



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN EN RATONES DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR
INDUCIDA POR LA ADHESINA HEMAGLUTININA DE UNIÓN A HEPARINA (HBHA) DE
Mycobacterium tuberculosis EXPRESADA EN *Rhodococcus erythropolis*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Isabel Cecilia Neri Badillo

TUTOR PRINCIPAL

Clara Inés Espitia Pinzón
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Rogelio Hernández Pando
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

Luis Servín González
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Marzo, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Neri Badillo Isabel Cecilia
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de **enero** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Evaluación en ratones de la respuesta inmune humoral y celular inducida por la adhesina hemaglutinina de unión a heparina (HBHA) de Mycobacterium tuberculosis expresada en Rhodococcus erythropolis**", dirigida por el/la Dr(a). **Espitia Pinzón Clara Inés**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Rodríguez Sanoja Romina María de la Paz
VOCAL	Fragoso González Gladis del Carmen
VOCAL	Bobes Ruiz Raúl José
VOCAL	Gutiérrez Pabello José Ángel
SECRETARIO	Arreguín Espinosa de los Monteros Roberto

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de enero de 2020.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

- Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de este proyecto No. CVU: 894564
- Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IN207717), CONACYT (4843) y al programa Nuevas Alternativas para el Tratamiento de Enfermedades Infecciosas (NUATEI) por el presupuesto otorgado para la realización de este trabajo.
- A la Dra. Mayra Silva Miranda, la M. en C. Paola Andrea Ortega Portilla y el M. en C. José Alberto Martínez Sotelo por el apoyo académico ofrecido y las enseñanzas compartidas.
- A la técnica M. en C. Cristina Parada Colín por compartirme sus amplios conocimientos sobre las técnicas y campos de conocimiento necesarios para el desarrollo de este proyecto y por la asesoría ofrecida durante la realización del mismo.
- A los Doctores Rogelio Hernández Pando y Luis Servín Gonzáles por sus comentarios constructivos, clave para el adecuado desarrollo del proyecto, ofrecidos durante la evaluación del mismo.
- A la Doctora Clara Inés Espitia Pinzón por aceptarme en su grupo de trabajo y brindarme su tutoría y apoyo durante mi estadía en el laboratorio.

Abreviaturas y acrónimos

BCG	Bacilo <i>Mycobacterium bovis</i> de Calmette – Guerin
BSA	Albúmina de suero bovino
CFSE	Succinimidil – carboxifluoresceína
CMSP	Celulas mononucleares de sangre periférica
HBHA	Adhesina Hemaglutinina de Unión a Heparina
PPD	Derivado de proteína purificada
UFC	Unidades formadoras de colonia
PBST20	PBS 1x con Tween20 0.05%
MA	Macrófagos alveolares
SFB	Suero fetal bovino
rHBHA – RE	HBHA recombinante expresada en <i>Rhodococcus erythropolis</i>
rHBHA – EC	HBHA recombinante expresada en <i>Escherichia coli</i>
PAPM	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBST	PBS 1x con Tween 20 0.05%
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PTM	Modificaciones post – traduccionales

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Tuberculosis.....	2
2.1.1. Epidemiología.....	3
2.1.2. Diagnóstico, tratamiento y prevención	4
2.1.3. Vacunas contra la tuberculosis.....	6
2.2. Patogenia e inmunidad de la tuberculosis.....	8
2.2.1. Patogénesis.....	9
2.2.2. Respuesta inmune frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
2.2.2.1. Citocinas asociadas con la tuberculosis.....	14
2.3. Antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
2.4. Adhesina hemaglutinitina de unión a heparina (HBHA).....	18
3. Antecedentes.....	21
4. Planteamiento del problema.....	22
5. Objetivo general.....	23
6. Objetivos particulares.....	23
7. Hipótesis.....	24
8. Materiales y método.....	24
8.1. Extracción y purificación de proteínas HBHA recombinantes.....	24
8.2. SDS – PAGE y Western Blot.....	25
8.3. Detección de mono y dimetil lisinas en rHBHA – RE por quimioluminiscencia.....	25
8.4. Determinación de la masa molecular de rHBHA – RE por MALDI TOF.....	26
8.5. Ensayo de toxicidad de HBHA hacia células Vero, A549 y RAW264.1	26

8.6. Preparación de BCG (Phipps) para inmunización.....	26
8.7. Inmunización de ratones BALB/c con proteínas recombinantes HBHA.....	27
8.8. Identificación de anticuerpos producidos en ratones inmunizados con HBHA.....	28
8.9. Obtención de esplenocitos de ratones inmunizados.....	29
8.10. Tinción con CFSE y cultivo de células de bazo de ratones inmunizados.....	29
8.11. Inmunoensayo multiplex para la determinación de citocinas.....	29
8.12. Evaluación de la proliferación celular por citometría de flujo.....	30
8.13. Análisis estadístico.....	31
9. Resultados	32
9.1. Extracción y purificación de proteínas HBHA recombinantes.....	32
9.2. Western Blot y detección de lisinas metiladas en rHBHA – RE.....	33
9.3. Determinación de la masa molecular de rHBHA – RE por MALDI TOF.....	33
9.4. Ensayo de toxicidad de HBHA hacia células Vero, A549 y RAW264.1.....	34
9.5. Identificación de anticuerpos producidos en ratones inmunizados con HBHA.....	35
9.6. Determinación de citocinas	37
9.7. Evaluación <i>in vitro</i> de la proliferación celular inducida por las proteínas rHBHA.....	40
10. Discusión.....	42
11. Conclusiones.....	48
12. Perspectivas.....	49
13. Referencias.....	50

1- Resumen

Los altos índices de mortalidad y morbilidad por tuberculosis, el surgimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes y la baja eficiencia de la vacuna *Mycobacterium bovis* BCG, la única vacuna disponible contra la enfermedad, hace necesaria la búsqueda y evaluación de antígenos que puedan mejorar la protección ofrecida por la vacuna. La adhesina hemaglutinina de unión a heparina (HBHA), un antígeno de *M. tuberculosis* que induce altos niveles de IFN- γ en las células mononucleares de sangre periférica de individuos con tuberculosis latente y que ha mostrado una capacidad protectora ante un reto con la bacteria virulenta en modelos murinos es un candidato importante como vacuna. Sin embargo, su función protectora, ha sido asociada a la presencia de un patrón característico de metilación presente únicamente en la proteína nativa extraída de *M. tuberculosis*. Debido a la dificultad de obtención de este antígeno, en nuestro laboratorio se clonó y expresó en *Rhodococcus erythropolis* como una proteína recombinante metilada. En el presente trabajo se evaluó la respuesta inmune humoral y celular a este antígeno mediante la inmunización subcutánea, intranasal e intraperitoneal de ratones BALB/c con las proteínas recombinantes HBHA metilada (rHBHA – RE) y no metilada (rHBHA – EC), esta última expresada en *Escherichia coli*, y se comparó con la ejercida por la vacuna BCG. Los resultados obtenidos mostraron que ambas proteínas inducen la producción de anticuerpos IgG, subclase IgG1, en ratones inmunizados por la vía subcutánea e intraperitoneal. Así mismo, la inmunización subcutánea e intranasal con rHBHA – RE estimuló la producción de citocinas protectoras pro – inflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17 e IL-2) y anti – inflamatorias (IL-10) en células de bazo. Aunado a lo anterior la inmunización subcutánea indujo la proliferación de linfocitos T CD4⁺. Además, el re – estímulo con rHBHA – RE de esplenocitos de ratones inmunizados con BCG incremento la expresión de las citocinas IFN- γ e IL-17. Mientras que el re – estímulo con el bacilo en los ratones inmunizados con BCG incrementó la expresión de TNF- α e IL-1 β . Lo anterior, pone en evidencia que la inmunización con la rHBHA – RE es capaz de incrementar en ratones, la respuesta inmune humoral y celular en comparación con la inducida por la vacunación con BCG, principalmente cuando es administrada por la vía subcutánea. Por lo que rHBHA - RE podría ser utilizada en un esquema de refuerzo de la vacuna BCG para evaluar el efecto protector que induce en ratones frente a la infección con *M. tuberculosis*.

Evaluación en ratones de la respuesta inmune humoral y celular inducida por la adhesina hemaglutinina de unión a heparina (HBHA) de *Mycobacterium tuberculosis* expresada en *Rhodococcus erythropolis*

2. Introducción

2.1. Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecto – contagiosa que se encuentra entre una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo y es la causa líder mundial de muerte debida a un solo agente infeccioso (por encima del VIH/SIDA). Su agente etiológico, el bacilo *M. tuberculosis*, es transmitido a través del aire por medio de aerosoles (gotas de Fluggen) que se generan cuando los individuos infectados tosen. Afecta principalmente a los pulmones (tuberculosis pulmonar) pero puede también afectar otros órganos (tuberculosis extrapulmonar) (OMS, 2019). La expresión clínica de la enfermedad puede variar sustancialmente entre individuos y depende tanto de factores del hospedero como del bacilo. Únicamente el 10% de la población infectada desarrolla tuberculosis activa en algún momento durante su vida, mientras que en el 90% de la población restante se establece una tuberculosis latente en la cual los individuos infectados no desarrollan síntomas de la enfermedad (Wen *et al.*, 2017). Aunque el riesgo de progresión a una enfermedad activa en los individuos con tuberculosis latente es más alto dentro de los primeros dos años de infección, existe durante toda su vida el riesgo de desarrollar la enfermedad activa en caso de no ser tratados. El riesgo es particularmente alto para personas en condiciones de inmunosupresión, tales como aquellos infectados con VIH o que presentan falla renal crónica. Los sujetos con tuberculosis latente, por lo tanto, representan un importante reservorio para futuros casos de tuberculosis, por lo que su identificación, tratamiento preventivo y vigilancia son elementos clave en el control de la tuberculosis (Hougardy *et al.*, 2007).

