b]}{[r - l][l - b]} \quad (\text{ec. 3})$$

Si la concentración de ligando (l) es constante y si $r \gg l$, entonces

$$(l - b) = l \text{ y } (r - b) = r$$

La ecuación (3) puede re-escribirse como:

$$Ka * r = \frac{[b]}{[l]} \quad (\text{ec. 4})$$

La relación $[b] / [l]$ se define como actividad de unión, los péptidos que presentaron actividad de unión mayor o igual a 0.01 (unión del 1%) se consideraron HABPs, este valor corresponde al reconocimiento de más de 40.000 sitios de unión específica por célula, en el rango de concentraciones logarítmicas de péptido radiomarcado (107).

El ensayo de unión se llevó a cabo a cuatro concentraciones diferentes de péptido radiomarcado en presencia o ausencia de un exceso de 400 veces del mismo péptido no radiomarcado. Se obtuvieron dos curvas en este ensayo una correspondiente a la unión total y otra a la unión inhibida (no-específica), ejemplos de éstas para el caso de péptidos de la proteína Rv1911c, se observan en el panel izquierdo de la figura 9. La unión específica se obtuvo como resultado de la diferencia entre la unión total y la unión no-específica, ejemplos de esta curva se observan en el panel derecho de la figura 9.

La actividad de unión del péptido se definió como la pendiente de la curva de unión específica que se grafica en función del péptido adicionado, es decir la relación péptido unido/péptido adicionado. Los ensayos de unión permitieron obtener las curvas de unión específica, a dos líneas celulares, para los 40 péptidos que comprenden las 4 lipoproteínas de interés, éstas curvas presentaron 3 tipos de comportamiento diferentes: péptidos que presentaron alta capacidad de unión específica, péptidos que presentaron actividad de unión no específica y péptidos que no presentan actividad de unión. Péptidos como el 37768 de la proteína Rv1911c ($^{101}\text{LVVDDPDAVGGLYVHWIVTG}^{120}$) presentaron alta actividad de unión específica a células A549 (la unión del péptido radiomarcado fue inhibida por el mismo péptido no radiomarcado), mientras que péptidos como el 37769 ($^{121}\text{IAPGSGSTADGQTPAGGHSVY}^{140}$) presentó alta unión no-específica a células A549 (se une a las células pero no hay inhibición con el mismo péptido no radiomarcado).

Péptidos como el 37770 ($^{141}\text{PNSGGRQGYFGPCPPAGTGT}^{160}$) no presentó actividad de unión a células A549.

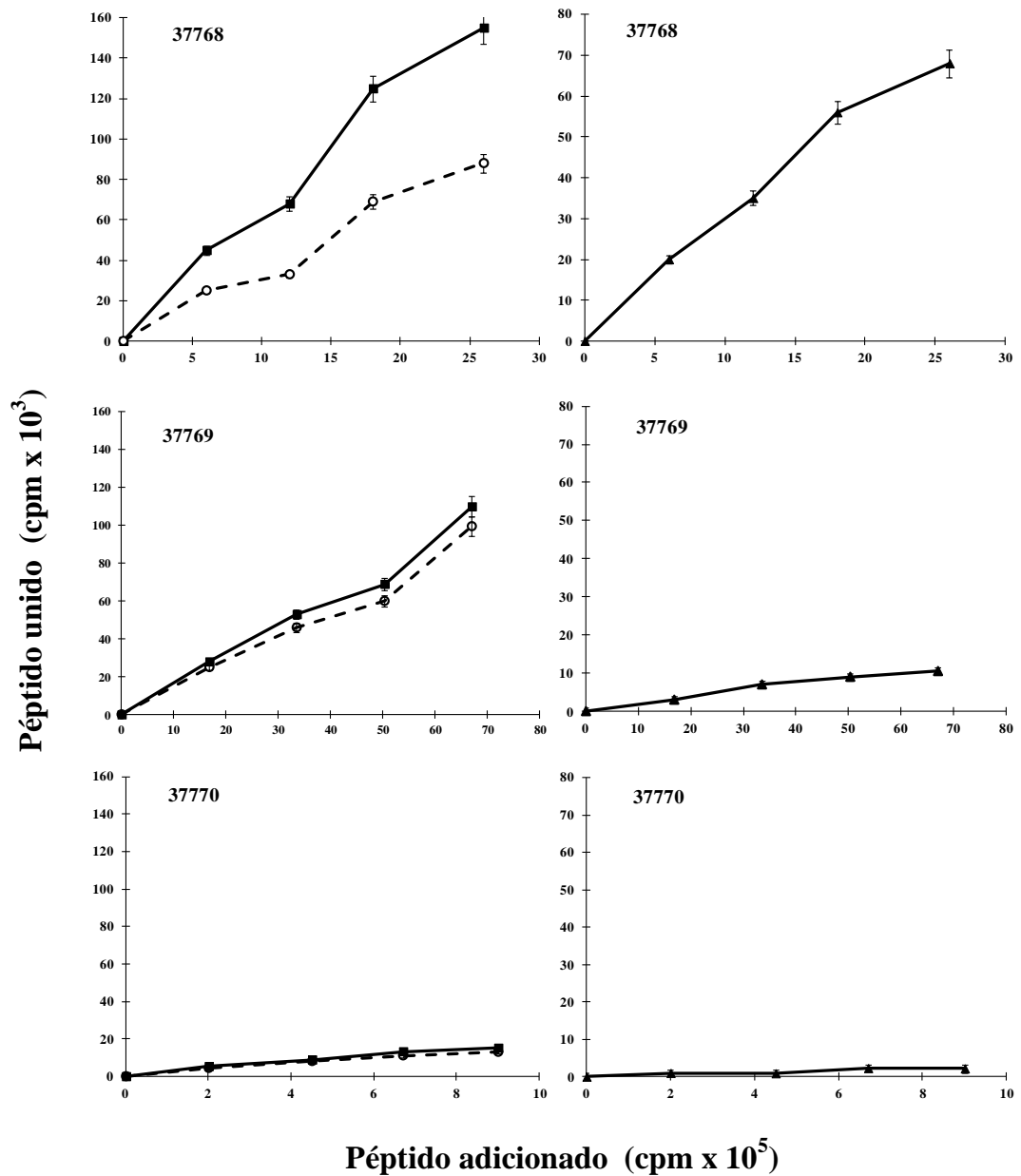


Figura 9. Patrones de unión de péptidos sintéticos a células blanco. Las gráficas de la izquierda muestran: (■) Unión total; células más péptido radiomarcado, (○) Unión no específica; células, péptido radiomarcado y un exceso de péptido no radiomarcado, representando la unión residual del péptido radiomarcado en presencia de un exceso de 400 veces de péptido no radiomarcado (▲) Unión específica = [Unión total – Unión no-específica]. Los gráficos de la derecha muestran: en el panel superior un péptido con alta unión específica (péptido 37768), en el panel central un péptido con unión no específica (péptido 37769) y en el panel inferior un péptido con baja capacidad de unión a células A549 (péptido 37770).

Los resultados de los ensayos de unión se muestran como perfiles de unión específica en la figura 10, donde puede observarse las secuencias que presentan valores iguales o superiores a 1% (barras negras) con lo cual se consideran HABPs. Ocho péptidos se identificaron como HABPs para la proteína Rv1411c: 37088 (²¹ATVVAGCSSGSKPSGGPLPDY⁴⁰), 37091 (⁸¹TTNPTAATGNVKLTLGGSDIY¹⁰⁰), 37093 (¹²¹SDFGPAADIYDPAQVLNPDT¹⁴⁰), 37094 (¹⁴¹GLANVLANFADAKAEGRDTIY¹⁶⁰), 37095 (¹⁶¹NGQNTIRISGKVSQAQAVNQIY¹⁸⁰), 37096 (¹⁸¹APPFNATQPVPATVWIQETGY²⁰⁰), 37097 (²⁰¹DHQLAQAQLDRGSGNSVQMTY²²⁰) y 37098 (²¹⁸QMTLSKWGEKVQVTKPPVSY²³⁶); los péptidos 37094 y 37098 presentaron alta capacidad de unión específica a las dos líneas celulares usadas (U937 y A549), reconociendo posiblemente un receptor común. Se encontró una región conformada por 117 aminoácidos (del residuo 121 al 236) hacia el extremo C-terminal de la proteína, con alta capacidad de unión a células epiteliales A549.

Se encontraron 7 HABPs para la proteína Rv1911c: 37763 (¹MESPMTSTLHRTPLATAGLAY²⁰), 37764 (²¹LVVALGGCGGGGGDSRETPPY⁴⁰), 37765 (⁴¹YVPKATTVDATTPAPAAEPL60), 37766 (⁶¹TIASPMFADGAPIPVQFSCKY⁸⁰), 37767 (⁸¹GANVAPPLTWSSPAGAAELAY¹⁰⁰), 37768 (¹⁰¹LVVDDPDAVGGLYVHWIVTG¹²⁰) y 37769 (¹²¹IAPGSGSTADGQTPAGGHSVY¹⁴⁰) ubicados hacia el extremo N-terminal. Los péptidos 37763 y 37768 presentaron alta capacidad de unión específica a las dos líneas celulares empleadas. La alta capacidad de unión del péptido 37763, correspondiente al péptido señal no se tiene en cuenta ya que por la característica de estas proteínas sería poco probable que esta secuencia quedara expuesta para la interacción con las células blanco.

Para la proteína Rv2270 se encontraron 4 HABPs: 37775 (²¹CSSNGARGGIASSTNMNPTNPY⁴⁰), 37777 (⁶¹ETWINLQVGDCLADLPPADLY⁸⁰), 37779 (¹⁰¹RAPVAVDAAVVSMANRDCAAY¹²⁰) y 37780 (¹²¹GFAPYTGQSVDTSPYSVAYL¹⁴⁰), de los cuales los péptidos 37779 y 37780 presentaron alta capacidad de unión tanto a células U937 como a células A549.

Solamente se encontró un HABP, el 37070 (⁴¹TASPGAASGPKVVIDGKDQNY⁶⁰), en la proteína Rv3763 con alta capacidad de unión a células U937. En esta proteína no se encontró ningún péptido con unión específica a células A549.

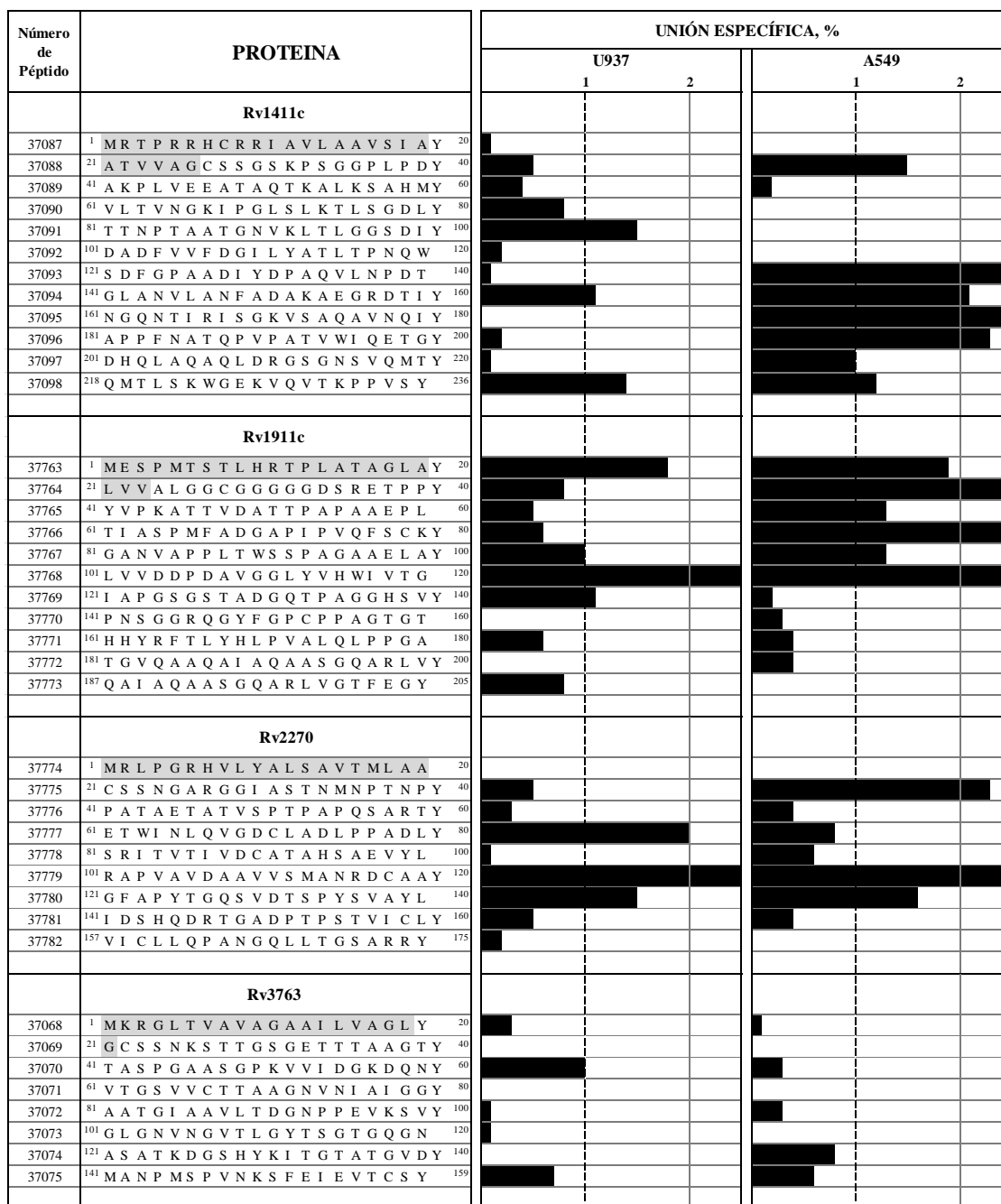


Figura 10. Ensayos del tipo Receptor - ligando. Perfiles de unión a las células A549 y U937 para los péptidos sintéticos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763. En el lado izquierdo de la figura se encuentra el número de los péptidos dado en FIDIC. Las barras negras horizontales representan la capacidad de unión específica, expresada como porcentajes para cada péptido en las dos líneas celulares ensayadas. La línea punteada vertical muestra el punto de corte del 1% de unión específica para considerar un péptido como HABP (*High Activity Binding Peptide*). En gris se muestran las secuencias correspondientes al péptido señal.

Los ensayos de unión empleando péptidos análogos a algunos de los HABPs, donde se mantuvo la composición de aminoácidos pero se cambió la secuencia de los mismos, mostraron poca o ninguna unión específica a las células blanco ensayadas. Es decir que la unión específica que presentan los HABPs depende del orden o secuencia de los aminoácidos que lo constituyen.