Cerca de un cuarto de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*, por lo tanto, presenta un riesgo de desarrollar la enfermedad. Con un diagnóstico oportuno y tratamiento con antibióticos de primera línea por 6 meses la tuberculosis pueden ser curada y la transmisión disminuida. El número de casos de tuberculosis anuales pueden ser disminuidas al reducir la prevalencia de los factores de riesgo relacionados con la enfermedad; al proveer tratamiento preventivo a las personas con tuberculosis latente; y al tomar acciones multisectoriales relacionados con la infección o enfermedad con *M. tuberculosis* (OMS, 2019).

2.1.1. Epidemiología

Globalmente, entre 9 y 11.1 millones de personas desarrollaron tuberculosis activa en 2018, un número que ha sido relativamente estable en los últimos años. La incidencia de la enfermedad varía ampliamente entre países, en 2018, el promedio global de casos nuevos fue de 130 por cada 100 000 habitantes. En ese mismo año la tuberculosis causó entre 1.2 y 1.4 millones de muertes entre personas VIH negativas y entre 266 000 y 335 000 muertes entre personas VIH positivas. La tuberculosis afecta a personas de ambos sexos en todos los grupos de edad pero la incidencia es más alta es en hombres mayores a 15 años, quienes representaron el 57% de todos los casos de tuberculosis en 2018, en comparación con las mujeres y los niños (menores a 15 años), quienes representaron el 32% y 11%, respectivamente. De la totalidad de los casos, 8.6% fueron personas VIH positivos (OMS 2019).

Geográficamente, muchos de los casos de tuberculosis en 2018 se concentraron en el Suroeste de Asia (44%), África (24%) y el Este del Pacífico (18%), con pequeños porcentajes en Este del Mediterráneo (8%), las Américas (3%), y Europa (3%). Ocho países representan dos tercios del total global: India (27%), China (9%), Indonesia (8%), las Filipinas (6%), Pakistán (6%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%), y Sudáfrica (3%). Estos y otros 22 países en la lista de la Organización Mundial de la Salud (OMS) son aquellos con la mayor incidencia de tuberculosis, representando el 87% de los casos a nivel mundial (OMS 2019).

Aunado a lo anterior, la tuberculosis resistente a fármacos representa un problema grave de salud pública. En 2018, se presentaron cerca de medio millón de nuevos casos de tuberculosis resistentes a rifampicina (de los cuales el 78% tenía tuberculosis multi – drogo – resistente). Globalmente 3.4% de nuevos casos de tuberculosis y 18% de los casos tratados previamente tenían tuberculosis multi – drogo – resistente o resistente a rifampicina, con la proporción más alta en los países que forman la unión Soviética (OMS 2019).

En México la incidencia total de la tuberculosis en 2018 fue de 23 individuos por cada 100 000 habitantes siendo más alta en varones entre 25 y 54 años. En ese mismo año se notificaron un total de 24 096 casos de los cuales 2.6% correspondió a tuberculosis multi drogo resistente o resistente. La tasa de mortalidad fue de 2.49 por cada 100 000 habitantes, de los cuales 0.59 correspondió a individuos VIH positivos (OMS 2019).

2.1.2. Diagnóstico, tratamiento y prevención

El diagnóstico clínico de la tuberculosis es difícil debido a la presencia de síntomas similares a otras enfermedades, tal es el caso que incluso los datos radiológicos son muy diversos. Sin embargo, un rápido diagnóstico y tratamiento son importantes para reducir la mortalidad y la morbilidad. Algunos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis son considerados como clásicos debido a que han estado en el mercado por décadas, tales como, la prueba de la tuberculina, métodos radiográficos, microscopia de frotis, cultivo bacteriológico y detección de citocinas. El método diagnóstico estándar es el aislamiento y cultivo de la bacteria. Esta técnica detecta cerca del 80% de los casos de tuberculosis actuales, sin embargo, puede tomar varias semanas tener un diagnóstico definitivo y presentan un número de desventajas, tales como: recurrente ocurrencia de falsos positivos, poca y variable sensibilidad, habilidad limitada para la identificación de especies, especificidad variable, entre otros (Hougardy *et al.*, 2007; Poeta *et al.*, 2018; Wyndham – Thomas *et al.*, 2013).

En años recientes se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico que superan en rapidez y eficiencia a los clásicos, los cuales incluyen técnicas moleculares y cultivos rápidos (Tabla 1). Sin embargo, todavía no existen pruebas disponibles que permitan predecir la progresión hacia la forma activa de la enfermedad, recaída después del tratamiento o protección después de la vacunación (Walzl *et al.*, 2018).

Actualmente el número de antibióticos disponibles se ha incrementado considerablemente, pero los primeros antibióticos descubiertos durante los 1950s y 1960s se siguen manteniendo como primera línea de tratamientos contra la tuberculosis, particularmente la Rifampicina y la Isoniazida (Bañuls *et al.*, 2015). Lo anterior debido a su potente efecto bactericida y a la dificultad en la generación de mutaciones de resistencia hacia dichos fármacos. Aunque la tasa de resistencia a la Rifampicina ha incrementado debido a su amplio uso en el tratamiento contra la tuberculosis (Zaw *et al.* 2018). La terapia preventiva con estos fármacos para personas con riesgo de tuberculosis es un componente importante de las estrategias de la OMS para eliminar la tuberculosis. La aparición de cepas de tuberculosis mono o multi – resistentes a los fármacos hace el manejo de esta enfermedad muy difícil. Los tratamientos actualmente recomendados por la OMS para controlar el problema de resistencia a los fármacos incluyen varias fases con diferentes combinaciones de antibióticos. Sin embargo, la complejidad y la duración (seis meses, al menos) del tratamiento hacen difícil su aplicación, en países de bajos ingresos. Un tratamiento

inadecuadamente completado y la carencia de herramientas diagnósticas rápidas y efectivas son los principales factores de emergencia y transmisión de tuberculosis resistente a los fármacos en las poblaciones (Bañuls *et al.*, 2015).

Tabla 1.- Métodos diagnósticos de tuberculosis y resistencia a fármacos de uso clínico en pacientes con sospecha de la enfermedad

Método diagnóstico	Fundamento	Especificidad	Sensibilidad	Referencia
Espoligotipo (tipificación de oligonucleótidos espaciadores)	Basada en la presencia o ausencia de alguna de las 43 secuencias espaciadoras en la región de las repeticiones directas de <i>M. tuberculosis</i>	40%	83%	Scott A, <i>et al.</i> (2005)
Ensayo por sonda lineal (LPA)	Determina el perfil de resistencia a fármacos de cepas de <i>M. tuberculosis</i> a través del patrón de unión de amplicones a sondas dirigidas a mutaciones asociadas a resistencia.	89.3%	68.4%	Poeta P <i>et al.</i> (2018)
Xpert MTB/RIF	Prueba basada en PCR automatizado que puede identificar ADN de <i>M. tuberculosis</i> en especímenes clínicos y detecta resistencia a Rifampicina.	92%	31%	Poeta P <i>et al.</i> (2018)
Truenat MTB	Permite la detección de ADN de <i>M. tuberculosis</i> a partir de muestras de pacientes con sospecha de la enfermedad usando un chip y PCR.	100%	91%	Poeta P <i>et al.</i> (2018)

2.1.3 Vacunas contra la tuberculosis

Mycobacterium bovis bacilo de Calmette – Guerin (BCG), una cepa micobacteriana atenuada, se mantiene como la única vacuna disponible contra la tuberculosis, sin embargo, debido a la variable protección que ofrece contra la tuberculosis pulmonar adulta existe una urgente necesidad de desarrollar una vacuna que incremente o potencie la protección ofrecida por BCG (Guerrero *et al.*, 2011).

El bacilo *M. bovis* BCG, fue introducida hace casi 100 años. En países donde la tuberculosis es endémica, los recién nacidos son inmunizados con BCG inmediatamente después de su nacimiento, ya que se ha corroborado que protege a los infantes de las formas más graves de tuberculosis, tales como las formas diseminadas y meníngeas, reduciendo el riesgo de desarrollar la enfermedad de un 64 – 92% en infantes y neonatos (OMS, 2019). Sin embargo, diversos estudios clínicos han llegado al consenso de que la BCG es incapaz de proveer una protección significativa contra la tuberculosis pulmonar adulta, variando su eficacia entre el 0 y el 80%. Los factores responsables de la eficacia variable en adultos incluyen: la virulencia de las diferentes cepas de *M. tuberculosis*; las condiciones de almacenamiento de la vacuna y la viabilidad resultante; la pérdida de genes de las cepas de vacunación; la frecuencia de exposición a *M. tuberculosis*; la nutrición del hospedero; y la exposición a cepas ambientales de micobacterias (Aerts *et al.*, 2019; Dalmia *et al.*, 2012; Morandi *et al.*, 2013; Teimourpour *et al.*, 2015).

Para reducir la carga global de la enfermedad, nuevas estrategias de vacunación contra la tuberculosis son necesarias a fin de inducir una inmunidad más eficiente que supere a la lograda con la vacuna BCG, no solamente en los infantes, sino también en los adolescentes y adultos. El mecanismo crucial de acción de los candidatos a vacuna presentes es la activación de una inmunidad celular y humoral específica de antígeno, principalmente mediante la inducción de células de memoria. Cuando estas células de memoria re – encuentran un antígeno, montan una respuesta rápida y robusta para controlar la infección en un estadio temprano. Por lo tanto, muchas vacunas en desarrollo se han enfocado en identificar nuevos epítopes de células T CD4⁺ que induzcan respuestas de tipo T_H1, las cuales activan las capacidades antimicrobianas de los macrófagos. De importancia central son las células T de memoria que producen IFN – γ , TNF – α e IL – 2. Adicionalmente, las células T CD8⁺ atacan directamente a *M. tuberculosis* por medio de perforinas y granulosinas, y las células T_H17 apoyan las respuestas T_H1 (Kaufmann *et al.* 2010; Li *et al.*, 2018).

La inducción de respuestas de memoria tipo T_H1 que protejan eficientemente al hospedero contra *M. tuberculosis* depende de factores relacionados con la administración de la vacuna, incluyendo: el antígeno seleccionado, vectores (virales, bacterianos, ADN) o vehículos usados para el transporte del antígeno, adyuvantes que potencien la respuesta inmune adaptativa o vehículos usados para el transporte del antígeno, la ruta de administración de la vacuna, la dosis administrada y la localización de células de memoria activadas por la vacunación (Li *et al.*, 2018; Lewellys *et al.*, 2009). La ruta de inmunización tiene un impacto en la localización y diferenciación de células activadas por la vacunación. La inmunización intranasal ha sido evaluada como una aproximación prometedora para la inducción de la inmunidad en la mucosa del tracto respiratorio debido a que además de inducir una respuesta inmune sistémica también induce una respuesta en las mucosas de las vías aéreas, mientras que la inmunización subcutánea preferiblemente provoca respuestas en suero y tejidos linfoides periféricos. La inmunización intranasal con BCG preferiblemente induce células T CD4⁺ específicas de *M. tuberculosis* en tejido pulmonar (Li *et al.*, 2018).

Actualmente, tres tipos de estrategias de vacunación contra la tuberculosis están siendo consideradas. La primera, es la modificación genética de la BCG adicionando genes relevantes o deletando genes de virulencia, a fin de activar el sistema inmune e inducir células T de memoria. La segunda, es administrar refuerzos a la BCG con vacunas de subunidad para incrementar la duración de la inmunidad. Y la tercera, la administración de una vacuna post – infección para evitar la reactivación del estado latente de *M. tuberculosis* y permitir el aclaramiento de las bacterias persistentes (Kaufmann *et al.*, 2010). Varias vacunas nuevas contra la tuberculosis han producido resultados positivos en estudios clínicos humanos que demuestran su capacidad de inducir una respuesta celular robusta contra *M. tuberculosis* (Lewellys *et al.*, 2009). Las vacunas que se encuentran actualmente en fase experimental y la descripción de los parámetros considerados para cada fase son mostradas en la Figura 1.

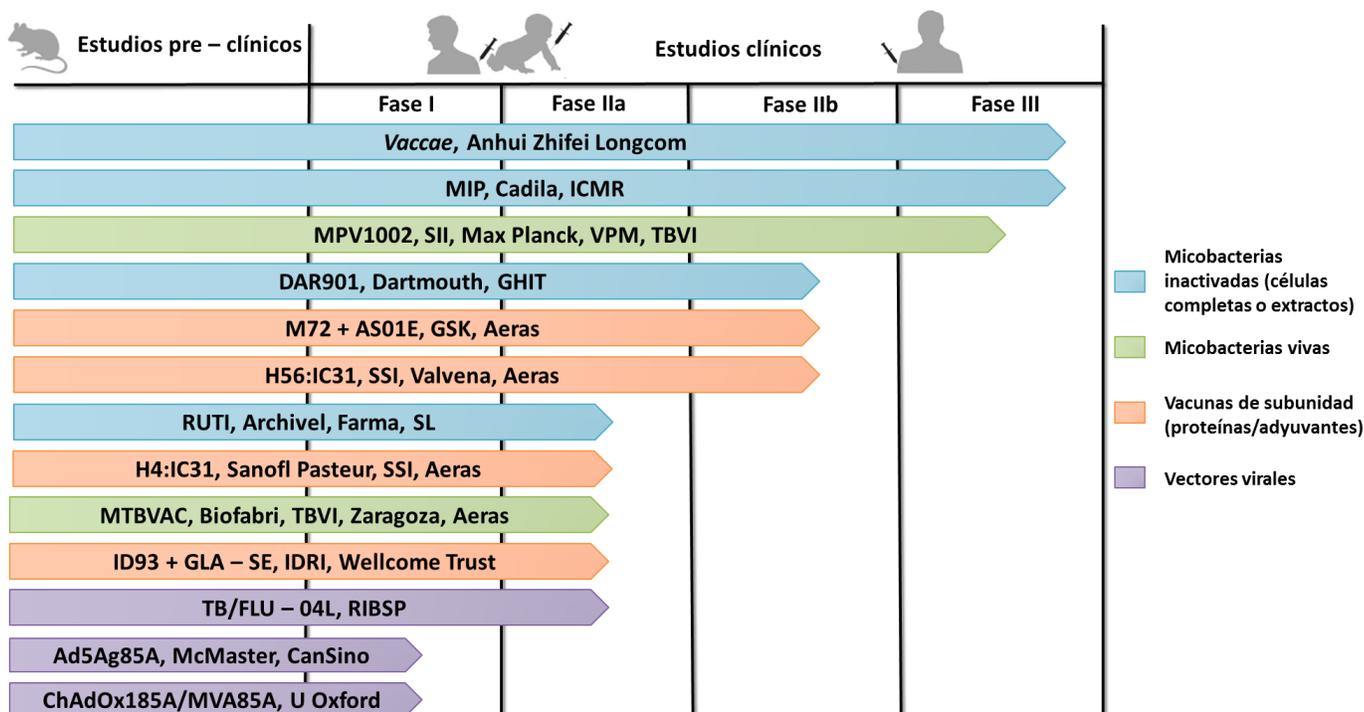


Figura 1.- Candidatos a vacunación que son evaluados actualmente con la finalidad de proveer eficacia y seguridad para la obtención de su licencia. Modificado de: <http://www.aeras.org/pages/global-portfolio>

2.2.- Patogenia e inmunidad de la tuberculosis

La tuberculosis afecta principalmente a los pulmones humanos, pero algunas de las consecuencias clínicas más devastadoras de la enfermedad resultan de la habilidad de *M. tuberculosis* de diseminarse de los pulmones a otros órganos. El tráfico de la bacteria del sitio inicial de infección, el alveolo pulmonar, a los nódulos linfáticos regionales y a cualquier otro lugar tiene dos consecuencias conflictivas. Aunque facilita la presentación de antígenos de *M. tuberculosis* dentro de los nódulos linfáticos regionales, esencial para el desarrollo de una respuesta inmune protectora mediada por células T, también facilita la diseminación de la bacteria de los pulmones a otros órganos promoviendo el desarrollo de la enfermedad, tal como la tuberculosis meníngea o miliar, las cuales son invariablemente fatales sin el tratamiento adecuado (Krishnan *et al.*, 2010).

Las características principales de la tuberculosis, son las diversas manifestaciones clínicas y severas secuelas que requieren un diagnóstico y tratamiento apropiado. La infección por *M. tuberculosis* puede producir una enfermedad progresiva o más comúnmente, un estado latente

(Sáenz *et al.*, 2012). En muchos hospederos, *M. tuberculosis* permanece la mayor parte de su ciclo de vida natural en un estado clínicamente asintomático de replicación arrestada o ralentizada. Sin embargo, *M. tuberculosis* es ampliamente reconocido por su capacidad de causar enfermedades clínicas en hospederos inmunocompetentes años o décadas después de la contención exitosa de la infección primaria y de transferirse a un nuevo hospedero a partir de individuos con tuberculosis activa. Esto sugiere que *M. tuberculosis* ha evolucionado generando mecanismos específicos para resistir en hospederos inmunocompetentes, censar estados de inmunosupresión de individuos infectados con el bacilo y reactivarse de periodos de latencia; una característica que comienza a ser evidente con el descubrimiento del incremento en la tasa de enfermedad y mortalidad en poblaciones con tuberculosis latente que presentan enfermedades asociadas o se encuentran en un estado de inmunosupresión (Hartman *et al.*, 2017).