7.4.1. Características de la interacción HABP – célula.

Para aquellos péptidos que se encontraron como HABPs para las dos líneas celulares, se realizaron ensayos de saturación. En la figura 11 se muestran las gráficas de saturación correspondientes a la unión de los HABPs 37070 (Rv3763), 37094 (Rv1411c), 37768 (Rv1911c) y 37779 (Rv2270) a células U937.

Se llevaron a cabo los ensayos de saturación de la unión, para la caracterización de la interacción de los péptidos 37094 (Rv1411c), 37768 (Rv1911c), 37779 (Rv2270) y las células U937 y A549 y la interacción del péptido 37070 (Rv3763) con las células U937. Las curvas de saturación obtenidas y los análisis de Hill permitieron calcular las constantes de disociación (K_D) entre 800 y 2.600 nM para la interacción péptido-célula. Se obtuvieron coeficientes de Hill (nH) mayores a 1,0, sugiriendo que una interacción de cooperatividad positiva para estas interacciones receptor – ligando, es decir que la unión de una primera molécula de ligando promueve la unión de la siguiente molécula del mismo ligando. Se calcularon entre 1.8×10^6 y 8.0×10^6 sitios de unión por célula (tabla 3).

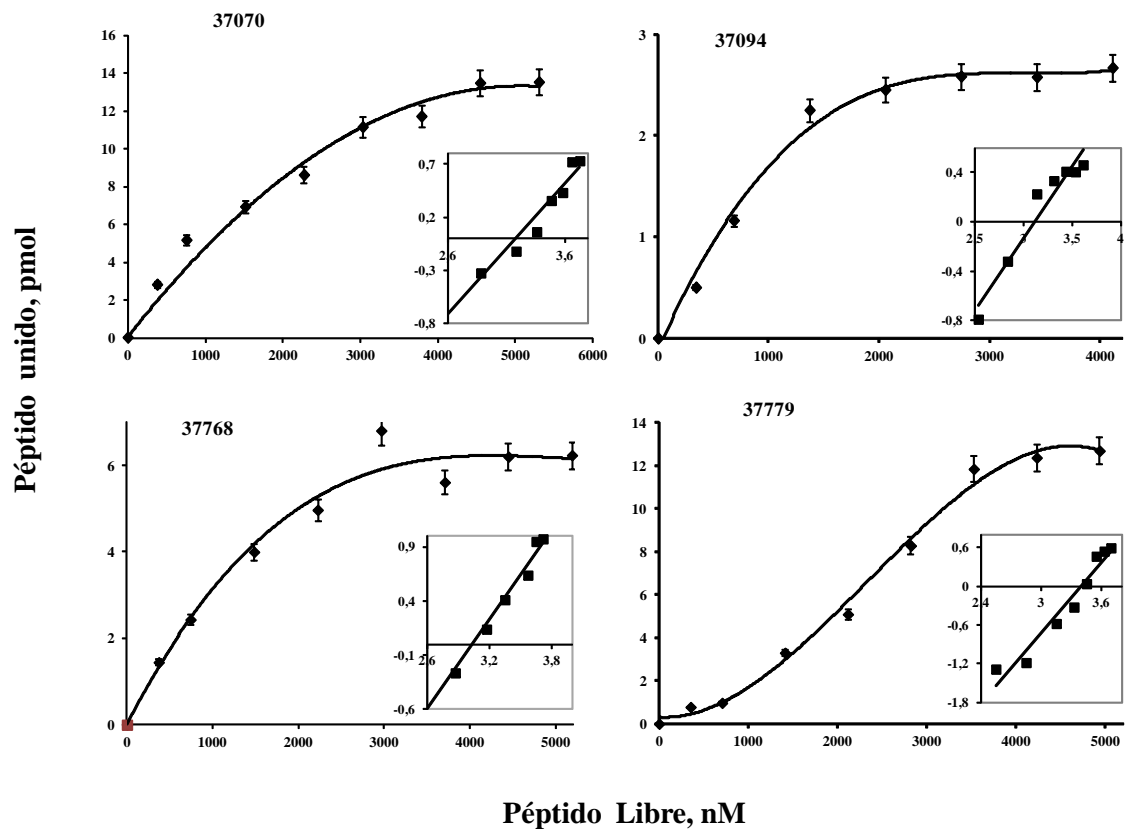


Figura 11. Curvas de saturación para la unión de los HABPs 37070, 37094, 37768 y 37779 a células U937. Las curvas de saturación se obtuvieron graficando el péptido unido específicamente ^{125}I -HABP en función de la cantidad de péptido ^{125}I -HABP adicionado. Las constantes de afinidad y el número de sitios de unión por células se obtuvieron a partir de las curvas por análisis de Hill. En el inserto, correspondiente a un gráfico de Hill, la abscisa es $\text{Log } F$ y la ordenada es $\text{Log}[B/B_{\text{máx}} - B]$, siendo $B_{\text{máx}}$ la máxima cantidad de péptido unido, B el péptido unido y F el péptido libre.

Para los péptidos que presentaron alta actividad de unión específica a las dos líneas celulares se observaron constantes con valores similares tanto para la K_D como para n_H , el número de sitios de unión por célula fue mayor en el caso de las células U937 comparado con los valores obtenidos para las células A549.

Tabla 3. Constantes de Unión de HABPs de las lipoproteínas a células U937 y A549

	Células U937				Células A549		
	37070 (Rv3763)	37094 (Rv1411c)	37768 (Rv1911c)	37779 (Rv2270)	37094 (Rv1411c)	37768 (Rv1911c)	37779 (Rv2270)
Constante de Disociación (K_D), nM	1700	1100	1000	2600	1000	1300	2200
Coefficiente de Hill (n_H)	1,4	1,2	1,6	2,6	1,3	1,4	1,8
Sitios de unión por célula	$3,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$

7.5. Capacidad de los HABPs para inhibir la entrada de *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*.

Una vez se han seleccionado los péptidos de alta capacidad de unión específica, se procedió a determinar si éstos podrían inhibir la entrada de *M. tuberculosis* H37Rv. Inicialmente se realizó el ensayo de citotoxicidad donde cada uno de los péptidos que conformaban las 4 lipoproteínas se probó en una concentración de 200 μ M frente a células U937 y A549, encontrándose que los péptidos no presentaban ningún efecto tóxico sobre dichas líneas celulares, ya que los valores de viabilidad fueron comparables a los obtenidos para las células control incubadas con RPMI.

La capacidad de inhibición se definió como la diferencia entre la cantidad de micobacterias internalizadas en ausencia de cualquier inhibidor (o 100% de invasión) y la cantidad de micobacterias internalizadas en presencia de cada uno de los inhibidores probados: péptidos a diferentes concentraciones, citocalasina D (control negativo de invasión).

Las muestras se cuantificaron en un citómetro FACScan y se obtuvieron gráficos característicos como los que se observan en la figura 12. Las células infectadas se diferenciaron de las no infectadas de acuerdo con las características presentadas en el canal FL1. Los resultados presentados en la tabla 4 muestran que HABPs como el 37091 y 37094

(Rv1411c), 37763, 37767, 37768 y 37769 (Rv1911c), 37779 y 37780 (Rv 2270) y 37070 (Rv3763) inhibieron significativamente la entrada de *Mtb* H37Rv a células U937 *in vitro*.

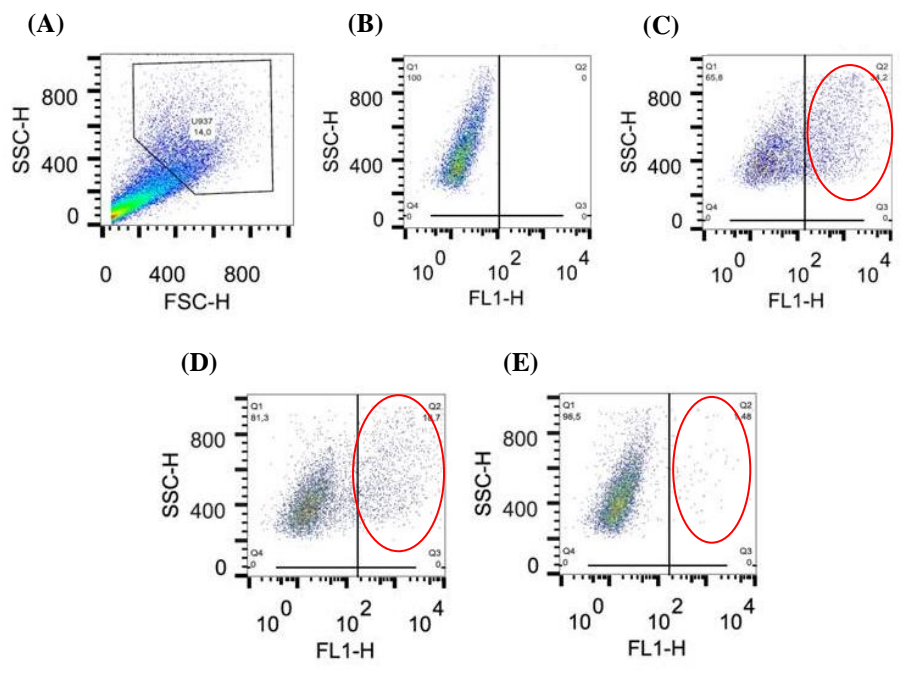


Figura 12. Inhibición de la entrada de *Mtb* H37Rv. Se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos por citometría de flujo para el ensayo de inhibición de la entrada de *Mtb* (marcada con SYBR®Safe) a células U937, donde en el panel (A) se observa la selección de la población de células U937 (blanco de infección) de acuerdo con los parámetros de tamaño y complejidad. En los paneles B a E se detecta *Mtb* que ha entrado a la célula blanco U937, siendo (B) el control de inhibición (C-) de la entrada de *Mtb* (citocalasina D 10 μ M), (C) el control de entrada (C+) de la micobacteria en ausencia de inhibidores, tomado como 100% . En el panel inferior: Inhibición de la entrada de *Mtb* obtenida en presencia de un péptido en dos concentraciones diferentes C1 y C2 (D, E).

Tabla 4. Inhibición de la entrada de *M. tuberculosis* H37Rv.

		Inhibición, %					
		Células U937			Células A549		
Proteína	Peptido	2µM	20µM	200µM	2µM	20µM	200µM
Rv1411c	37088	5,0 ± 0,25	1,0 ± 0,07	3,8 ± 0,30	25,2 ± 1,01	27,9 ± 1,67	33,5 ± 2,68
	37091	27,9 ± 1,95	24,7 ± 1,24	28,9 ± 1,73	-	-	-
	37093	-	-	-	52,1 ± 2,08	19,0 ± 1,14	5,5 ± 0,44
	37094	35,4 ± 1,77	46,8 ± 3,28	67,5 ± 4,73	1,0 ± 0,04	22,1 ± 1,77	28,8 ± 1,73
	37095	-	-	-	2,0 ± 0,08	3,4 ± 0,31	2,5 ± 0,20
	37096	-	-	-	3,1 ± 0,12	27,2 ± 1,36	72,6 ± 3,64
	37097	-	-	-	53,6 ± 2,14	52,4 ± 3,14	60,2 ± 6,32
	37098	2,8 ± 0,25	1,5 ± 0,12	3,4 ± 0,34	15,6 ± 0,62	25,2 ± 1,51	41,6 ± 2,08
Rv1911c	37763	60,9 ± 3,65	58,7 ± 4,70	63,0 ± 5,98	1,0 ± 0,04	7,5 ± 0,45	27,5 ± 1,38
	37764	1,0 ± 0,09	1,0 ± 0,08	7,5 ± 0,73	41,4 ± 1,66	19,4 ± 1,16	27,9 ± 1,40
	37765	-	-	-	11,1 ± 0,44	6,9 ± 0,41	25,5 ± 1,28
	37766	-	-	-	16,3 ± 0,65	27,3 ± 1,64	5,6 ± 1,59
	37767	19,1 ± 1,34	25,4 ± 2,03	32,9 ± 3,15	27,3 ± 1,91	50,8 ± 2,54	53,0 ± 1,59
	37768	22,3 ± 1,35	23,1 ± 1,85	41,4 ± 2,70	11,0 ± 0,44	30,8 ± 1,85	52,2 ± 3,65
	37769	45,0 ± 4,43	49,4 ± 2,96	36,0 ± 3,64	-	-	-
	37770	-	-	-	1,0 ± 0,04	1,9 ± 0,11	20,1 ± 1,01
Rv2270	37775	-	-	-	1,0 ± 0,05	35,4 ± 1,06	42,4 ± 2,54
	37777	2,8 ± 0,25	1,0 ± 0,09	1,9 ± 0,12	1,0 ± 0,05	1,0 ± 0,06	1,0 ± 0,07
	37779	22,9 ± 1,15	40,2 ± 2,81	81,1 ± 6,49	39,4 ± 1,58	32,5 ± 1,95	32,7 ± 1,31
	37780	71,0 ± 6,39	46,9 ± 3,75	14,5 ± 1,09	51,7 ± 2,07	44,2 ± 1,77	40,2 ± 2,01
Rv3763	37068	1,0 ± 0,08	3,8 ± 0,30	1,0 ± 0,05	-	-	-
	37069	11,1 ± 0,67	9,5 ± 0,67	3,4 ± 0,25	-	-	-
	37070	27,8 ± 2,50	40,2 ± 3,22	44,1 ± 3,09	5,6 ± 0,22	14,2 ± 0,85	6,4 ± 0,32

Se usó como control positivo de inhibición para las dos líneas celulares Citocalasina D (10 µM), obteniéndose valores superiores al 50% de inhibición. Tomando como 100% de entrada de *Mtb* en ausencia de inhibidores, se calculó el porcentaje de inhibición de la entrada de *Mtb* en presencia de cada uno de los péptidos probados. Los datos sombreados corresponden a aquellos significativamente importantes en la inhibición de la entrada de la micobacteria a las células blanco ($p \leq 0,01$).

Por otra parte, la entrada de la micobacteria a las células A549 resultó significativamente inhibida por la presencia de los HABPs 37088, 37094, 37096, 37097 y 37098 (Rv1411c), 37764, 37767 y 37768 (Rv1911c), 37775, 37779 y 37780 (Rv2270).

Los péptidos que no presentaron alta capacidad de unión específica a las células blanco, y que fueron usados como controles en este ensayo, no inhibieron la entrada de la micobacteria de manera significativa, con valores inferiores al 10%. Así mismo HABPs con secuencias aleatorizadas no inhibieron la entrada de la micobacteria, con lo que se demuestra la importancia de la secuencia de aminoácidos de cada péptido.