En el primer encuentro entre el sistema inmune y la micobacteria la efectividad de la respuesta inmune innata dicta el progreso clínico de la enfermedad. Si esta respuesta es lo suficientemente fuerte y el bacilo no es altamente virulento, la bacteria puede ser erradicada; de otra manera, *M. tuberculosis* será confinado a las células hospederas, generando una enfermedad latente. En este punto, la respuesta inmune adaptativa es determinante para el progreso de la enfermedad, de una forma pasiva a una activa (Sáenz *et al.*, 2012).

2.2.1. Patogénesis

El bacilo causante de la tuberculosis entra al cuerpo humano principalmente a través de la vía respiratoria después de la inhalación de pequeñas gotas de Fluggue expelidas al aire por individuos infectados. Estas partículas son lo suficientemente pequeñas para alcanzar las vías aéreas inferiores de otros hospederos. El éxito de la infección y el desarrollo de la forma pulmonar de la tuberculosis depende de cuatro exitosos pasos: fagocitosis del bacilo, su multiplicación intracelular, la fase de contención latente de la infección y finalmente la infección activa de pulmón. Estos pasos pueden progresar a través de diferentes escenarios clínicos: cura espontánea, enfermedad, infección latente y re – activación o re – infección (Bañuls *et al.*, 2015). No todos los individuos que son expuestos a *M. tuberculosis* desarrollan la enfermedad, sugiriendo que algunos pueden despejar a las bacterias a través del mecanismo inmune innato o contenerlas en un estado quiescente (dentro de granulomas) por periodos prolongados (referido como tuberculosis latente). Sin embargo, las bacterias pueden comenzar a replicarse y escapar de granuloma resultando en una tuberculosis activa clínicamente. En aquellos individuos que son

infectados exitosamente, el patógeno es contra - atacado a través de mecanismos inmunes adaptativos que involucran diferentes poblaciones de células T (Walz *et al.*, 2011).

Debido a que la infección con *M. tuberculosis* ocurre vía aerosol, las células mieloides residentes de pulmón son las primeras en tener contacto con el bacilo. Estas células, en particular los macrófagos alveolares (MA), han sido reconocidas por jugar un papel dual en el control de *M. tuberculosis*. Mientras que ellas pueden contribuir a la resistencia del hospedero, también son clave para el establecimiento de la infección. Los MA son células implicadas en el proceso de fagocitosis mediada por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), resultando en la acidificación del fagosoma, la formación del fagolisosoma y la destrucción bacteriana. Sin embargo, una vez dentro de los macrófagos, las micobacterias son capaces de evadir la maquinaria microbicida innata al inhibir la acidificación del fagosoma y prevenir su futura biogénesis y adquisición de componentes lisosomales. La infección con *M. tuberculosis* puede también generar la inhibición de la apoptosis, por lo tanto, promoviendo el mantenimiento intracelular de la micobacteria. Cuando la respuesta intrínseca celular a *M. tuberculosis* es inadecuada y/o el bacilo se replica el suficiente número de veces dentro de los MA, la célula infectada explota, liberando a las bacterias y permitiendo la infección de células cercanas. La diseminación ocurre cuando la multiplicación del bacilo alcanza un límite de 25 bacterias por célula (Mayer – Barber *et al.*, 2015; Sáenz *et al.*, 2012).

La tuberculosis comúnmente afecta el pulmón. Sin embargo, el tránsito de la bacteria desde el sitio inicial de infección – alveolos pulmonares – a los nódulos linfáticos regionales y a cualquier otra parte tiene dos consecuencias contrastantes. La primera, es que facilita la presentación de antígenos de *M. tuberculosis* dentro de los nódulos linfáticos, esencial para el desarrollo de una respuesta inmune protectora mediada por células T. La segunda, resulta en la diseminación de la bacteria del pulmón a otros órganos permitiendo así el desarrollo de otras formas de la enfermedad, tales como tuberculosis meníngea y miliaria, las cuales son invariablemente fatales sin el tratamiento adecuado (Krishnan *et al.*, 2010).

2.2.2. Respuesta inmune frente a *Mycobacterium tuberculosis*

La respuesta inmune a *M. tuberculosis* es muy compleja (Figura 2), tanto en la periferia (pulmones, nódulos linfáticos, etc.) como en el sistema nervioso central. Los mecanismos innatos, son cruciales en limitar el crecimiento de *M. tuberculosis* en la fase inicial de la infección. Las primeras células en encontrarse con el bacilo son los MA y las células dendríticas de tejido, las cuales reconocen componentes micobacterianos (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPS) mediante PRR, por ejemplo los receptores del complemento (principalmente CR3); toll – like receptors (TLR2, TLR4 y TLR9); receptores de tipo lectina C; receptores de manosa; receptores Fc, receptores scavenger, y receptores de oligomerización de nucleótidos. Las células dendríticas son la conexión entre la respuesta inmune innata y adaptativa en la infección con *M. tuberculosis*. Estas células reconocen PAMPS, principalmente vía DC – SIGN, TLR9 y dectin – 1 (Sáenz *et al.*, 2012). Una vez que las micobacterias han sido fagocitadas por los MA y/o células dendríticas (DC) los péptidos micobacterianos son presentados a las células T ya sea en el contexto del MCH clase II para aquellos péptidos procesados en el fagolisosoma o en el MHC clase I para los péptidos citosólicos. Una presentación cruzada puede llevarse a cabo cuando los macrófagos liberan cuerpos apoptóticos cargados con péptidos micobacterianos los cuales son tomados por las DCs y los péptidos son presentados en moléculas MHC clase II (Kaufmann *et al.*, 2010).

La respuesta inmune adaptativa comienza en los nódulos linfáticos, donde las células dendríticas mieloides presentan antígenos de los bacilos vivos transportados desde los pulmones a las células T. La activación y proliferación de las células T CD4⁺ toma lugar y las células T CD4⁺ se diferencian en células efectoras y de memoria produciendo citocinas tales como IL-2, TNF- α e IFN- γ (Sáenz *et al.*, 2012). Estas células se dirigen rápidamente a los pulmones para arrestar el crecimiento bacteriano y mediar el aclaramiento del patógeno. Esta protección de largo término se mantiene para infecciones subsecuentes. Las células T de memoria tienen varias propiedades únicas relacionadas con su capacidad protectora, tales como la rápida reactivación para llevar a cabo sus funciones efectoras después de la re – exposición a un antígeno, la re – adquisición de capacidad migratoria a órganos linfoides secundarios, alta capacidad proliferativa y la capacidad de persistir sin antígeno. Se espera que la vacunación induzca células T de memoria central, efectora y residentes de tejido que permitan montar una efectiva respuesta inmune protectora con la finalidad de erradicar o contener el bacilo (Khan *et al.*, 2017).

En humanos, el desarrollo de una inmunidad adaptativa a la tuberculosis, la cual es medida como una respuesta a la tuberculina, requiere hasta 5 o 6 semanas después de la infección, mientras que en ratones, la repuesta de células T CD4⁺ requiere un mínimo de 12 días después de la infección por aerosol (Wolf *et al.*, 2008). La iniciación de la respuesta de células T CD4⁺ a *M. tuberculosis* es notoriamente lenta debido a que las primeras células T CD4⁺ llegan a los pulmones de los individuos infectados varias semanas después de la exposición. Este periodo de tiempo entre el establecimiento de la infección y la llegada de células T al sitio de infección comúnmente contribuye a la incapacidad del hospedero de erradicar al organismo por permitir que la bacteria incremente significativamente en número antes que de las células inmunes adaptativas puedan realizar sus efectos protectores (Mayer – Barber *et al.*, 2015).