En este ensayo resultan de interés aquellas secuencias que presentan alta capacidad de unión a las dos líneas celulares y son capaces de inhibir la entrada de *Mtb* H37Rv a las mismas líneas celulares de manera dependiente de la concentración. Este es el caso de los HABPs 37094, 37767, 37768, 37779 y 37780. Al realizar el alineamiento de las secuencias de estos HABPs no se encuentra alguna secuencia consenso, los péptidos son ricos en aminoácidos no polares alifáticos lo que es una característica común en las proteínas de especies del género *Mycobacterium*.

Para los HABPs 37091, 37094, 37763, 37767, 37768, 37769, 37779, 37780 y 37070 se observa que inhiben la entrada de la micobacteria a las células U937 independientemente de la concentración del péptido, se observan inhibiciones significativas incluso a una concentración tan baja como 2 μ M. El mismo resultado se obtuvo para péptidos como 37088, 37097, 37764, 37765, 37779 y 37780 en la inhibición de la entrada de *Mtb* a células A549.

7.6. Entrada de microesferas fluorescentes en células A549 en presencia de HABPs.

Estudios previos han mostrado la utilidad de emplear perlas fluorescentes acopladas a proteínas para el estudio de toma e internalización de proteínas de *Mtb* por parte de células no fagocíticas, como las HeLa (52, 111). En este estudio se realizó un ensayo para determinar si microesferas acopladas a péptidos sintéticos derivados de las lipoproteínas seleccionadas eran internalizadas por células A549 (figura 13).

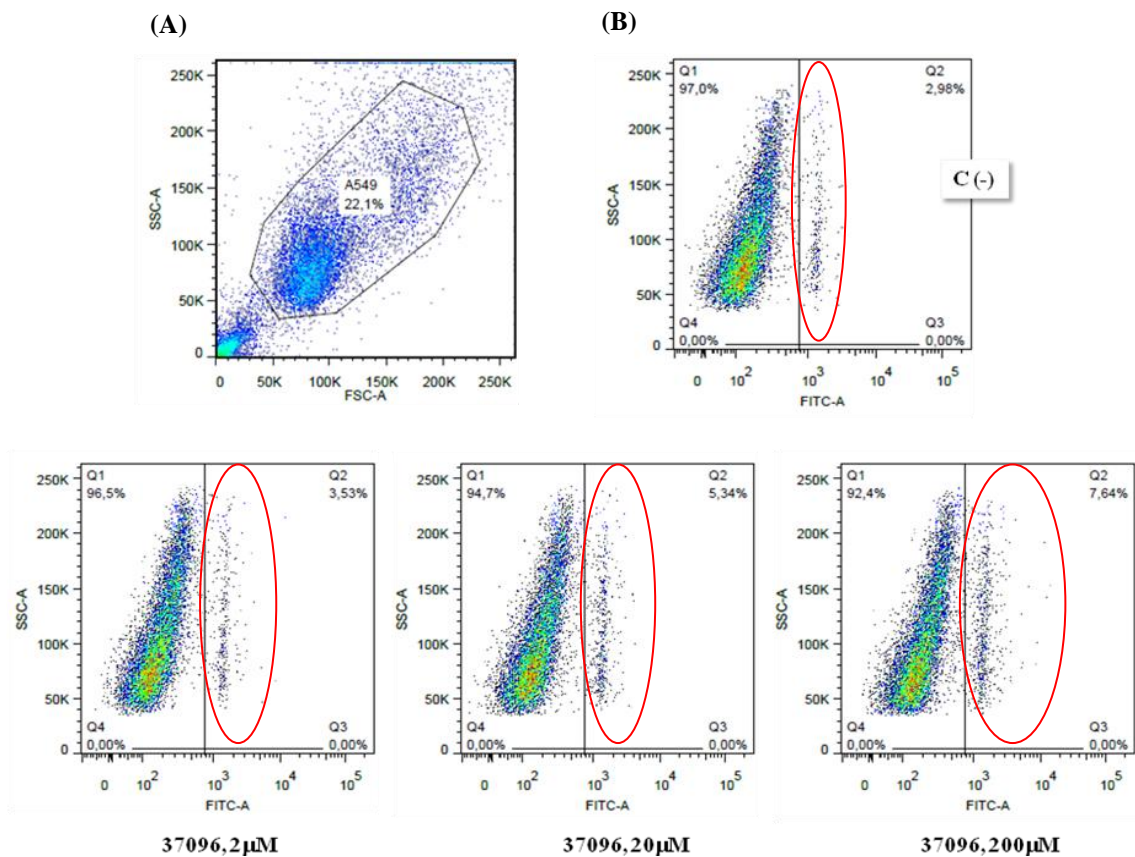


Figura 13. Internalización de microesferas acopladas al péptido 37096 por células A549. Las gráficas obtenidas por citometría de flujo permiten cuantificar el número de microesferas que se internalizan en las células blanco y el efecto que tiene el péptido acoplado a diferentes concentraciones sobre la internalización de microesferas fluorescentes. En el panel superior (A) se observa la selección de la ventana que muestra las células A549 por características de tamaño y complejidad. En el panel (B) se observa a la derecha la cuantificación de las microesferas fluorescentes sin péptido acoplado. En los paneles inferiores se observa la entrada de las microesferas que están acopladas al péptido 37096 de Rv1411c a diferentes concentraciones.

Como se observa en la figura 14, se ensayaron 16 péptidos correspondientes a los HABPs que se unen a células A549. El máximo de internalización (~12%) se encontró para el HAPB 37766 de la proteína Rv1911c, además los HABPs 37088, 37096 y 37098 (Rv1411c), 37763 y 37767 (Rv1911c) promovieron de manera significativa la entrada de microesferas cuando éstas se acoplan a dichos péptidos, a la concentración más alta empleada (200 μ M). No todos los HABPs presentan la característica de promover la entrada de las microesferas en las células epiteliales, es decir que la forma en que interactúan los HABPs con los receptores de estas células no es el mismo en todos los casos y sólo algunos activan el proceso de endocitosis.

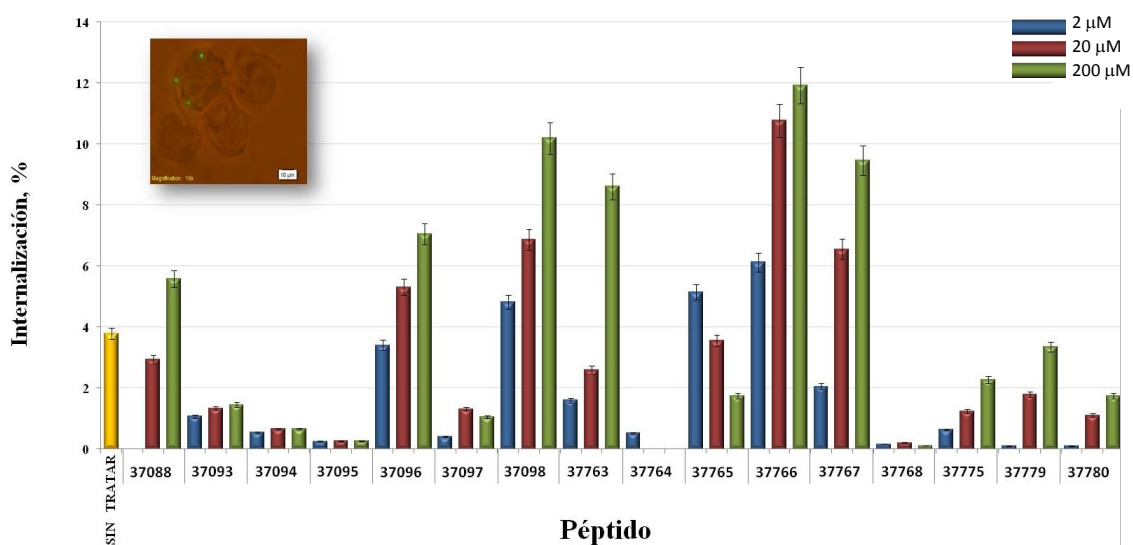


Figura 14. Porcentaje de internalización de microesferas acopladas a péptido en células A549. Cada barra representa la diferencia entre el porcentaje de microesferas acopladas a péptido internalizadas en células A549 y el control. El control se refiere al porcentaje de microesferas internalizadas cuando las células A549 se incubaron primero con cada uno de los péptidos y luego se incubaron con microesferas sin péptido acoplado. En la barra amarilla se muestra la internalización de microesferas sin péptido acoplado, las cuales se usaron como control negativo. En el inserto se encuentra la foto de la microscopía de fluorescencia donde microesferas acopladas a péptido son internalizadas en células A549.

7.7. Elementos de estructura secundaria de los péptidos derivados de las lipoproteínas seleccionadas

Teniendo en cuenta que es posible establecer relaciones la estructura de un péptido y su función como ligando, se determinaron los elementos de estructura secundaria empleando los análisis por Dicroísmo Circular para cada uno de los péptidos que conforman las 4 lipoproteínas en presencia TFE al 30%. Los espectros en la figura 15 muestran en su mayoría elementos estructurales α -helicales que se caracterizan por la presencia de un máximo entre 191 y 193 nm y dos mínimos, uno entre 220 y 222 nm y otro entre 207 y 209 nm correspondientes a transiciones $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ paralela y $\pi \rightarrow \pi^*$ perpendicular. De acuerdo con la intensidad de estas bandas es posible determinar la proporción de elipticidad molar de los péptidos.

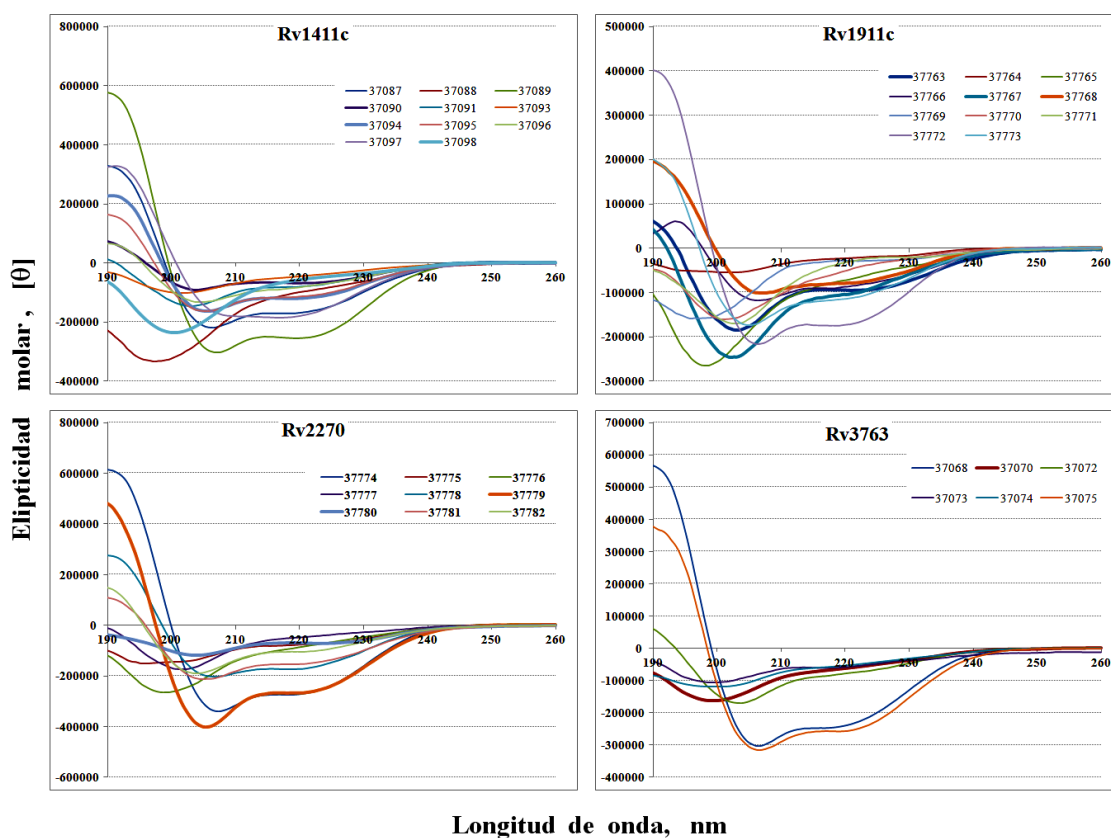


Figura 15. Estructura secundaria de los péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763. De acuerdo con el patrón del espectro para cada uno de los péptidos, la presencia de mínimos y máximos característicos y los resultados de deconvolución se establecen los elementos de estructura secundaria presentes en cada una de las secuencias peptídicas. Los resultados se expresan en términos de la elipticidad residual molar $[\Theta]$, cuyas unidades son grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}$, de acuerdo con $[\Theta] = \Theta \lambda / (100lc)$.

Se observa que péptidos como el 37098 de la proteína Rv1411c, los péptidos 37764, 37765 y 37771 de la proteína Rv1911c, los péptidos 37775 y 37777 de la proteína Rv2270 y el péptido 37073 de la proteína Rv3763 presentan elementos de estructura desordenada o “random coil”, sus espectros se caracterizan por un mínimo intenso alrededor de los 200 nm y otro mínimo menos pronunciado sobre los 220nm a 230 nm. Dentro de los péptidos con ésta característica random se encuentran dos (37771 y 37073) con baja capacidad de unión específica a células blanco.

Estos resultados se analizaron empleando los programas de deconvolución SELCON, CONTINLL y CDSSTR (118, 119). Se encontró que los péptidos con mayor proporción de estructura α helical a lo largo de su secuencia son 37089, 37097, 37767, 37768, 37778 y 37068; de éstos, 37089 (Rv1411c), 37778 (Rv2270) y 37068 (Rv 3763) corresponden a péptidos con baja capacidad de unión específica a las células blanco mientras que los restantes son definidos como HABPs para una o las dos líneas celulares usadas. Con respecto a los HABPs con elementos helicoidales, inhiben la entrada de la micobacteria *in vitro*. No se presentaron elementos estructurales de lámina β ni de giros β .

7.8. Proliferación celular por péptidos de las diferentes lipoproteínas.

PBMCs obtenidas de ratones BALB/c que previamente habían sido inmunizados con sonicado total de micobacterias (*M. tuberculosis* H37Rv y *M.bovis* BCG) o con Adyuvante incompleto de Freund o con solución salina fueron estimulados con sonicado total de las mismas micobacterias, con mezclas de los péptidos de cada una de las lipoproteínas de interés y con Concanavalina A (control positivo de estimulación). Como se observa en la figura 16, los linfocitos provenientes de las PBMCs de los ratones previamente inmunizados con *Mtb* presentan un bajo índice de estimulación celular con los antígenos probados (sonicados de micobacterias y mezclas de péptidos), excepto con los péptidos de la lipoproteína Rv1411c y aún en presencia de un mitógeno como la Concanavalina A. Se observaron altos índices de estimulación para los ratones inmunizados con AIF y *M. bovis* BCG al enfrentarse a las mezclas de los péptidos de las lipoproteínas Rv1411c y Rv3763.