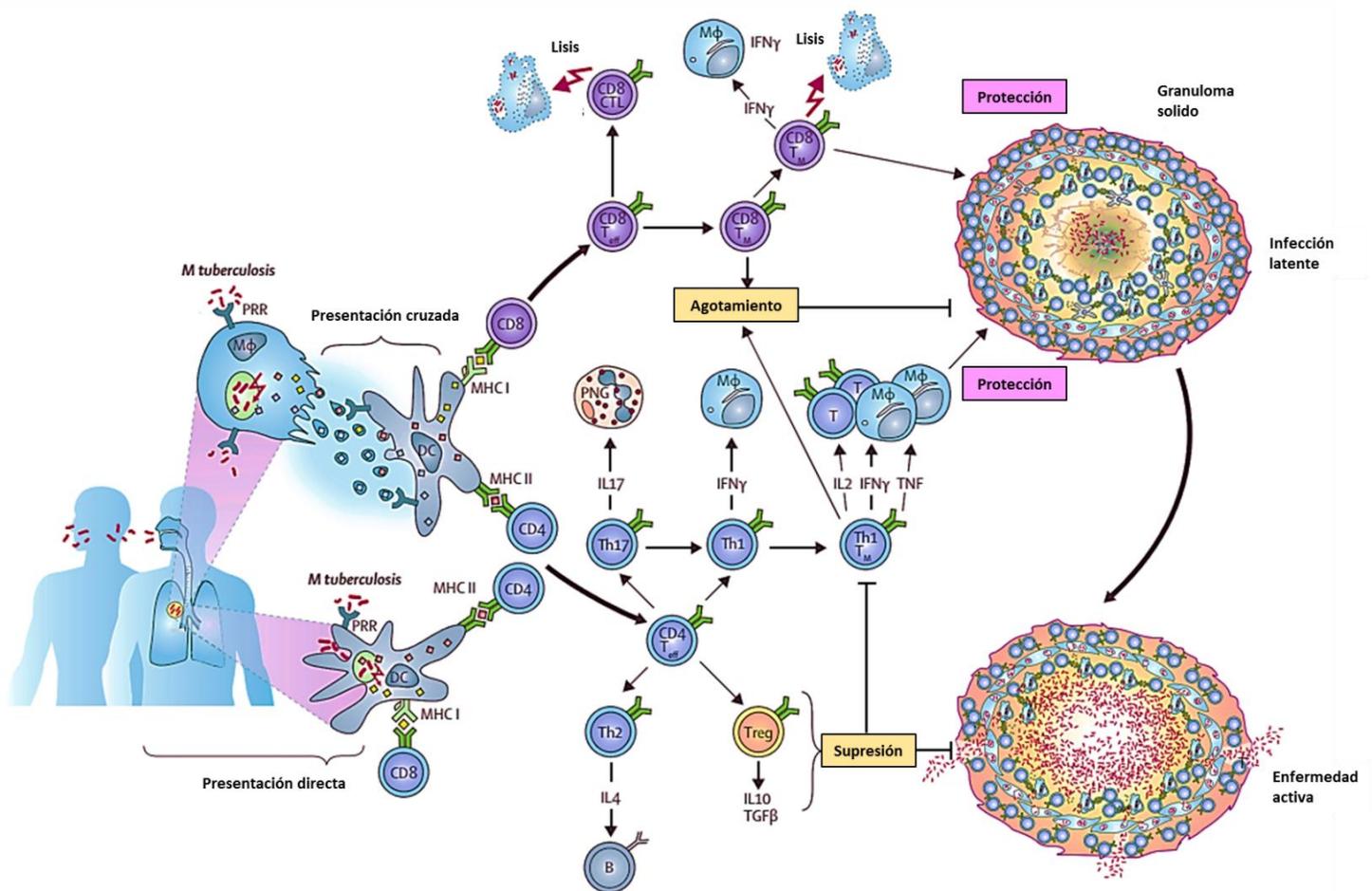


Figura 2.- Respuesta inmune en la tuberculosis. Modificado de Kaufmann *et al.* (2010).

En el caso de la infección con *M. tuberculosis*, hay más células T CD4⁺ que células T CD8⁺ en los sitios de infección, y se ha demostrado que las células T CD4⁺ juegan múltiples papeles en iniciar y propagar la respuesta de células T en modelos animales y casos humanos. Las células T CD4⁺ con fenotipo efector o de memoria efectora juegan un papel principal en controlar a las micobacterias en el sitio de infección y en limitar la progresión de la enfermedad. Algunas de ellas tienen un fenotipo CD44⁺ CD62L^{low}, y producen citocinas tipo T_H1 tales como IFN- γ , TNF- α e IL-12. Estas citocinas efectoras eliminan las células afectadas y controlan la replicación de *M. tuberculosis* (Li *et al.*, 2018). Aunque estas células son cruciales para la protección contra la enfermedad, existen otras estirpes de células T que pueden tener un papel relevante; por ejemplo las células T productoras de IL-17, las cuales median el reclutamiento de células T_H1 al pulmón después del reto con *M. tuberculosis*. Además, la inducción de la expresión de IL-17 incrementa la frecuencia de células T CD4⁺ reguladoras durante la enfermedad activa, ayudando a minimizar el daño en pulmón (Walzl *et al.*, 2011).

La respuesta de las células T CD8⁺ a *M. tuberculosis* es normalmente de una magnitud menor comparada con la respuesta de las células T CD4⁺; sin embargo, las células T CD8⁺ pueden modular la actividad fagocítica o producir moléculas tales como granulosa, que pueden ser directamente citotóxicas para las micobacterias. Similarmente, otras citocinas, en adición a IFN- γ , pueden ser cruciales; por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (TNF) el cual es importante para el establecimiento del granuloma; una colección bien organizada de células innatas y adaptativas que forman una estructura organizada para contener al patógeno (Walzl *et al.*, 2011). Durante la contención activa en el granuloma sólido *M. tuberculosis* se mantiene en un estado latente. Sin embargo, cuando las células entran en un estado de agotamiento o aumenta la actividad de células T_H2 o Treg se favorece el escape de los bacilos del granuloma dando lugar a una enfermedad activa (Kaufmann *et al.*, 2010).

Aunque los mecanismos inmunes mediados por células, predominantemente basados en células T y fagocitos mononucleares, son los elementos clave en la defensa contra *M. tuberculosis* en muchos estadios de infección, en los últimos años ha incrementado la evidencia que sugiere que la inmunidad innata y humoral ejercen también un papel relevante. El papel de los anticuerpos y las células B en la tuberculosis ha sido ignorado, y es menos definido que el de las células T, principalmente basados en la noción de que los anticuerpos anti *M. tuberculosis* son inaccesibles a las bacterias residentes intracelularmente. Sin embargo, diversos estudios han evidenciado que

los isotipos IgM, IgG (subclases IgG1, IgG3) e IgA presentan actividad protectora contra *M. tuberculosis*, sugiriendo que su presencia podría tener algún papel en la protección contra el bacilo (Achkar *et al.*, 2015; Kohama *et al.*, 2008; Temmerman *et al.* 2004).

2.2.2.1. Citocinas asociadas con la tuberculosis

Las citocinas y quimiocinas son críticas para iniciar y coordinar el organizado y secuencial reclutamiento y activación de células a los pulmones de los individuos infectados con *M. tuberculosis*. El correcto reclutamiento y localización celular mononuclear son esenciales para asegurar el control del crecimiento bacteriano sin el desarrollo de inflamación granulocítica dañina. En la mayoría de los individuos la expresión eficiente de inmunidad, vía expresión de citocinas competentes y quimiocinas, resulta en la contención del bacilo. Por lo que resulta crítico el entendimiento de las funciones e interacciones, entre las citocinas y quimiocinas, que permiten la limitación de la enfermedad (Domingo – Gonzáles *et al.*, 2017).

El control inmunológico de la infección con *M. tuberculosis* está basado en una respuesta inmune de tipo celular caracterizada por la producción de citocinas como: IL-2, IL-12, IL-1, IL-18, IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-17. Mientras que la respuesta no protectora se caracteriza por la expresión de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 y TGF- β las cuales antagonizan la respuesta inmune celular permitiendo el desarrollo de la enfermedad. Las diferentes poblaciones celulares y mediadores solubles en su conjunto forman una compleja red de señales que participa en el control de la tuberculosis (Herrera-Barrios MT *et al.*, 2005).

Entre las citocinas protectoras las pro – inflamatorias, IL-1 e IL-18, juegan un papel crítico al inducir la expresión de citocinas reclutadoras de neutrófilos. Así mismo, la expresión de IL-12 tiene relevancia en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa al influir en la función de múltiples células efectoras. Esta citocina se caracteriza por ser un potente inductor de la producción de IFN- γ por linfocitos T y células NK. Además, incrementa la proliferación de linfocitos T CD4⁺, favorece la expansión clonal de los linfocitos T_H1 y aumenta la citotoxicidad de los linfocitos T CD8⁺ (Herrera-Barrios MT *et al.*, 2005). De la misma forma IL-6 puede potenciar la expresión de IFN- γ en el sitio de infección. Esta citocina parece estar asociada con la expresión temprana efectiva de la inmunidad en el pulmón vía la combinación de regulación de la inflamación mononuclear y la rápida acumulación de linfocitos. IL-6 es requerida para la inducción

óptima de respuestas protectoras durante la vacunación debido a que, en su ausencia, tanto las vacunas de subunidad como la de BCG son menos efectivas (Domingo – Gonzáles *et al.*, 2017).

La acción conjunta de IL-6 con IL-23 y TGF β dirigen la diferenciación del subconjunto celular T_H17 que produce IL-17A, IL-17F e IL-22 y. En este contexto IL-23 puede inducir la doble expresión de IL-17 e IFN- γ en células T humanas así como mantener la proliferación de células T de memoria en ratones. La expresión temprana de IL-17 ocurre después de la infección micobacteriana y son producidas principalmente por células T $\gamma\delta$ residentes de pulmón. Esta citocina induce la expresión de genes pro – inflamatorios, proteínas antimicrobianas (defensinas y proteínas S100) y reclutamiento de neutrófilos. La expresión de IL-17 puede ser detectada desde el primer día post – infección con BCG y es dependiente de la expresión de IL-23. Se ha pensado que IL-17 disminuye la expresión de IL-10 por lo tanto permitiendo el incremento de IL-12 el cuál subsecuentemente promueve la producción de IFN- γ . La IL-17 inducida por la vacunación es vital para la inducción de quimiocinas (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) requeridas para la acumulación de células T de memoria, específicas de antígeno, productoras de IFN- γ . Finalmente, la inmunización a través de las mucosas con antígenos de *M. tuberculosis* induce potentes respuestas IL-17 las cuales mejoran la protección de ratones sobre aquella inducida por la vacuna BCG. Interesantemente, en modelos de vacunación por mucosas, IL-17 más que IFN- γ parece tener más importancia en la protección contra *M. tuberculosis*. Se ha observado que las células T de memoria específicas de antígeno e inducidas por la vacunación producen IL-17 así como IFN- γ dentro del pulmón, probablemente como un resultado de la acción de IL-23. En efecto, las células T de memoria pluripotenciales capaces de inducir no solamente IL-17 si no también TNF e IL-2 pueden ser las células T objetivo más apropiadas para la vacunación (Domingo – Gonzales *et al.*, 2017; Torrado *et al.*, 2010).

La función clásica del IFN- γ es la activación de fagocitos mediante la inducción más de 200 genes relacionados con la respuesta inmune, activando funciones tales como: producción de intermediarios de oxígeno y nitrógeno, acidificación del fagosoma, fusión fagosoma – lisosoma, producción de α y β defensinas, incremento de la capacidad fagocítica e incremento en la expresión de MHC clase I y II (Herrera-Barrios MT *et al.*, 2005). El TNF- α también tiene un punto crucial en la tuberculosis debido a que está implicado en la proliferación y diferenciación de células inmunes así como múltiples procesos inflamatorios, incluyendo la migración y apoptosis de células infectadas con *M. tuberculosis*. Aunado a lo anterior, esta citocina es de gran relevancia

en la tuberculosis debido a su participación en el desarrollo del granuloma (Domingo – González *et al.*, 2017).

Entre las citocinas que antagonizan la respuesta inmune a tuberculosis se encuentran IL-4, IL-5 e IL-13 las cuales están asociadas con la respuesta T_H2 , así como con el reclutamiento de eosinófilos, basófilos y el desarrollo de células B productoras de anticuerpos. Durante la tuberculosis, los niveles de IL-4 son muy variables en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con tuberculosis. Esta citocina puede influir en los granulomas inducidos por *M. tuberculosis* debido a que su sobre – expresión desvía el granuloma de sus características mononuclear a granulocíticas al acumular eosinófilos dentro de él, sin embargo no tiene un fuerte impacto en la enfermedad. La información referente al papel de la IL-5 e IL-13 en la enfermedad es limitada (Domingo – González *et al.*, 2017). Además, TGF β e IL-10 juegan un papel inhibitorio en la respuesta del hospedero a la infección con *M. tuberculosis*. IL-10 fue inicialmente identificada como un factor inhibidor de la síntesis de citocinas, producido por células T_H2 . Sin embargo, IL-10 puede ser producida por células T_H1 , T_H17 y T_{REG} y sirve para limitar las respuestas inmunes patogénicas. En el contexto de la tuberculosis su producción ha sido encontrada en pacientes con tuberculosis pulmonar y junto con TNF- α puede ser usada para distinguir entre la tuberculosis latente y pulmonar (Jasenosky LD *et al.*, 2015). En adición, un incremento en la acumulación de T_{REG} que expresan IL-10 se correlaciona con un incremento en la carga bacteriana y tuberculosis severa. Esta citocina puede inhibir aspectos de la activación de macrófagos mediada por IFN- γ , disminuir la producción de IL-12 e inhibir el tráfico de las DC a los nódulos linfáticos para la activación de células T. IL-10 además limita las respuestas de IFN- γ e IL-17 y disminuye la protección frente a la infección con *M. tuberculosis* inducida por vacunas (Domingo – González *et al.*, 2017).

Un factor crítico en la contención de la tuberculosis es el óptimo desarrollo de una respuesta celular. La activación de células T en respuesta a un antígeno permite la expresión, de manera simultánea, de dos o más citocinas. Estas células T poli – funcionales son consideradas superiores a aquellas que producen únicamente una citocina. El prototipo deseable de células T poli – funcionales son aquellas que expresan IFN- γ , TNF- α e IL-2, indicando su capacidad proliferativa y efectora. Entre los estudios que han examinado la actividad de células T $CD4^+$ tri – funcionales, en comparación con las mono – o bi – funcionales, en la infección con *M. tuberculosis*, han reportado que la tuberculosis activa está asociada con elevada frecuencia de

células T CD4⁺ con una función única o dual, particularmente de TNF- α o TNF- α /IFN- γ . En contraste, las personas con infección latente exhiben altas frecuencias de células T CD4⁺ trifuncionales las cuales expresan TNF- α /IFN- γ /IL-2 (Jasenosky LD *et al.*, 2015).

2.3. Antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*

En los últimos años, un amplio panorama de antígenos de *M. tuberculosis* reconocidos por células T humanas han sido descubiertos, incluyendo proteínas, lipoglucanos y lipoproteínas que son procesados y expuestos por células presentadoras de antígenos en el contexto de varias plataformas de presentación. Estas pueden ser a través de las moléculas MHC clase I, MHC clase II, MHC Ib o las isoformas CD1. De relevancia en el desarrollo de pruebas de inmunodiagnóstico y evaluación de candidatos a vacunación es la inducción de una fuerte respuesta de células T CD4⁺ tipo T_H1 que produzcan IFN- γ . Las herramientas bioinformáticas han permitido la identificación, en el genoma de *M. tuberculosis*, de nuevos antígenos proteicos y epítopes inmunodominantes para diferentes formas de presentación. Con base en estos análisis se han pre – seleccionado, del proteoma completo de *M. tuberculosis*, aproximadamente 4 000 marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) candidatos a epítopes. Sin embargo, es pertinente tomar en cuenta la complejidad del proteoma, dado que las estructuras proteicas primarias pueden ser modificadas post – traduccionalmente. Estas modificaciones post – traduccionales (PTM) son eventos de procesamiento covalente que químicamente modifican la estructura proteica, a menudo catalizados por enzimas específicas de sustrato, e influyen en el estado activo de las proteínas, su compartimentalización, recambio y/o interacción con otras moléculas. Algunos ejemplos de PTM y las proteínas que las presentan son observados en la tabla 2 (van Els *et al.*, 2014).

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado el potencial inmunogénico de proteínas modificadas post traduccionalmente, tales como Apa, Esat – 6 y HBHA, debido al papel que juegan en la inducción de respuestas tanto celulares como humorales por lo que el conocimiento del papel preciso de las PTM de los candidatos a vacunación de *M. tuberculosis* puede ser de gran ayuda para optimizar su estudio y para simplificar el diseño de vacunas y el proceso de su desarrollo (Aagaard *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2003; Temmerman *et al.*, 2004; van Els *et al.*, 2014).

Tabla 2.- Modificaciones post – traduccionales (PTM) en el proteoma de *M. tuberculosis*.

Modificado de van Els AC *et al* (2014)

PTM	Aminoácidos modificados	Función	Proteínas de <i>M. tuberculosis</i> que presentan dicha PTM
O – glucosilación	Ser, Thr	Patogénesis Señuelo inmunológico	Apa/Rv1860 Mpt83/Rv2873 19 kDa LpqH/Rv3763 38 kDa PstS1/ Rv0934 SodC/Rv0432
Fosforilación	Ser, Thr, Tyr	Regulación	301 proteínas
Metilación	Lys, Arg, Gln, Glu	Resistencia a proteasas	HBHA/Rv0475 LBP/Rv2986c
Acetilación	Ser, Thr, Lys	Estabilidad Compartimentalización	Esat – 6 (Thr – N terminal)
Lipidación	Cys, Ser, Thr,	Compartimentalización Anclaje a membrana	99 lipoproteínas tentativas y 42 lipoproteínas
Deaminación	Asn, Gln	Regulación de interacciones proteína - ligando	Pup/Rv2111c
N - formilación	Met	Inicio de la síntesis proteica bacteriana	Rv0476 Rv0277C Rv0749 Rv1686C
Pupilación	Lys	Señal de degradación (reversible)	1, 305 proteínas

2.4. Adhesina hemaglutinina de unión a heparina (HBHA)

La adhesina hemaglutinina de unión a heparina (HBHA por sus siglas en inglés) es una proteína presente en *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. ulcerans*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. sp* JDM601, *M. intracellulerae*, *M. rhodesiae*, *M. abscessus*, *M. marinum*, *M. leprae* y *M. smegmatis*. Además de las micobacterias, se ha reportado la presencia de esta proteína en otras bacterias aerobias no esporulantes, gram positivas, como *Rhodococcus erythropolis*, *Clavibacter michiganensis* y *Nocardia farcinica*, los cuales tienen cercanía taxonómica con las micobacterias (Abhinav *et al.*, 2013).

La HBHA de *M. tuberculosis* fue descrita por primera vez en 1996 por Menozzi *et al.*, quienes describieron su papel en la aglutinación de eritrocitos de conejo y en la promoción de la agregación bacteriana *in vitro*. Esta proteína de 199 residuos, con un peso de 21 470 Da, consiste de tres dominios; uno transmembranal (residuos del 12 al 29) en el extremo N terminal; un dominio central con estructura en alfa helice (residuos del 29 al 109), el cual está involucrado en la dimerización de la proteína en solución y promoción de la aglutinación bacteriana; y un dominio carboxilo terminal (residuos 160 – 199) rico en repeticiones de lisinas, prolinas y alaninas (KKAAPA y KKAAAKK) involucrado en la unión, mediante fuerzas electrostáticas, a azucares heparán sulfato en la superficie de células epiteliales respiratorias (Abhinav *et al.*, 2013; Esposito *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2017; Morandi *et al.*, 2013).