Las mezclas de péptidos de las lipoproteínas Rv1911c y Rv2270 no estimulan la linfoproliferación celular *in vitro* en ninguno de los animales.

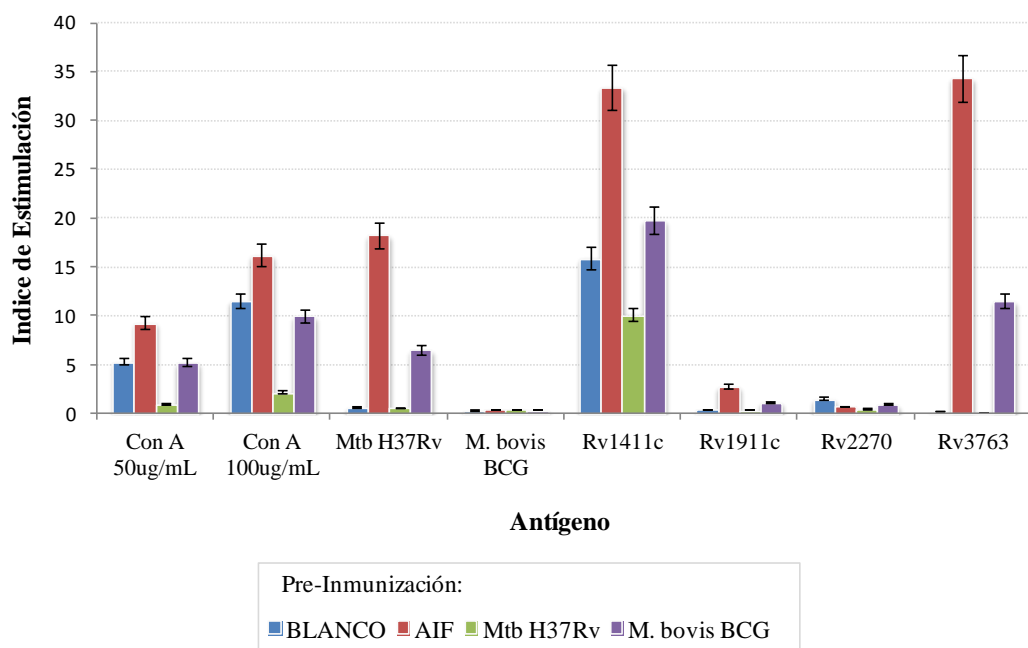


Figura 16. Efecto de los péptidos de las lipoproteínas sobre la linfoproliferación de las PBMCs de ratones BALBc. Los grupos de 4 ratones fueron pre-inmunizados con sonicado de *Mtb* H37Rv y sonicado de *M. bovis* BCG, los controles fueron ratones no-inmunizados y ratones pre-inmunizados con AIF (usado como adyuvante para la inmunización de los sonicados micobacterianos). Se determinó la linfoproliferación de PBMCs provenientes de cada uno de estos ratones pre-inmunizados frente a diferentes antígenos: ConA (50 y 100 µg/mL), sonicados de *Mtb* H37Rv y *M. bovis* BCG y las mezclas de los péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763.

Los sobrenadantes obtenidos del ensayo de linfoproliferación, luego de la estimulación de las PBMCs, se emplearon para determinar las citocinas secretadas. La tabla 5 muestra los resultados obtenidos, la producción de citocinas basal corresponde a células sin estimular; si se compara este valor basal con los obtenidos por estimulación con los diferentes antígenos se observa que la inmunización con sonicado de *Mtb* H37Rv produce que las células incrementen la producción de TNF alrededor de 10 veces más que las células de animales no inmunizados, de igual forma la producción de ésta citocina se ve favorecida cuando las células (de animales pre-inmunizados con *Mtb*) se estimulan con los péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv2270 y Rv3763.

Las células de animales que han sido pre-inmunizados con sonicado de *M. bovis* BCG producen altas concentraciones de TNF cuando son estimuladas con los péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv2270 y Rv3763 así como cuando se estimularon con los sonicados de *Mtb* y *M. bovis* BCG. Es decir que en los animales que han tenido previo contacto con *M. bovis* BCG, las mezclas de péptidos y los sonicados micobacterianos originaron una respuesta proinflamatoria promovida por TNF.

Tabla 5. Producción de Citocinas secretadas por PBMCs murinos estimulados con péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv 3763

Pre-Immunización	Antígeno	IL-4 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	INF-g (pg/mL)	TNF (pg/mL)
Blanco (No - inmunizado)	Sin Estímulo	2,28 ± 0,11	0,00 ± 0,00	1,47 ± 0,07	12,75 ± 0,64
	Con A (100 mg/mL)	1,91 ± 0,10	1,94 ± 0,10	1,68 ± 0,08	9,24 ± 0,46
	Mtb H37Rv	2,44 ± 0,12	2,00 ± 0,10	1,53 ± 0,08	39,81 ± 1,99
	<i>M. bovis</i> BCG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Rv1411	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,66 ± 0,33
	Rv1911	0,00 ± 0,00	1,79 ± 0,09	0,00 ± 0,00	3,11 ± 0,16
	Rv2270	3,55 ± 0,18	2,30 ± 0,12	1,50 ± 0,08	27,89 ± 1,39
	Rv3763	0,00 ± 0,00	2,04 ± 0,10	0,00 ± 0,00	7,83 ± 0,39
AIF (adyuvante incompleto de Freund)	Sin Estímulo	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Con A (100 mg/mL)	2,28 ± 0,11	2,21 ± 0,11	2,50 ± 0,13	12,98 ± 0,65
	Mtb H37Rv	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,26 ± 0,31
	<i>M. bovis</i> BCG	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	7,74 ± 0,39
	Rv1411	2,00 ± 0,10	1,50 ± 0,08	0,00 ± 0,00	6,26 ± 0,31
	Rv1911	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Rv2270	2,35 ± 0,12	2,29 ± 0,11	1,50 ± 0,08	7,49 ± 0,37
	Rv3763	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	Sin Estímulo	1,67 ± 0,08	1,62 ± 0,08	3,75 ± 0,19	180,24 ± 9,01
	Con A (100 mg/mL)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,38 ± 0,07	160,95 ± 8,05
	Mtb H37Rv	2,77 ± 0,14	3,24 ± 0,16	88,57 ± 4,43	5759,16 ± 287,96
	<i>M. bovis</i> BCG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Rv1411	n.d.	2,19 ± 0,11	0,00 ± 0,00	3484,82 ± 174,24
	Rv1911	2,53 ± 0,13	2,68 ± 0,13	1,80 ± 0,09	265,85 ± 13,29
	Rv2270	2,15 ± 0,11	2,19 ± 0,11	1,75 ± 0,09	6655,64 ± 332,78
	Rv3763	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6659,94 ± 333,00
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	Sin Estímulo	3,08 ± 0,15	2,46 ± 0,12	1,68 ± 0,08	22,47 ± 1,12
	Con A (100 mg/mL)	3,96 ± 0,20	2,21 ± 0,11	1,82 ± 0,09	155,80 ± 7,79
	Mtb H37Rv	3,80 ± 0,19	1,96 ± 0,10	2,11 ± 0,11	2020,11 ± 101,01
	<i>M. bovis</i> BCG	3,38 ± 0,17	2,11 ± 0,11	2,38 ± 0,12	1452,90 ± 72,65
	Rv1411	2,44 ± 0,12	2,37 ± 0,12	1,45 ± 0,07	341,08 ± 17,05
	Rv1911	2,25 ± 0,11	2,34 ± 0,12	1,59 ± 0,08	56,42 ± 2,82
	Rv2270	2,67 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1941,33 ± 97,07
	Rv3763	2,98 ± 0,15	2,67 ± 0,13	0,00 ± 0,00	2076,84 ± 103,84

Para el caso de las células provenientes de los animales control (no-inmunizados o pre-inmunizados con AIF) se observó que hay una alta producción de IL-5 cuando se estimulan con las mezclas de los péptidos derivados de las 4 lipoproteínas estudiadas; adicionalmente los péptidos de la lipoproteína Rv2270 favoreció la producción de IL-4, citocina de perfil Th2 que ha sido considerada en el desarrollo de alternativas contra la tuberculosis (120).

Solo se produjeron altos niveles de INF- γ en células de animales pre-inmunizados con *Mtb* H37Rv y estimuladas con este mismo antígeno, lo cual se correlaciona con los altos niveles de esta citocina encontrados en células T previamente sensibilizadas con *Mtb* cuando se estimulan con antígenos específicos provenientes de sobrenadante de cultivo como ESAT-6 o CFP-10 (121). Además INF- γ se ha descrito como un componente importante en la protección a la infección por *Mtb* (122).

7.9. Inhibición del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* H37Rv.

En el ensayo de co-cultivo se determinó la cantidad de *Mtb* H37Rv que creció de manera intracelular en macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c no inmunizados luego de 3 días después de la infección, en ausencia de esplenocitos o en presencia de esplenocitos derivados de ratones BALB/c inmunizados con AIF o inmunizados con los pools de péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763. Se encontró que cuando se colocan esplenocitos obtenidos de animales inmunizados con mezclas de péptidos de las lipoproteínas Rv1411c y Rv2270 (figura 17) disminuye el crecimiento intracelular de la micobacteria de manera significativa entre 35 y 60%, respectivamente.

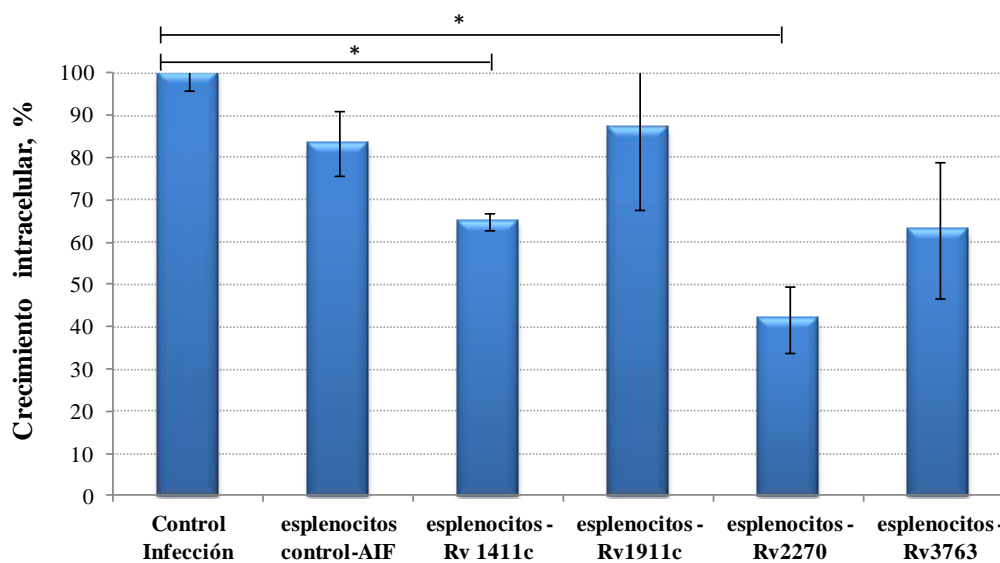


Figura 17. Infección de macrófagos murinos en presencia de esplenocitos de ratones inmunizados. Las barras representan el crecimiento de *Mtb* H37Rv marcada (SYBR® Safe) en el interior de macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c, en ausencia de esplenocitos (Control de infección del 100%) y en presencia de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con AIF (control) y con los pools de péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763. MOI 1:5

8. Discusión de resultados

La TB sigue siendo una de las principales amenazas para la salud pública mundial si se tienen en cuenta los datos epidemiológicos reportados anualmente por la OMS (1), un problema que se ve acentuado por la coinfección con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y la emergencia de cepas de TB multirresistentes a medicamentos (MDR y XDR). Se esperaba que con la publicación del genoma de *Mtb* H37Rv, hace más de 15 años (16), se avanzara rápidamente en el desarrollo de diferentes métodos de diagnóstico, profilácticos y de tratamiento para esta enfermedad. Si bien es cierto que se han alcanzado avances importantes en el conocimiento de la fisiología de este patógeno, muchas de las 3924 proteínas que pueden potencialmente ser codificadas y expresadas, se desconocen todavía sus funciones, importancia o la localización en la micobacteria.

El carácter intracelular de *Mtb*, y su capacidad para desarrollar estrategias complejas para persistir dentro de los macrófagos aún cuando ellos estén completamente activados han hecho de este patógeno un reto para la investigación alrededor del mundo, es así como se considera que cerca de un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *Mtb* de manera latente.

Se ha descrito que la erradicación de la TB será posible sólo si se logra desarrollar una vacuna que proteja eficientemente contra la tuberculosis pulmonar. Es así, como se han propuesto más de 100 vacunas experimentales contra la TB, empleando distintas estrategias para tratar de inducir inmunidad protectora, las dos principales están dirigidas: en el primer caso a reemplazar la actual vacuna BCG con una vacuna de un microorganismo organismo completo, ya sea la BCG recombinante o *Mtb* atenuada o en el segundo caso a desarrollar una vacuna de subunidades que mejore la protección que actualmente confiere BCG. Se afirma que la variedad de posibilidades que se han propuesto para el desarrollo de vacunas contra tuberculosis es el reflejo de la falta de conocimiento que aún se tiene sobre *Mtb* y de su interacción con el sistema inmune humano, lo cual se hizo evidente con el candidato a

vacuna más reciente, MVA85A (6) (vacuna modificada del virus Vaccinia Ankara que expresa el antígeno 85A) donde los resultados obtenidos en la fase IIB de ensayo clínico permiten describirlo como modestamente inmunogénico, generando una moderada respuesta de células CD4+ Th1 y Th17 antígeno-específica lo que predecía un carácter protector, mostraba promisorios resultados en modelos animales y en la producción de biomarcadores tempranos de protección, pero que finalmente mostró poca evidencia de protección contra la infección o el desarrollo de la enfermedad (123).

8.1. Selección de lipoproteínas de *M. tuberculosis* H37Rv.

Uno de los pasos importantes que deben considerarse en el desarrollo de métodos para la prevención de la infección por *Mtb* es la selección de los antígenos. Tradicionalmente se han tenido en cuenta aquellos antígenos que estimulen la proliferación de células Th1, especialmente células de memoria central que puedan producir varias citocinas como IFN- γ , TNF e IL-2; de células T CD8 que ataquen directamente células infectadas con *Mtb* mediante perforina y granulicina y de células Th17 que soporten la respuesta Th1. Es así como muchas proteínas secretadas (ESAT-6, antígeno 85), proteínas de choque térmico (Hsp) y antígenos de latencia han sido consideradas como candidatos para el desarrollo de vacunas (124).

Este proyecto se basó en una alternativa novedosa que permite reconocer secuencias derivadas de proteínas de *Mtb* involucradas en las interacciones hospedero-patógeno, que inhiben la entrada de este patógeno a las células blanco de infección. Las proteínas seleccionadas son aquellas que, ya sea por su localización subcelular (125), o por los resultados de análisis bioinformáticos (91), potencialmente usa la micobacteria para establecer el contacto inicial en el proceso de infección de dichas células. El objetivo global es bloquear por completo las rutas de entrada de la micobacteria a las diferentes células blanco de infección mediante el empleo de péptidos sintéticos como inmunógenos reemplazando con esto el uso de las vacunas convencionales que emplean microorganismos muertos o atenuados. Esta metodología ha sido la base del diseño racional de una vacuna sintética, subunitaria, multiantigénica y multiestadio contra la malaria por *Plasmodium*

falciparum (88) y se propone que pueda también puede aplicarse a la prevención de otras enfermedades infecciosas como la tuberculosis.

Tomando como base la información del genoma de *Mtb* H37Rv para la selección de las proteínas que puedan cumplir un papel relevante en la interacción hospedero –patógeno, se utilizaron diferentes herramientas bioinformáticas para analizar las secuencias de las 3924 posibles proteínas codificadas. La primera característica analizada es la vía de secreción, determinar si se trata de una proteína secretada por vía clásica con presencia de una secuencia señal o por vía no-clásica (sin secuencia señal); ya se ha descrito que las proteínas tienen señales intrínsecas que gobiernan su transporte y localización en la célula y la importancia de motivos peptídicos definidos para conducir a las proteínas a su sitio de función (126). Se empleó el programa SignalP 3.0 siendo éste uno de los mejores y más citados métodos para la predicción de péptidos señal clásicos, el cual también predice el sitio real de corte de la pre-proteína y así el péptido que se escinde durante la translocación sobre la membrana (92). Teniendo en cuenta que los microorganismos emplean diferentes formas de direccionamiento de proteínas al ambiente extracelular y a las diferentes localizaciones subcelulares y que la mayoría de las proteínas dirigidas hacia el espacio extracelular o hacia localizaciones subcelulares poseen motivos de secuencias específicas que caracterizan el tipo de secreción o direccionamiento que experimentan se hizo necesaria la aplicación de herramientas bioinformáticas validadas para el estudio de proteínas de *Mtb*. Es así como se emplearon los programas de búsqueda de secuencias señal para las vías Sec, Tat y Lipobox.

Si se considera el carácter altamente hidrofóbico que posee la envoltura de *Mtb*, podría esperarse que proteínas que tengan una secuencia señal con el motivo “lipobox” estén ancladas a la cara externa de la membrana plasmática como en otras bacterias Gram positivas (28) o a la superficie celular (espacio pseudo periplásmico, similar al de bacterias Gram negativas) y participen en la interacción micobacteria – célula blanco. La predicción de estas lipoproteínas se llevó a cabo con el servidor LipoP 1.0 que ha sido validado para su uso tanto en bacterias Gram negativas (usadas como conjunto de entrenamiento), como Gram positivas (90). Se encontraron así 69 proteínas que presentan la secuencia [LVI][ASTVI][GAS][C], caracterizada por tener un residuo de cisteína que es el que sufre la modificación lipídica y en la posición -3 (con respecto a la C) un residuo leucina, además se presentan una región N-terminal de 5 a 7 residuos de los cuales 2 son cargados

positivamente y una región central de 7 a 22 residuos hidrofóbica o con aminoácidos no cargados.

Al aplicar la combinación de las herramientas bioinformáticas para la predicción de localización subcelular se redujo el grupo de proteínas a 41 predichas en membrana plasmática (PA-SUB v.2.5). Finalmente, teniendo en cuenta las características anotadas en el genoma, se excluyeron aquellas lipoproteínas con actividad enzimática y las que actúan como transportadoras o como proteínas de unión a solutos. Con la idea de realizar un trabajo posterior de dilucidación de la estructura tridimensional de las lipoproteínas, el peso molecular fue también criterio de selección de las proteínas a estudiar ($PM \leq 20$ kDa). Dentro de las lipoproteínas que cumplieron con los criterios de inclusión se encuentran Rv3763 (LpqH o 19kDa) y Rv1411c (LprG o P27) las cuales ya han sido reportadas en estudios de proteómica y para las cuales se reconocen propiedades inmunogénicas y por lo tanto se usaron como control en el desarrollo de este trabajo. Además, con este proceso de selección se propuso el estudio de 2 lipoproteínas para las cuales no existía hasta ahora algún reporte: Rv1911c (LppC) y Rv2270 (LppN).

8.2. Localización de lipoproteínas de *M. tuberculosis* H37Rv.

Experimentalmente se demostró que los genes que codifican para las proteínas seleccionadas están presentes en micobacterias que pertenecen al Complejo *Mtb* (MTC) (*Mtb* H37Rv, *Mtb* H37Ra, *M. bovis* y *M. bovis* BCG) que causan TB en humanos y animales. Además puede relacionarse la presencia de los genes con la patogenicidad de estas cepas si se tiene en cuenta que en el alineamiento de las secuencias, provenientes de bases de datos, muestra que son proteínas conservadas presentes también en genomas de aislados clínicos de *Mtb*. En la metodología propuesta se debe corroborar la presencia de cada proteína en la cepa de referencia de laboratorio *Mtb* H37Rv, ya que esta es la micobacteria que se emplea a lo largo de los diferentes ensayos planteados, para lo cual el empleo de anticuerpos policlonales obtenidos por inoculación de péptidos poliméricos derivados de las lipoproteínas seleccionadas es una alternativa viable. Aunque se observan variaciones entre los pesos moleculares teóricos calculados para las proteínas seleccionadas y los pesos moleculares de las bandas reconocidas por Western blot, se debe tener en cuenta que: las secuencias seleccionadas para inmunizar no presentan identidad con ninguna secuencia de otra proteína de alguna cepa de *Mycobacterium*, descartando la posibilidad de reacción cruzada con otras

proteínas de *Mtb* H37Rv, y que la migración de proteínas en geles de poliacrilamida se afecta por factores como las modificaciones postraduccionales de las proteínas o el contenido de aminoácidos cargados (127). Se había reportado la presencia de las lipoproteínas Rv1411c y Rv3763 en la pared celular de *Mtb* evidenciada en electroforesis bidimensional (116), los resultados que se presentan en este trabajo mostraron su presencia también en la fracción de membrana plasmática. Lo anterior corrobora que estas lipoproteínas están presentes en la envoltura de la micobacteria y muestra que debido a la complejidad estructural de esta envoltura es posible que no haya una separación eficiente de las diferentes fracciones subcelulares. Las lipoproteínas Rv1911c y Rv2270 son detectadas con una intensidad muy baja en fracciones de pared y membrana celulares, posiblemente se encuentren en muy baja proporción de tal manera que no fue posible aislar las proteínas para confirmar su identidad por secuenciación. Sin embargo por microscopia inmunelectrónica se confirmó la presencia de las lipoproteínas en la superficie de la micobacteria y aunque no es posible diferenciar su localización entre pared o membrana de la envoltura, es claro que ésta es una localización ideal para la interacción con células blanco de infección.

8.3. Secuencias de unión específica de lipoproteínas de *M. tuberculosis* H37Rv con actividad inhibitoria.

Las ventajas que ofrecen los péptidos sintéticos en cuanto a estabilidad, versatilidad, disponibilidad y pureza los hacen apropiados para identificar las secuencias de proteínas que interactúan específicamente con células blanco de infección. Mediante la aplicación de ensayos del tipo receptor – ligando, para cada una de los péptidos que comprenden las secuencias completas de las cuatro lipoproteínas de este trabajo, se identificaron 11 péptidos con alta capacidad de unión específica (HABPs) a macrófagos derivados de monocitos U937 y 16 HABPs a células epiteliales alveolares A549; dentro de éstos se encuentran 7 péptidos que se unen con alta capacidad a las dos líneas celulares. Podría pensarse en moléculas receptoras comunes en las dos líneas celulares que permitan la unión de estos 7 HABPs, futuros estudios de entrecruzamiento con péptido radiomarcado y de proteómica permitirán establecer la identidad de dichos receptores. El presente trabajo muestra que la secuencia comprendida entre los aminoácidos 41 y 60 de la proteína Rv3763 se une específicamente a una la línea monocítica U937, pero que no hay HABPs para la línea epitelial alveolar A549. Esta proteína se había descrito como adhesina que se une a monocitos THP-1 vía receptor de

manosa promoviendo la fagocitosis de la micobacteria (113), sugiriendo que hay una interacción específica de esta proteína con receptores de macrófagos pero no con células epiteliales; posteriores ensayos permitirán caracterizar dichos receptores y determinar si están presentes en cultivos primarios de macrófagos humanos normales.

La interacción de algunos HABPs con sus receptores en la célula presentan constantes de disociación (K_D) del orden 1 a $3 \times 10^{-6}M$, siendo comparables con los reportados para interacciones específicas antígeno - anticuerpo (débil) o enzima-sustrato ($10^{-4} - 10^{-10}M$). Los resultados de los ensayos de saturación confirman la especificidad de la interacción HBP-célula blanco.

Los resultados del ensayo de inhibición mostraron el rol que estas secuencias, denominadas HABPs, tienen en el bloqueo de la entrada de *Mtb* H37Rv *in vitro*. Los HABPs 37094, 37767, 37768, 37779 y 37780 son de especial interés ya que inhiben la entrada de la micobacteria de forma dosis dependiente, alcanzando valores de inhibición superiores al 50% en la mayor concentración empleada de cada péptido (200 μM) tanto en células U937 como en células A549. Si se considera la complejidad de la interacción patógeno-hospedero para *Mtb*, es significativo el hecho de que un péptido de 20 aminoácidos pueda inhibir la entrada de la micobacteria por el bloqueo de interacciones específicas, lo cual los hace interesantes desde el punto de vista preventivo y terapéutico. Se encontró además que algunos HABPs promueven la entrada de microesferas a las células A549, lo que refuerza la idea de que estas secuencias derivadas de lipoproteínas micobacterianas participan activamente en la interacción con receptores específicos sobre la membrana de células epiteliales alveolares y que su unión con el sitio receptor en dichas células bloquea, en parte, la entrada de la *Mtb* H37Rv. Los ensayos de inhibición de la entrada de *Mtb* a la células blanco en presencia de HABPs no indican que sean estas mismas secuencias las que generen una respuesta inmune protectora contra este patógeno.

Se ha descrito como la apropiada interacción entre secuencias peptídicas con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y con las moléculas del receptor de células T es clave en la generación de una respuesta inmune preventiva contra diferentes enfermedades dentro de las cuales se encuentra tuberculosis (128). Dicha interacción está condicionada fuertemente por la estructura tridimensional que adopta el péptido y que le permite el ajuste

dentro de la molécula del CMH y a la vez el contacto con el receptor de células T, al cual se presenta; es por esto se da importancia a conocer la estructura que presentan los péptidos sintéticos de las proteínas estudiadas con el objeto de explicar o modificar sus características inmunogénicas pensando en su aplicación en profilaxis o terapia contra tuberculosis. Para las lipoproteínas estudiadas en este trabajo no se establece una relación entre la actividad de unión o de inhibición de los HABPs y los elementos de estructura secundaria que éstos poseen; sin embargo, la experiencia reportada en el modelo de malaria muestra que los HABPs no son inmunogénicos pero que es posible hacer que un péptido incremente su capacidad inmunogénica o que se ajuste apropiadamente en el surco de unión antígeno-CMH modificando las interacciones que se establecen con las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados para inducir la activación de inmunidad protectora. Se describe que debe modificarse la polaridad de los residuos críticos involucrados en la unión de los HABPs haciendo sustituciones selectivas de manera que residuos Phe deben reemplazarse por Arg y viceversa, Trp ↔ Tyr, Leu ↔ His, Ile ↔ Asn, Pro ↔ Asp, Met ↔ Lys, Cys ↔ Thr o Val, Gln ↔ Glu y Ala ↔ Ser para conseguir HABP modificados que induzcan inmunidad protectora contra la enfermedad (89). Estudios posteriores permitirán establecer si estos conceptos se aplican en el caso de los HABPs encontrados para las proteínas de *Mtb* estudiadas.

8.4. Respuesta inmune generada por péptidos de lipoproteínas de *M. tuberculosis* H37Rv.

Como una primera aproximación para analizar la respuesta inmune celular generada por la mezcla de los péptidos que conforman las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763 se escogió el modelo murino. Se hicieron inmunizaciones previas con sonicado total de *Mtb* y *Mycobacterium bovis* BCG para determinar si el contacto previo con micobacterias influía en la proliferación de linfocitos estimulada por mezclas de péptidos y sobre la producción de citocinas. Los resultados de índice de estimulación mostraron que los PBMCs de ratones previamente inmunizados con sonicado total de *Mtb*, tienen disminuida su capacidad de linfoproliferación ante cualquiera de los antígenos con que se estimularon, si se comparan con las PBMCs de animales que no han sido inmunizados. Así podría sugerirse

que el sonicado de *Mtb* actúa como un supresor de la respuesta en el modelo murino empleado.

No se encontró capacidad antigénica en el sonicado de *M. bovis* BCG, ni siquiera en animales previamente inmunizados con esta misma micobacteria. Finalmente, las mezclas de los péptidos derivados de las lipoproteínas Rv1411c y Rv3763 son capaces de estimular la linfoproliferación de células de animales control (no inmunizados) y de los que fueron previamente inmunizados con *M. bovis*. Los péptidos de la proteína Rv1911c mostraron una modesta capacidad para estimular linfocitos de animales control. Se encontró que la estimulación con los péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv2270 y Rv3763 favorecen la producción de TNF especialmente en animales pre inmunizados con sonicado de micobacterias (*Mtb* H37Rv y *M. bovis* BCG), lo cual es importante si se tiene en cuenta que esta citocina es relevante en la protección contra tuberculosis en el modelo murino (129).

Se encontró secreción de citocinas del perfil Th2 (IL-4 e IL-5) cuando las células de animales no inmunizados previamente se estimulan con las mezclas de los péptidos de Rv1911c, Rv2270 y Rv3763 y aunque la producción de estas citocinas no se ha considerado relevante en la protección contra tuberculosis, no se puede descartar la influencia que éstas ejercen en la respuesta inmune protectora contra la enfermedad ni la importancia de antígenos que promuevan su producción. No se encontró alguna producción significativa de INF- γ en ninguna de las condiciones experimentales usadas.