Estudios previos realizados por Pethe *et al* (2002) y Fukui *et al* (2015) demostraron que la proteína HBHA posee PTM que no son llevadas a cabo cuando la proteína es producida en forma recombinante en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. Estas modificaciones consisten de un complejo patrón de metilación de los residuos de lisina dentro del dominio de unión a glucosaminoglucanos sulfatados y es llevada a cabo por metiltransferasas localizadas en la pared micobacteriana (Host *et al.*, 2007). Análisis bioquímicos indicaron que la HBHA nativa (nHBHA) purificada de *M. tuberculosis* comprende una mezcla compleja de isoformas que pueden contener de 20 a 26 grupos metilo dispuestos en mono o di – metilaciones en las lisinas de los residuos del 163 al 195 (Host *et al.*, 2007; Pethe *et al.*, 2002), tal como se observa en la Figura 3.

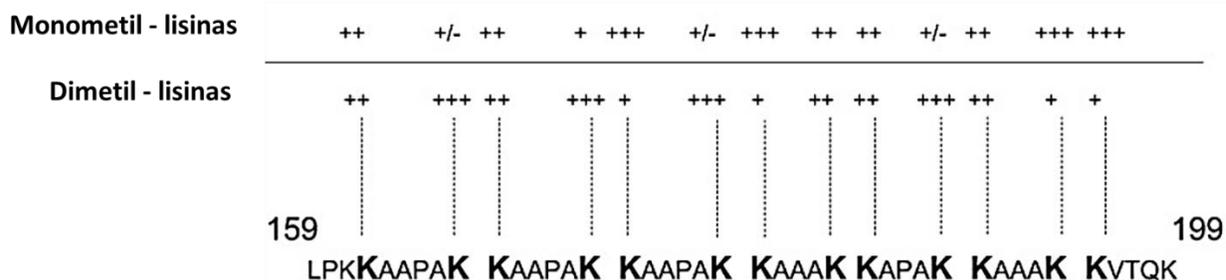


Figura 3. Patrón de distribución de las mono y dimetil – lisinas dentro del dominio carboxilo terminal de la nHBHA de *M. tuberculosis* (cepa 103). Los símbolos (±) indican la prevalencia de los tipos de metilación asociados con cada residuo de lisina. Modificada de Pethe *et al.* (2002).

Para muchas proteínas que son metiladas post – traduccionalmente el papel de la metilación es incierto. Una hipótesis interesante sugerida por Pethe *et al.* (2002) es que la metilación de la HBHA expuesta en superficie protege esta proteína contra proteasas (tales como tripsina) presentes en las vías aéreas, el portal natural de entrada de micobacterias patogénicas, favoreciendo el establecimiento del bacilo en los alvéolos pulmonares. Así mismo, se ha demostrado que la unión de HBHA a los azúcares de las superficies celulares se asocia con la inducción de; endocitocitosis mediada por receptor, a través del reconocimiento de proteoglicanos sulfatados por el dominio carboxilo de la adhesina; transición epitelial; y unión a la proteína C3 del complemento, lo cual media la adhesión y fagocitosis del patógeno por fagocitos mononucleares. Por lo tanto la HBHA media tres funciones críticas: adherencia a células epiteliales, diseminación extrapulmonar y establecimiento de la patogénesis (Abhinav *et al.*, 2013).

La proteína HBHA se ha denominado como un antígeno de latencia debido a que estudios realizados por Temmerman *et al.* (2004) mostraron que nHBHA induce la producción de IFN – γ tanto por esplenocitos de ratones infectados con BCG como por células mononucleares de sangre periférica de individuos con tuberculosis latente. Dicho efecto es dependiente de la presencia de metilaciones. Además estudios como los realizados por Temmerman *et al.* (2004) y Parra *et al.* (2004) evidenciaron la inmunidad protectora inducida por la nHBHA metilada mediante la disminución de unidades formadoras de colonias, en pulmones y bazo de ratones vacunados con la proteína y retados con *M. tuberculosis*, a un nivel comparable con la protección ofrecida por la vacunación con BCG. Aunado a lo anterior se demostró la producción de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b que reconocen a la HBHA en el suero de los ratones inmunizados con la proteína. La producción de anticuerpos y la secreción de IFN- γ por células de ratones inmunizados en respuesta a la proteína también han sido demostrados por otros estudios en los que utilizan vacunas de ADN con el gen HBHA (Zhao *et al.*, 2012).

3. Antecedentes

La proteína HBHA ha sido identificada como un factor de virulencia involucrado en la diseminación extrapulmonar y diversos estudios han demostrado su potencial como inductor de una respuesta inmune en sujetos infectados con *M. tuberculosis*. Estudios en humanos infectados con *M. tuberculosis*, como los realizados por Masungi C. *et al.* (2002), Temmerman S. *et al.* (2004) y Zanetti S. *et al.* (2005), demostraron la presencia en suero de anticuerpos dirigidos contra la HBHA, siendo mayor para el caso de los individuos con tuberculosis latente en comparación con aquellos con tuberculosis activa, indicando que esta proteína es inmunogénica en humanos durante la infección natural.

La proteína nHBHA se caracteriza por la presencia de MPT, tal como fue demostrado por Pethe *et al.* (2002) los cuales evidenciaron la presencia de metilaciones en las lisinas del extremo carboxilo y plantearon su papel potencial en la protección frente a la proteólisis. Además estudios como los realizados por Host *et al.* 2007, Parra *et al.*, 2004, Temmerman *et al.* 2004 y Zanetti *et al.* 2005 evidenciaron que la presencia de esta MPT, es clave para la inducción de inmunidad protectora contra el reto de la cepa virulenta de *M. tuberculosis* en ratones y para el reconocimiento por las células T y B de sujetos infectados con el bacilo. La protección ofrecida por la HBHA fue evidenciada por la disminución del conteo bacteriano en pulmones y bazo de ratones vacunados con la proteína e infectados con bacilos de *M. tuberculosis*, a un nivel comparable a la protección inducida con la cepa de vacunación BCG. Además, como fue observado con humanos infectados naturalmente, la vacunación de ratones con HBHA indujo una respuesta de IFN- γ específica de la proteína tanto en células T CD4⁺ como en células T CD8⁺, así como actividad bactericida y citotóxica mediada por células T CD8⁺.

Sin embargo, dado el lento crecimiento, las estrictas condiciones de cultivo y la dificultad en la purificación de la nHBHA de *M. tuberculosis* o *M. bovis* BCG diversos grupos de trabajo (Delogu *et al.* 2004; Kohama *et al.* 2008, Temmerman *et al.* 2004 y Parra *et al.* 2004) han intentado aumentar el rendimiento y alcanzar la eficacia obtenida mediante la vacunación de ratones con la nHBHA de *M. tuberculosis* por medio de su expresión en diferentes modelos biológicos, tales como *P. pastoris*, *E. coli* y *M. smegmatis*. Aunque, no se ha observado una protección en ratones frente al reto con *M. tuberculosis* después de la vacunación con dichas proteínas, a diferencia de lo observado con la nHBHA. Dichos autores atribuyeron la ausencia de protección en ratones a la ausencia de MPT en las proteínas expresadas en *E. coli* y *P. pastoris* o a la diferencia del

patrón de metilación de la HBHA expresada en *M. smegmatis* con respecto a la nHBHA. Por lo anterior, Vallecillo *et al.* 2017 (datos no publicados) expresaron la proteína HBHA en *Rhodococcus erythropolis*; un modelo biológico capaz de metilar *in vitro*, con cercanías taxonómicas con *M. tuberculosis* y que además posee una proteína análoga a la HBHA. Por lo que en el presente trabajo nos plantearemos evaluar primero su papel en la inducción de la respuesta inmune para posteriormente y en una segunda fase del trabajo evaluar su capacidad protectora en ratones ante un reto con *M. tuberculosis*,

4. Planteamiento del problema

La tuberculosis es la principal causa de mortalidad mundial debido a un solo agente infeccioso. Debido a las altas cifras de mortalidad y morbilidad reportadas recientemente por la OMS, la comorbilidad con el VIH, el surgimiento de cepas multiresistentes a los fármacos de uso clínico y la inefectiva protección de la vacuna *M. bovis* BCG en tuberculosis pulmonar adulta, hace esencial el desarrollo de nuevas estrategias profilácticas que permitan a los individuos infectados con *M. tuberculosis* montar una respuesta inmune protectora que impida el desarrollo o reactivación de la enfermedad. La proteína nHBHA ha sido propuesta recientemente como un candidato para el desarrollo de vacunas anti – tuberculosis debido a su potencial en la estimulación del desarrollo de una respuesta inmune humoral y celular en ratones y humanos, así como la protección ofrecida en modelos murinos frente al reto con micobacterias infectivas posterior a la vacunación con la proteína. Debido a la importancia de la metilación biológica de la proteína HBHA en la inducción de una inmunidad protectora y a la complejidad de extracción y purificación de nHBHA, en nuestro laboratorio, Vallecillo *et al.* (2017) clonaron y expresaron en una cepa de *R. erythropolis* L88, transformada con el plásmido inducible por thioestrepton pTip – QC1- HBHA, a la proteína modificada post – traduccionalmente con grupos metilo (rHBHA – RE). Debido al rápido crecimiento y facilidad de manejo de *R. erythropolis* en comparación con *M. tuberculosis* o *M. bovis* BCG resulta de interés determinar la actividad inmunológica inducida por la vacunación con la rHBHA – RE en modelos murinos inmunizados con ella. De la misma forma, la comparación de la inmunidad inducida por la proteína sin metilaciones expresada en *E. coli* (rHBHA – EC) con la rHBHA - RE metilada permitirá conocer la relevancia de la presencia de estas PTM en la inducción de una respuesta inmune que pueda proteger a los ratones frente al reto con *M. tuberculosis*.