Se ha descrito que es de gran importancia para el desarrollo de una vacuna contra tuberculosis la respuesta inmune celular del tipo Th1, siendo el IFN- γ la principal citocina activadora de macrófagos junto con el TNF- α , estimulando la producción de la oxido nítrico sintetasa inducible (NOS-2), responsable de los altos niveles de oxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno que poseen funciones bactericidas frente a *Mtb* (130). Además, *Mtb* induce la expresión de TNF- α en los macrófagos, así como la expresión de quimiocinas (131), que atraen a las células al sitio de infección y son importantes en la formación y mantenimiento del granuloma.

Existe como paradigma que la respuesta inmune dirigida contra microorganismos extracelulares debe ser mediada por anticuerpos, mientras que una respuesta contra microorganismos intracelulares es de tipo celular. Sin embargo no es claro si, *in vivo*, una respuesta mediada por anticuerpos es independiente de una mediada por células (132, 133);

teniendo en cuenta la variabilidad de las interacciones de los linfocitos B con la inmunidad celular, las células B podrían tener un efecto significativo en la protección contra *Mtb*, así como en la respuesta inflamatoria final. Podría esperarse que los péptidos sintéticos derivados de proteínas de *Mtb* promuevan una respuesta inmune donde la inmunidad humoral y la celular no sean mutuamente excluyentes, basados en el hecho de que las células Th son muy importantes para el desarrollo y especialización de células B.

Se ha reportado en otros sistemas que los HABPs conservados no son antigénicos, ya que no producen ninguna respuesta inmune durante la infección natural, no son inmunogénicos y tampoco inducen inmunidad protectora. A este efecto se le ha llamado “silencio inmunológico” que es posible suprimir con las modificaciones mencionadas anteriormente cuando se mencionó la importancia de la elucidación de la estructura de los péptidos sintéticos.

Para las lipoproteínas Rv1411c y Rv3763 se ha descrito su participación en la regulación de la inmunidad adaptativa induciendo la secreción de citocinas y moléculas coestimuladoras en células del sistema inmune innato así como a través de la regulación directa de linfocitos T de memoria (115). Empleando péptidos sintéticos de la proteína Rv3763 se identificaron epitopes T en su extremo N-terminal con producción de INF- γ (114). Nuestro trabajo con la mezcla de los péptidos que conforman esta proteína presentó altos índices de estimulación en células de animales control y pre inmunizados con *M. bovis* BCG al parecer relacionada con la secreción de TNF.

Como ya ha sido mencionado, aunque se requiere de la respuesta inmune celular para el control de la infección por *Mtb*, se necesita de una interacción compleja entre múltiples células del sistema inmune para prevenir la enfermedad (134). Teniendo en cuenta que el curso de la infección está determinado por la capacidad del hospedero para inhibir el crecimiento de la micobacteria en el macrófago, como célula blanco de infección, se aplicó un ensayo de inhibición del crecimiento, *in vitro*, que permitió determinar la capacidad de esplenocitos murinos inmunizados para controlar el crecimiento de *Mtb* dentro de los macrófagos (112, 135). Se pudo establecer que esplenocitos obtenidos de ratones inoculados con las mezclas de los péptidos de las lipoproteínas Rv2270, presentaron capacidad de inhibir en un 60% el crecimiento de *Mtb* en macrófagos, con respecto al control de infección. Así mismo esplenocitos de animales inmunizados con los péptidos de las

lipoproteínas Rv1411c y Rv3763 inhiben alrededor de un 35% el crecimiento de la micobacteria dentro de los macrófagos.

No es posible establecer correlación entre la capacidad de estimulación (linfoproliferación), la producción de citocinas y la capacidad inhibitoria del crecimiento para los péptidos de las lipoproteínas estudiadas. Es posible que la producción de TNF observada en los sobrenadantes de células estimuladas con los péptidos de las lipoproteínas Rv1411c, Rv2270 y Rv3763 sea la responsable del efecto inhibitorio que se presenta en el ensayo de cocultivo; sin embargo se debe tener en cuenta que en el caso del ensayo de linfoproliferación se observa la respuesta de linfocitos efectores provenientes de PBMCs mientras que el ensayo de co-cultivo contiene diversas poblaciones de linfocitos T.

Teniendo como objetivo una aproximación funcional para la búsqueda de antígenos que podrían ser potenciales candidatos para una vacuna contra la tuberculosis bloqueando por completo la entrada de *Mtb* en las células blanco de infección, este trabajo propone una metodología para identificar secuencias peptídicas involucradas en la interacción patógeno-hospedero. Las proteínas usadas como punto de partida son aquellas usadas por la micobacteria para establecer el contacto inicial (infección) con las células hospederas de acuerdo con su localización celular, basados en los resultados de análisis bioinformáticos. La metodología empleada para la identificación de fragmentos de unión se ha aplicado en otros microorganismos y ha servido como base para el diseño racional de vacunas sintéticas, basadas en subunidades, multiantigénicas y multiestadio que tenga aplicación en la prevención de diferentes enfermedades infecciosas. La habilidad para inhibir la entrada de *Mtb* que presentan los HABPs sugiere que la unión específica de estos péptidos a receptores en la superficie de las células se debe a que bloquean rutas específicas de invasión; esta propiedad inhibitoria representa un resultado *in vitro* promisorio para continuar ahora con el estudio de propiedades inmunogénicas de las diferentes secuencias de diversas proteínas de *Mtb* H37Rv y con su evaluación futura en modelos animales adecuados.

9. Conclusiones y recomendaciones

9.1. Conclusiones

- Las herramientas bioinformáticas disponibles para el análisis de secuencias proteicas de bacterias que han sido validadas para proteínas de *Mtb* son aplicables en el estudio y la selección de proteínas potencialmente importantes en interacciones hospedero – patógeno.
- Las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763 se expresan bajo condiciones normales de cultivo de *Mtb* H37Rv y se localizan en la superficie de la micobacteria, haciendo posible su interacción con célula blanco de infección.
- Las lipoproteínas Rv1411c, Rv1911c y Rv2270 presentan secuencias con alta capacidad de unión específica (HABPs), a macrófagos derivados de monocitos U937 y a células alveolares epiteliales A549. Mientras que la lipoproteína Rv3763 presenta una secuencia con especificidad solo a macrófagos.
- HABPs 37094 (Rv1411c), 37767 y 37768 (Rv1911c), 37779 y 37780 (Rv2270) inhiben la entrada *in vitro* de *Mtb* H37Rv tanto a células U937 como a células A549. Estas secuencias y sus derivados constituyen una base para el diseño de una vacuna sintética, multiepitopica contra TB.
- La capacidad de unión específica y la actividad inhibitoria de las HABPs no está determinada por la estructura secundaria de los péptidos, pero es dependiente de la secuencia de aminoácidos.

- La mezcla de péptidos de la lipoproteína Rv1411c estimulan la linfoproliferación de células de ratones BALB/c e inducen la producción de TNF, citocina que se ha involucrado en la formación del granuloma tuberculoso.
- Se establece una metodología apropiada para la evaluación de antígenos *in vitro* potencialmente importantes en la inhibición del crecimiento intracelular de *Mtb* H37Rv.
- La mezcla de péptidos de las lipoproteínas Rv1411c y Rv2270 inhiben el crecimiento de *Mtb* H37Rv intracelular en ensayo *in vitro*, con células provenientes de ratones BALB/c, convirtiéndose así en lipoproteínas de interés en el diseño de métodos inmunoprolifáticos contra la TB.
- Los resultados de este trabajo constituyen un avance en una metodología lógica para la búsqueda de secuencias peptídicas de importancia funcional en la interacción *Mtb* – célula blanco de infección; es posible mediante el uso de herramientas bioinformáticas definir proteínas posiblemente involucradas en interacciones hospedero-patógeno. También es posible identificar HABPs para cada una de estas proteínas capaces de inhibir la entrada de la micobacteria *in vitro* y finalmente es posible usar péptidos sintéticos para determinar propiedades inmunogénicas y protectoras mediante ensayos en el modelo murino.

9.2. Recomendaciones

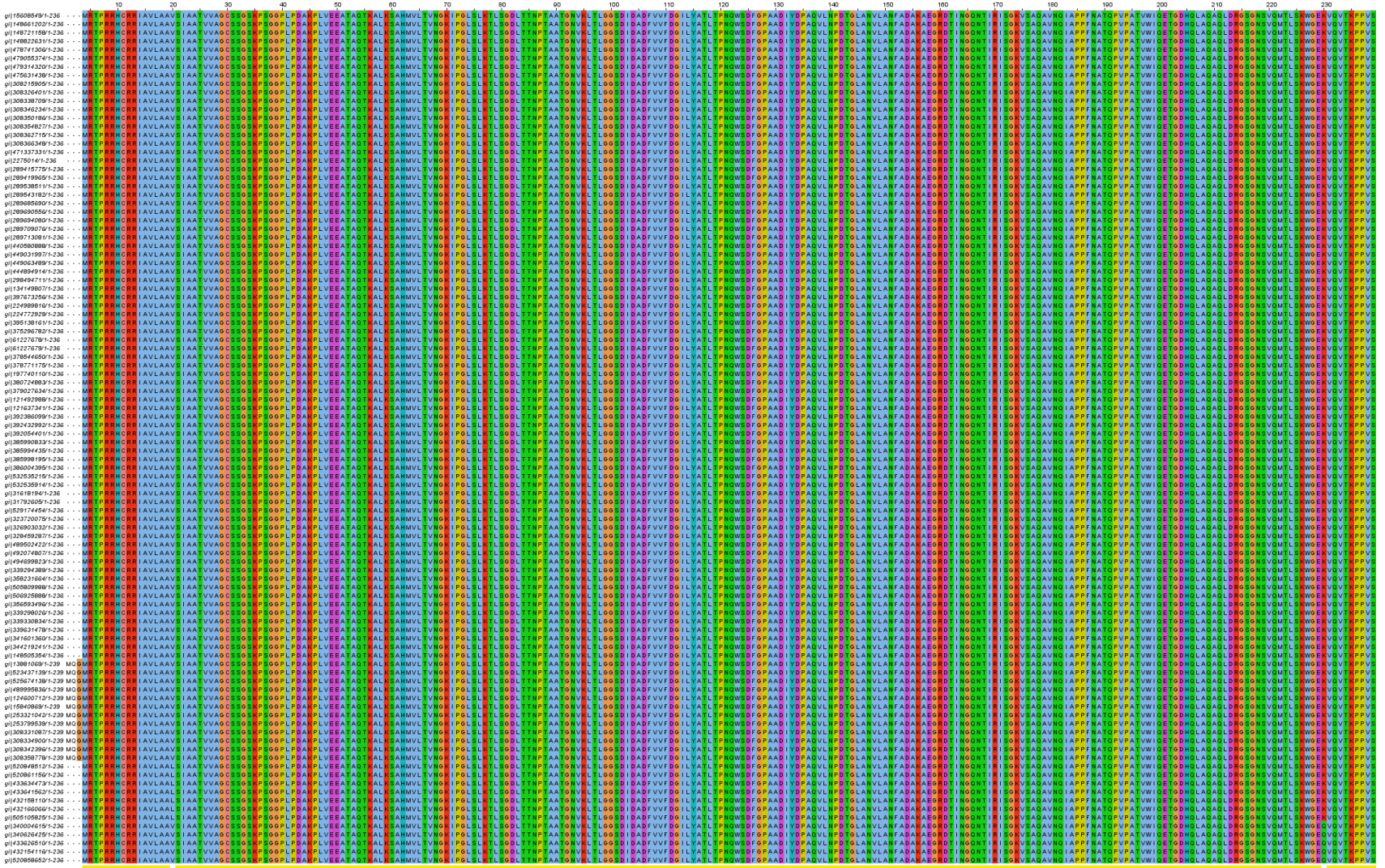
- Analizar la secreción de citocinas por estimulación con péptidos individuales (HABPs y modificados) de las lipoproteína Rv1411c, Rv1911c, Rv2270 y Rv3763 de *Mtb* H37Rv, en un modelo animal apropiado.
- Determinar los residuos críticos en la unión de los péptidos sintéticos denominados HABPs a las células blanco, como base para su modificación con el fin de mejorar sus propiedades inmunogénicas.
- Determinar el efecto que puede presentar la unión de los HABPs al interior de las células blanco.
- Caracterizar el receptor sobre las células U937 y A549 donde se unen los HABPs 37094 de Rv1411c, 37767 y 37768 de Rv1911c, 37779 y 37780 de Rv2270.
- Determinar el efecto de péptidos individuales en la inhibición del crecimiento intracelular de *Mtb* H37Rv.
- Aplicar la metodología planteada para el estudio de otras proteínas y lipoproteínas potencialmente involucradas en la interacción *Mtb* H37Rv – célula hospedera.

10. Anexos

10.1 Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias de las lipoproteínas.

(A) Rv1411c, (B) Rv1911c, (C) Rv2270 y (D) Rv3763 en diferentes cepas y aislados clínicos de *Mycobacterium*

(A)



Conservation
Quality
Consensus

MQDMSRPRRRCRI IAVLAAVSI AATVVAUGCSSGSGPGLPAKPLVEEAATGALKARHMLVTVNGIK PGLLSLTSGLDTMPTAATGKMLVLTGGSDI DADFVVFSD ILVATLTPNWSDFOPAAD IYQPAQLNPDGLANLAFADAAGEQD IINQNTIRISGVSAQAQVNI APFFNATQFPATWVIGIQEHDGHLQAQGLDRSSGQVMTLGSWKEGVQVTKPFFVS

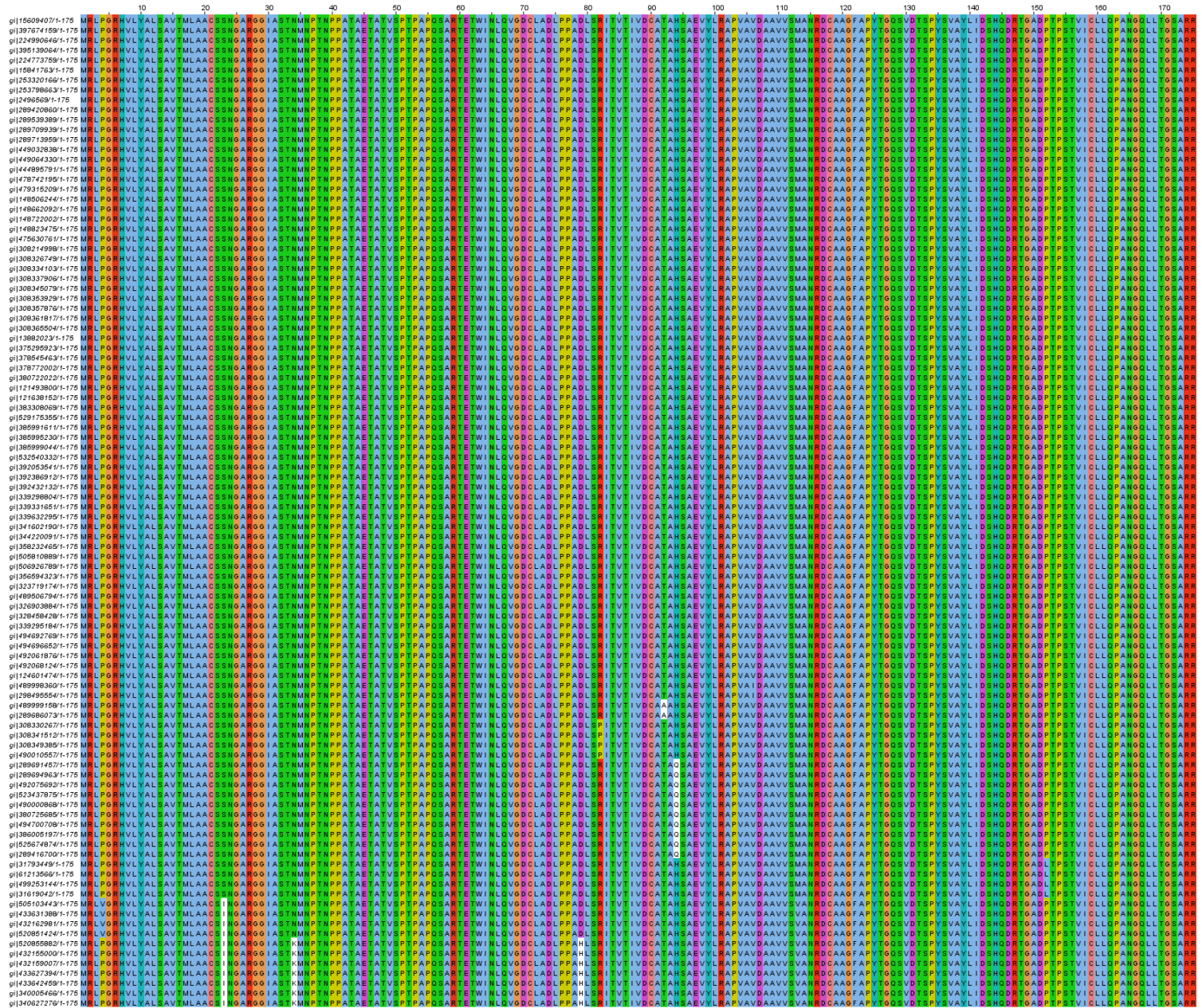
(B)

Multiple sequence alignment of 200 amino acid positions across various protein variants. The alignment shows high conservation in the N-terminal region (residues 1-100) and lower conservation in the C-terminal region (residues 100-200). The sequence is color-coded by amino acid type: A (green), C (blue), D (red), E (orange), F (purple), G (yellow), H (cyan), I (magenta), K (brown), L (grey), M (black), N (pink), P (light blue), Q (light green), R (red), S (yellow), T (grey), V (grey), W (cyan), Y (magenta).



ME S P M T S L H R T P L A T A G L A L V L V G G C G G G G D R E T P P V P N A T T V D A T P A P A A E P L I A S F M F A D G A P V P F S C K G A V A P P L T W S P A G A A E L L V D D P D A V G G L V Y H V I V T I A P G S T A D G T P A G G H S V P N S G G R G Y F G P C P F A G T G H Y R F T L Y H L V A L P F G A G V Q A A A I A G A A S Q A R L V G T F E G

(C)



(D)



Conservation

Quality

Consensus

**10.2. Artículo aceptado para publicación en la revista *Chemical
Biology & Drug Design* (Archivo pdf. adjunto)**

Specific interaction between *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein-derived peptides and target cells inhibits mycobacterial entry *in vitro*

Journal:	<i>Chemical Biology & Drug Design</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ocampo, Marisol; Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, Tuberculosis; Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Biotecnología; Universidad del Rosario, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud Curtidor, Hernando; Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, ; Universidad del Rosario, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud Vaneqas, Magnolia; Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, ; Universidad del Rosario, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud Patarroyo, Manuel; Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, ; Universidad del Rosario, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud Patarroyo, Manuel; Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, ; Universidad Nacional de Colombia,
Keywords:	Biological Screening, Drug Design, Peptide, Protein-Protein Interaction
Area/Section:	Rational design of Biologics

SCHOLARONE™
Manuscripts

10.3. Artículo de revisión publicado en la revista *Clinical Reviews in Microbiology* (Archivo pdf adjunto)

REVIEW ARTICLE

Functional, biochemical and 3D studies of *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides for an effective anti-tuberculosis vaccine

Marisol Ocampo^{1,2,3}, Manuel A. Patarroyo^{1,2}, Magnolia Vanegas^{1,2}, Martha P. Alba^{1,2}, & Manuel E. Patarroyo^{1,3}

¹Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia, ²Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia, and ³Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Abstract

Tuberculosis (TB) is an air-born, transmissible disease, having an estimated 9.4 million new TB cases worldwide in 2009. Eventual control of this disease by developing a safe and efficient new vaccine able to detain its spread will have an enormous impact on public health policy. Selecting potential antigens to be included in a multi-epitope, minimal subunit-based, chemically-synthesized vaccine containing the minimum sequences needed for blocking mycobacterial interaction with host cells is a complex task due to the multiple mechanisms involved in *M. tuberculosis* infection and the mycobacterium's immune evasion mechanisms. Our methodology, described here takes into account a highly robust, specific, sensitive and functional approach to the search for potential epitopes to be included in an anti-TB vaccine; it has been based on identifying short mycobacterial protein fragments using synthetic peptides having high affinity interaction with alveolar epithelial cells (A549) and monocyte-derived macrophages (U937) which are able to block the microorganism's entry to target cells in *in vitro* assays. This manuscript presents a review of the results obtained with some of the MTB H37Rv proteins studied to date, aimed at using these high activity binding peptides (HABPs) as platforms to be included in a minimal subunit-based, multiepitope, chemically-synthesized, antituberculosis vaccine.

Keywords

Mycobacterium tuberculosis surface protein, receptor–ligand interaction, subunit-vaccine, synthetic-peptides

History

Received 31 October 2012
Revised 12 December 2012
Accepted 31 December 2012
Published online 27 February 2013

Introduction

Mycobacterium tuberculosis (MTB) is responsible for more deaths than any other infectious microorganism; it causes more than 9 million new cases and 1.7 million deaths a year (WHO, 2009). Tuberculosis (TB) control strategies have been centered on case detection and treatment involving at least three different drugs for prolonged periods of time. Multi-resistance against drugs is a serious impediment for any attempt at controlling this deadly disease (Espinal et al., 2001). No new first-line regime drugs have been added to the battery of medicaments used against TB for more than 30 years. MTB's effect on public health has increased severely, this being partially due to the HIV epidemic. There is clear synergy between MTB and HIV; active TB increases with immunodeficiency related to HIV as well as mortality (Toossi et al., 2001).

In fact, TB remains the largest attributable cause of death for HIV-infected individuals and is responsible for 32% of HIV-infected individuals' deaths in Africa. The neediest

populations in countries having the highest TB incidence do not have access to treatment and, furthermore, anti-TB drugs are ineffective in many cases. Developing effective TB vaccines has now become an obvious urgent priority; given the variable protective efficacy produced by the BCG vaccine against TB, a concerted effort is being made worldwide to develop better vaccines which could be used to reduce the burden of TB.

The publication of the *MTB* H37Rv strain genome in 1998 (Cole et al., 1998) provided information having great potential for discovering particular keys amongst the whole repertoire of genes to virulence, pathogenesis, survival and latency 115 years after Robert Koch discovered the existence of MTB in 1882. Such advance led to thinking about designing new drugs against the disease, defeating resistance to drugs and, above all, obtaining an effective vaccine. However, functional information about the proteins which they encode still remains very limited in spite of it being known that around 4000 genes form this microorganism and that they are available in enormous databases (Nagai et al., 1991).

Culturing *MTB in vitro* in the search for antigens having prophylactic or diagnostic potential has led to a complete set of proteins (culture filtrate proteins – CFPs) being found whose main characteristic is their immunodominance. Some antigens have been involved in a protection-inducing immune response or in activating T-cells in infected humans and

Address for correspondence: Prof Manuel Elkin Patarroyo M, MD, Carrera 50 #26-20, Bogotá, Colombia. Tel: (+57) 1 4815219; Fax: (+57) 1-4815269, E-mail: mepatarr@mail.com

11. Referencias

1. WHO. Global tuberculosis report 2013. Geneva: World Health Organization 2013.
2. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*. 1995 Nov 18;346(8986):1339-45.
3. Evans TG, Brennan MJ, Barker L, Thole J. Preventive vaccines for tuberculosis. *Vaccine*. 2013 Apr 18;31 Suppl 2:B223-6.
4. Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Kinomoto M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1991 Jan;59(1):372-82.
5. Andersen AB, Hansen EB. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1989 Aug;57(8):2481-8.
6. Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2013 Mar 23;381(9871):1021-8.
7. Seghrouchni F, Contini S, Markova R, Drenska R, Sadki K, Baassi L, et al. Design of immunogenic peptides from *Mycobacterium tuberculosis* genes expressed during macrophage infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 May;89(3):210-7.
8. Mustafa AS, Al-Attiyah R, Hanif SN, Shaban FA. Efficient testing of large pools of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 peptides and identification of major antigens and immunodominant peptides recognized by human Th1 cells. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Jun;15(6):916-24.
9. Launois P, DeLeys R, Niang MN, Drowart A, Andrien M, Dierckx P, et al. T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. *Infect Immun*. 1994 Sep;62(9):3679-87.
10. Vivona S, Gardy JL, Ramachandran S, Brinkman FS, Raghava GP, Flower DR, et al. Computer-aided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology. *Trends in biotechnology*. 2008 Apr;26(4):190-200.
11. Lozano JM, Patarroyo ME. A rational strategy for a malarial vaccine development. *Microbes Infect*. 2007 May;9(6):751-60.
12. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic,

multistage chemically synthesized vaccines. *Accounts of chemical research*. 2008 Mar;41(3):377-86.

13. Patarroyo ME, Cifuentes G, Bermudez A, Patarroyo MA. Strategies for developing multi-epitope, subunit-based, chemically synthesized anti-malarial vaccines. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008 Oct;12(5B):1915-35.

14. Cifuentes G, Bermudez A, Rodriguez R, Patarroyo MA, Patarroyo ME. 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 (Sharīqah (United Arab Emirates))*. 2008 May;4(3):278-92.

15. Patarroyo ME, Cifuentes G, Martinez NL, Patarroyo MA. Atomic fidelity of subunit-based chemically-synthesized antimalarial vaccine components. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2010 Jan;102(1):38-44.

16. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998 Jun 11;393(6685):537-44.

17. Yang X, Li Y, Wen X, Wu G, Li X. Risk factors for drug resistance in pulmonary tuberculosis inpatients. *J Evid Based Med*. 2010 Aug;3(3):162-7.

18. Dietrich J, Lundberg CV, Andersen P. TB vaccine strategies--what is needed to solve a complex problem? *Tuberculosis (Edinb)*. 2006 May-Jul;86(3-4):163-8.

19. McShane H, Williams A. A review of preclinical animal models utilised for TB vaccine evaluation in the context of recent human efficacy data. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013 Dec 1.

20. OPS. La salud en las Américas. Washington: Organización Panamericana de la Salud. OPS/OMS.2007.

21. Ministerio-de-Protección-Social. Plan estratégico. Colombia Libre de Tuberculosis 2012-2015. Bogotá: Ministerio de Protección Social. INS. OPS2009.

22. INS. Casos totales en la semana epidemiológica 51 y acumulados del año 2013. : Instituto Nacional de Salud, Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Sistema de Vigilancia en Salud Pública - SIVIGILA. Disponible en: www.ins.gov.co. Fecha de consulta: [24 diciembre de 2013].

23. Henao S, Sierra C, Sánchez E. Search for Tuberculosis in patients with the respiratory symptoms in four hospitals of Bogotá D.C. . *Journal of Public Health*. 2007;9(3):408-19.

24. Cáceres F, Orozco L. Delayed diagnosis of pulmonary tuberculosis in a particular part of Colombia *Journal of Public Health*. 2008;10(1):94-104.

25. Barrera L. The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino J.C. CLS, Ritacco V. Editors, editor. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007.
26. Mahapatra S, Bau J, Brennan P, *et al.* Structure, biosynthesis, and genetics of the Mycolic Acid-Arabinogalactan-Peptidoglycan complex. In: Press A, editor. Tuberculosis and the Tubercle bacillus. Washington DC 2005. p. 275-85.
27. Riley LW. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. The Journal of clinical investigation. 2006 Jun;116(6):1475-8.
28. Sutcliffe IC, Harrington DJ. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. FEMS microbiology reviews. 2004 Nov;28(5):645-59.
29. Sander P, Rezwan M, Walker B, Rampini SK, Kroppenstedt RM, Ehlers S, *et al.* Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 2004 Jun;52(6):1543-52.
30. Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 11;105(10):3963-7.
31. Kaur D, Guerin ME, Skovierova H, Brennan PJ, Jackson M. Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. Adv Appl Microbiol. 2009;69:23-78.
32. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis. 1998 Aug;19(11):1853-61.
33. Jungblut PR, Muller EC, Mattow J, Kaufmann SH. Proteomics reveals open reading frames in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv not predicted by genomics. Infect Immun. 2001 Sep;69(9):5905-7.
34. Gu S, Chen J, Dobos KM, Bradbury EM, Belisle JT, Chen X. Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain. Mol Cell Proteomics. 2003 Dec;2(12):1284-96.
35. Zhang LJ, Wang XE, Peng X, Wei YJ, Cao R, Liu Z, *et al.* Proteomic analysis of low-abundant integral plasma membrane proteins based on gels. Cell Mol Life Sci. 2006 Aug;63(15):1790-804.
36. Hubbard RD, Flory CM, Collins FM. Immunization of mice with mycobacterial culture filtrate proteins. Clin Exp Immunol. 1992 Jan;87(1):94-8.
37. Roberts AD, Sonnenberg MG, Ordway DJ, Furney SK, Brennan PJ, Belisle JT, *et al.*

Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*. 1995 Jul;85(3):502-8.

38. Mattow J, Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Lamer S, Zimny-Arndt U, et al. Identification of proteins from *Mycobacterium tuberculosis* missing in attenuated *Mycobacterium bovis* BCG strains. *Electrophoresis*. 2001 Aug;22(14):2936-46.

39. Sinha S, Arora S, Kosalai K, Namane A, Pym AS, Cole ST. Proteome analysis of the plasma membrane of mycobacterium tuberculosis. *Comparative and functional genomics*. 2002;3(6):470-83.

40. Sinha S, Kosalai K, Arora S, Namane A, Sharma P, Gaikwad AN, et al. Immunogenic membrane-associated proteins of *Mycobacterium tuberculosis* revealed by proteomics. *Microbiology*. 2005 Jul;151(Pt 7):2411-9.

41. Xiong Y, Chalmers MJ, Gao FP, Cross TA, Marshall AG. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv integral membrane proteins by one-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2005 May-Jun;4(3):855-61.

42. Mawuenyega KG, Forst CV, Dobos KM, Belisle JT, Chen J, Bradbury EM, et al. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Mol Biol Cell*. 2005 Jan;16(1):396-404.

43. Bell C, Smith GT, Sweredoski MJ, Hess S. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* proteome by liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics techniques: a comprehensive resource for tuberculosis research. *Journal of proteome research*. 2012 Jan 1;11(1):119-30.

44. Li Y, Zeng J, Shi J, Wang M, Rao M, Xue C, et al. A proteome-scale identification of novel antigenic proteins in *Mycobacterium tuberculosis* toward diagnostic and vaccine development. *Journal of proteome research*. 2010 Sep 3;9(9):4812-22.

45. Betts JC, Dodson P, Quan S, Lewis AP, Thomas PJ, Duncan K, et al. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiology*. 2000 Dec;146 Pt 12:3205-16.

46. Kohli S, Singh Y, Sharma K, Mittal A, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Comparative genomic and proteomic analyses of PE/PPE multigene family of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra reveal novel and interesting differences with implications in virulence. *Nucleic Acids Res*. 2012 Aug;40(15):7113-22.

47. Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect*

Immun. 2011 Feb;79(2):548-61.

48. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS microbiology reviews. 2000 Oct;24(4):449-67.
49. Hackbarth CJ, Unsal I, Chambers HF. Cloning and sequence analysis of a class A beta-lactamase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Antimicrob Agents Chemother. 1997 May;41(5):1182-5.
50. D'Orazio M, Folcarelli S, Mariani F, Colizzi V, Rotilio G, Battistoni A. Lipid modification of the Cu,Zn superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. Biochem J. 2001 Oct 1;359(Pt 1):17-22.
51. Matsuo T, Matsuo H, Ohara N, Matsumoto S, Kitaura H, Mizuno A, et al. Cloning and sequencing of an MPB70 homologue corresponding to MPB83 from *Mycobacterium bovis* BCG. Scand J Immunol. 1996 May;43(5):483-9.
52. Chitale S, Ehrt S, Kawamura I, Fujimura T, Shimono N, Anand N, et al. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. Cell Microbiol. 2001 Apr;3(4):247-54.
53. Haile Y, Caugant DA, Bjune G, Wiker HG. *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry operon (*mce*) homologs in *Mycobacterium* other than *tuberculosis* (MOTT). FEMS Immunol Med Microbiol. 2002 Jun 3;33(2):125-32.
54. Steyn AJ, Joseph J, Bloom BR. Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family. Mol Microbiol. 2003 Feb;47(4):1075-89.
55. Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, Kaprelyants AS, Kell DB, Young M. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 2002 Nov;46(3):623-35.
56. Booth RJ, Williams DL, Moudgil KD, Noonan LC, Grandison PM, McKee JJ, et al. Homologs of *Mycobacterium leprae* 18-kilodalton and *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton antigens in other mycobacteria. Infect Immun. 1993 Apr;61(4):1509-15.
57. Pai RK, Convery M, Hamilton TA, Boom WH, Harding CV. Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. J Immunol. 2003 Jul 1;171(1):175-84.
58. Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, Lakey DL, Harding CV, Boom WH. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. Infect Immun. 2003

Aug;71(8):4487-97.

59. Ashbridge KR, Booth RJ, Watson JD, Lathigra RB. Nucleotide sequence of the 19 kDa antigen gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 1989 Feb 11;17(3):1249.
60. Sanchez A, Espinosa P, Garcia T, Mancilla R. The 19 kDa *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein (LpqH) induces macrophage apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways: a role for the mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:950503.
61. Seshadri C, Turner MT, Lewinsohn DM, Moody DB, Van Rhijn I. Lipoproteins are major targets of the polyclonal human T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2013 Jan 1;190(1):278-84.
62. Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annual review of microbiology.* 2003;57:641-76.
63. Garcia-Perez BE, Mondragon-Flores R, Luna-Herrera J. Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microbial pathogenesis.* 2003 Aug;35(2):49-55.
64. Orme IM. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2013 Aug 4.
65. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.* 2007 Jan;5(1):39-47.
66. Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. *Lancet.* 2010 Jun 12;375(9731):2110-9.
67. Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1998 Apr;66(4):1277-81.
68. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1999 Oct 1;163(7):3920-7.
69. Feng CG, Bean AG, Hooi H, Briscoe H, Britton WJ. Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+), T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1999 Jul;67(7):3242-7.
70. 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. *Nat Med.* 2003 Aug;9(8):1039-46.
71. Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 19;93(6):2272-9.

72. Rook GA, Seah G, Ustianowski A. M. tuberculosis: immunology and vaccination. *Eur Respir J*. 2001 Mar;17(3):537-57.
73. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct;1(1):20-30.
74. Glatman-Freedman A, Casadevall A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):514-32.
75. Lopez Y, Yero D, Falero-Diaz G, Olivares N, Sarmiento ME, Sifontes S, et al. Induction of a protective response with an IgA monoclonal antibody against *Mycobacterium tuberculosis* 16kDa protein in a model of progressive pulmonary infection. *Int J Med Microbiol*. 2009 Aug;299(6):447-52.
76. Aronson NE, Santosham M, Comstock GW, Howard RS, Moulton LH, Rhoades ER, et al. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. *JAMA*. 2004 May 5;291(17):2086-91.
77. Mahomed H, Kibel M, Hawkridge T, Schaaf HS, Hanekom WA, Itoni K, et al. The impact of a change in bacille Calmette-Guerin vaccine policy on tuberculosis incidence in children in Cape Town, South Africa. *Pediatr Infect Dis J*. 2006 Dec;25(12):1167-72.
78. Sterne JA, Rodrigues LC, Guedes IN. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998 Mar;2(3):200-7.
79. Hesseling AC, Caldwell J, Cotton MF, Eley BS, Jaspan HB, Jennings K, et al. BCG vaccination in South African HIV-exposed infants--risks and benefits. *S Afr Med J*. 2009 Feb;99(2):88-91.
80. Hesseling AC, Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Fine PE, Godfrey-Faussett P, et al. The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children. *Vaccine*. 2007 Jan 2;25(1):14-8.
81. Hesseling AC, Cotton MF, Fordham von Reyn C, Graham SM, Gie RP, Hussey GD. Consensus statement on the revised World Health Organization recommendations for BCG vaccination in HIV-infected infants. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008 Dec;12(12):1376-9.
82. Jackson M, Phalen SW, Lagranderie M, Ensergueix D, Chavarot P, Marchal G, et al. Persistence and protective efficacy of a *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine. *Infect Immun*. 1999 Jun;67(6):2867-73.
83. Kamath AT, Valenti MP, Rochat AF, Agger EM, Lingnau K, von Gabain A, et al. Protective anti-mycobacterial T cell responses through exquisite in vivo activation of vaccine-

- targeted dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2008 May;38(5):1247-56.
84. Huygen K. DNA vaccines against mycobacterial diseases. *Future Microbiol*. 2006 Jun;1(1):63-73.
85. Orme IM, McMurray DN, Belisle JT. Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol*. 2001 Mar;9(3):115-8.
86. 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 Jun;124(2):175-85.
87. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and cell biology*. 2004 Oct;82(5):488-96.
88. Patarroyo ME, Bermudez A, Moreno-Vranich A. Towards the development of a fully protective *Plasmodium falciparum* antimalarial vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2012 Sep;11(9):1057-70.
89. Patarroyo ME, Bermudez A, Patarroyo MA. Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. *Chem Rev*. 2011 May 11;111(5):3459-507.
90. Restrepo-Montoya D, Vizcaino C, Nino LF, Ocampo M, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Validating subcellular localization prediction tools with mycobacterial proteins. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:134.
91. Vizcaino C, Restrepo-Montoya D, Rodriguez D, Nino LF, Ocampo M, Vanegas M, et al. Computational prediction and experimental assessment of secreted/surface proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *PLoS Comput Biol*. 2010 Jun;6(6):e1000824.
92. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*. 2004 Jul 16;340(4):783-95.
93. Bendtsen JD, Nielsen H, Widdick D, Palmer T, Brunak S. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics*. 2005;6:167.
94. Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, Krogh A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci*. 2003 Aug;12(8):1652-62.
95. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel*. 2004 Apr;17(4):349-56.
96. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001 Jan 19;305(3):567-80.

97. Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol.* 2004 May 14;338(5):1027-36.
98. Chou KC, Shen HB. Cell-PLoc: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nat Protoc.* 2008;3(2):153-62.
99. Gardy JL, Laird MR, Chen F, Rey S, Walsh CJ, Ester M, et al. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics.* 2005 Mar 1;21(5):617-23.
100. Lu Z, Szafron D, Greiner R, Lu P, Wishart DS, Poulin B, et al. Predicting subcellular localization of proteins using machine-learned classifiers. *Bioinformatics.* 2004 Mar 1;20(4):547-56.
101. Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research.* 2006;2:2.
102. Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Aug;82(15):5131-5.
103. Rezwani M, Laneelle MA, Sander P, Daffe M. Breaking down the wall: fractionation of mycobacteria. *Journal of microbiological methods.* 2007 Jan;68(1):32-9.
104. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods.* 1984 Dec;10(3-4):203-9.
105. Wagner B, Fattorini L, Wagner M, Jin SH, Stracke R, Amicosante G, et al. Antigenic properties and immunoelectron microscopic localization of *Mycobacterium fortuitum* beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Mar;39(3):739-45.
106. Yamamura H, Enna S, Kuhar M. Neurotransmitter Receptor Binding. New York: Raven Press; 1978.
107. Vera-Bravo R, Torres E, Valbuena JJ, Ocampo M, Rodriguez LE, Puentes A, et al. Characterising *Mycobacterium tuberculosis* Rv1510c protein and determining its sequences that specifically bind to two target cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jul 8;332(3):771-81.
108. Rodriguez D, Vizcaino C, Ocampo M, Curtidor H, Pinto M, Patarroyo ME, et al. Peptides from the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1980c protein involved in human cell infection: insights into new synthetic subunit vaccine candidates. *Biol Chem.* 2010 Feb-Mar;391(2-3):207-17.
109. Chapeton-Montes JA, Plaza DF, Barrero CA, Patarroyo MA. Quantitative flow cytometric

monitoring of invasion of epithelial cells by *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci*. 2008;13:650-6.

110. Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun*. 1996 Apr;64(4):1400-6.

111. El-Shazly S, Ahmad S, Mustafa AS, Al-Attayah R, Krajci D. Internalization by HeLa cells of latex beads coated with mammalian cell entry (Mce) proteins encoded by the mce3 operon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of medical microbiology*. 2007 Sep;56(Pt 9):1145-51.

112. Parra M, Yang AL, Lim J, Kolibab K, Derrick S, Cadieux N, et al. Development of a murine mycobacterial growth inhibition assay for evaluating vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Jul;16(7):1025-32.

113. Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, et al. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microbial pathogenesis*. 2005 Sep;39(3):97-107.

114. Faith A, Moreno C, Lathigra R, Roman E, Fernandez M, Brett S, et al. Analysis of human T-cell epitopes in the 19,000 MW antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: influence of HLA-DR. *Immunology*. 1991 Sep;74(1):1-7.

115. Lancioni CL, Li Q, Thomas JJ, Ding X, Thiel B, Drage MG, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lipoproteins directly regulate human memory CD4(+) T cell activation via Toll-like receptors 1 and 2. *Infect Immun*. 2011 Feb;79(2):663-73.

116. Wolfe LM, Mahaffey SB, Kruh NA, Dobos KM. Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res*. 2010 Nov 5;9(11):5816-26.

117. Mamoune A, Saraux A, Delaunay JL, Le Goff P, Youinou P, Le Corre R. Autoantibodies to CD45 in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 1998 Oct;11(5):485-8.

118. Sreerama N, Venyaminov SY, Woody RW. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci*. 1999 Feb;8(2):370-80.

119. Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem*. 2000 Dec 15;287(2):252-60.

120. Rook GA, Hernandez-Pando R, Dheda K, Teng Seah G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol*. 2004 Sep;25(9):483-8.

121. Thillai M, Pollock K, Pareek M, Lalvani A. Interferon-gamma release assays for

- tuberculosis: current and future applications. *Expert Rev Respir Med*. 2014 Feb;8(1):67-78.
122. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:93-129.
123. Dye C, Fine PE. A major event for new tuberculosis vaccines. *Lancet*. 2013 Mar 23;381(9871):972-4.
124. Wang CC, Zhu B, Fan X, Gicquel B, Zhang Y. Systems approach to tuberculosis vaccine development. *Respirology*. 2013 Apr;18(3):412-20.
125. Song H, Sandie R, Wang Y, Andrade-Navarro MA, Niederweis M. Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008 Nov;88(6):526-44.
126. Blobel G. Protein targeting (Nobel lecture). *Chembiochem*. 2000 Aug 18;1(2):86-102.
127. Shi Y, Mowery RA, Ashley J, Hentz M, Ramirez AJ, Bilgicer B, et al. Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. *Protein Sci*. 2012 Aug;21(8):1197-209.
128. Shams H, Klucar P, Weis SE, Lalvani A, Moonan PK, Safi H, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4+ and CD8+ T cells in the context of multiple HLA alleles. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):1966-77.
129. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995 Jun;2(6):561-72.
130. Cooper AM, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol*. 2002 May;10(5):221-6.
131. Algood HM, Chan J, Flynn JL. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Dec;14(6):467-77.
132. Igietseme JU, Eko FO, He Q, Black CM. Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines*. 2004 Feb;3(1):23-34.
133. Maglione PJ, Chan J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*. 2009 Mar;39(3):676-86.
134. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:393-422.
135. Kolibab K, Parra M, Yang AL, Perera LP, Derrick SC, Morris SL. A practical *in vitro* growth inhibition assay for the evaluation of TB vaccines. *Vaccine*. 2009 Dec 11;28(2):317-22.