5. Objetivo general

Evaluar y comparar la respuesta inmune humoral y celular inducida en ratones BALB/c por la inmunización intranasal, subcutánea e intraperitoneal con la adhesina hemaglutinina de unión a heparina (HBHA) de *Mycobacterium tuberculosis*, expresada en *Rhodococcus erythropolis* y *Escherichia coli*, en presencia de los adyuvantes dodecil dioctadecil amonio (DDA) y monofosforil lípido A (MPL).

6. Objetivos particulares

- Obtener las proteínas recombinantes HBHA de *Rhodococcus erythropolis* y *Escherichia coli*.
- Determinar la presencia de metilaciones en la proteína HBHA expresada en *Rhodococcus erythropolis*.
- Evaluar *in vitro* el efecto citotóxico de las proteínas recombinantes HBHA.
- Inmunizar a ratones BALB/c por la vía intranasal, subcutánea e intraperitoneal con las proteínas recombinantes HBHA.
- Evaluar la respuesta inmune humoral que induce la inmunización con las proteínas recombinantes HBHA.
- Determinar y comparar la inducción de citocinas y la proliferación de linfocitos T *in vitro* en los ratones inmunizados por la vía intranasal y subcutánea con las proteínas recombinantes HBHA.

7. Hipótesis

La evaluación de la respuesta inmune humoral y celular en animales inmunizados con las proteínas recombinantes HBHA metilada y no metilada mostrará diferencias en el título de anticuerpos inducidos, la concentración de citocinas y la proliferación celular de linfocitos, siendo mayor para el caso de los ratones inmunizados con la proteína metilada expresada en *Rhodococcus erythropolis*.

8. Materiales y método

8.1. Extracción y purificación de proteínas HBHA recombinantes

Las proteínas HBHA recombinantes fueron obtenidas a partir de las bacterias transformadas previamente por Vallecillo AJ *et al* (2017): *Rhodococcus erythropolis* L88 transformada con el plásmido inducible por thioestrepton pTip – QC1- HBHA y *Escherichia coli* Rosetta (DE3) transformada con el plásmido inducible por IPTG pET - 15B – HBHA.

Para la extracción de las proteínas de *R. erythropolis* se llevó a cabo el crecimiento de la bacteria en medio sólido Luria – Bertaini (LB)/cloranfenicol 34 µg/mL (CNF) y se incubó por 72 h a 26 °C. A partir de una colonia aislada se llevó a cabo un precultivo en medio líquido LB/CNF y se dejó crecer 48 h a 26°C, 200 rpm. Trascorridas las 48 h se realizó una dilución 1:100 a partir del precultivo en 1 L de medio LB/CNF y se dejó incubar 24 h a 26°C, 200 rpm, después de lo cual se adicionó thioestrepton 1 µg/mL para inducir la expresión de la proteína y se dejó a 200 rpm, 18 h a 26°C. La biomasa fue colectada por centrifugación a 3 376 RCF durante 15 min a 4°C y la proteína fue obtenida por 6 ciclos de sonicación en hielo. Una vez centrifugado y descartado el sobrenadante se realizaron dos lavados con PBS/Triton x100 2% y uno con PBS, el botón celular, correspondiente a la fracción insoluble, fue almacenado a -70°C hasta su uso.

Para la extracción de las proteínas de *E. coli* se llevó a cabo el crecimiento de la bacteria en medio sólido Luria – Bertaini (LB)/ carbenicilina 100 µg/mL (CBN) y se incubó por 12 h a 37 °C. A partir de una colonia aislada se llevó a cabo un precultivo en medio líquido LB/ CBN y se dejó crecer toda la noche a 37 °C, 200 rpm. Posteriormente se realizó una dilución 1:100 a partir del precultivo en 1 L de medio LB/ CBN y se dejó incubar 2:30 h a 37°C, 200 rpm, después de lo cual se adicionó isopropil – β – D – 1 – tiogalactopiranosido (IPTG) 250 µM/mL para inducir la expresión de la proteína y se dejó a 200 rpm, 3 h a 37 °C. La biomasa fue colectada por centrifugación a 3 376 RCF durante 15 min a 4°C y la proteína fue obtenida por seis ciclos de

sonicación en hielo. Una vez centrifugado y descartado el sobrenadante se realizaron dos lavados con PBS/Triton x100 2% y uno con PBS, el botón celular, correspondiente a la fracción insoluble, fue almacenado a -70°C hasta su uso.

En ambos casos la purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad con la columna de Ni²⁺ – NTA a partir de la fracción insoluble que contenía a la proteína HBHA marcada con tallo de histidinas. El material unido fue eluido por un gradiente de Imidazol, en Urea 8 M, Tris – HCl 150 mM, NaCl 100 mM (pH 8), y dializado. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS – PAGE 12%, transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie. La cuantificación fue realizada con el kit BSA Protein Assay (Thermo Fisher)

8.2. SDS – PAGE y Western Blot

La expresión de las proteínas HBHA recombinantes fue evaluada en un Western Blot con los anticuerpos anti Hexahistidina (anti – His6 – HRP) (Roche) y un anticuerpo policlonal obtenido previamente en el laboratorio por Cohen I (2014)(datos no publicados) en conejos inmunizados con 25 µg de la proteína HBHA recombinante expresada en *E. coli* (pAb – conejo – anti HBHA). Para su realización, las proteínas fueron separadas por SDS – PAGE al 12% y posteriormente transferidas a membranas de PVDF las cuales fueron incubadas 2h a temperatura ambiente con PBS 1x/Tween20 0.05% (PBST)/ BSA 3%. Posterior al lavado con PBST fueron incubadas, a temperatura ambiente durante 1 h en PBST – BSA, con los respectivos anticuerpos utilizados en una dilución 1:1000 para anti – His6 – HRP (Roche) y 1:2000 para pAb – conejo – anti HBHA. Las membranas incubadas con el pAb – conejo – anti HBHA fueron lavadas con PBST e incubadas con proteína A (HRP) 1: 2000 en PBST - BSA durante 1 h en agitación. Todas las membranas fueron lavadas con PBST y reveladas con 3,3 –diaminobenzidina (DAB) (Hach) y H₂O₂.

8.3. Detección de mono y dimetil lisinas en rHBHA – RE por quimioluminiscencia

Para evaluar la presencia de grupos metilo en las lisinas de la proteína HBHA expresada en *R. erythropolis* la membrana de PVDF, donde fue transferida la proteína, fue bloqueada por 1h con PBST/leche 3%, después de lo cual fue lavada con PBST. Posteriormente, la membrana fue incubada con el anticuerpo Anti – mono/dimetil – Lys – HRP (Thermo Fisher) 1:500 en PBST/leche 3% toda la noche en agitación a 26°C. Transcurrido dicho tiempo la membrana fue

lavada con PBST y revelada por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher).

8.4. Determinación de la masa molecular de rHBHA – RE por MALDI TOF

La masa molecular de rHBHA – RE fue determinada por MALDI – TOF en el Instituto de Química de la UNAM, 0.8 µg de la proteína rHBHA – RE (0.8 µg) fueron diluidos en un buffer de NH₄HCO₃ 100 mM – NaCl 50 mM (pH 8) y posteriormente colocada en una matriz conformada por ácido sinapínico saturado, agua destilada, acetonitrilo y TFA. La detección de las masas fue llevada a cabo en un intervalo de 1000 a 100 000 Da en el Bruker Daltonics Microflex Nitrogen Laser Spectrometer a 377 nm. Los parámetros usados fueron modo linear positivo, fuerza de ionización de 20 KV y 600 disparos.

8.5. Ensayo de toxicidad de HBHA hacia células Vero, A549 y RAW264.1

Las células Vero, A459 y RAW 264.7 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con L- glutamina suplementado con 10% SFB, 1% de aminoácidos no esenciales y antibióticos/antimicóticos (penicilina 10 000 U/mL, estreptomina 10 000 µg/mL y fungizona 25 µg/mL). Diez mil células por pozo fueron incubadas 24h en 100 µL de medio RPMI en una placada de 96 pozos. Posteriormente las células fueron lavadas y 200 µL de nuevo medio fresco fue adicionado con las respectivas concentraciones de proteínas o adyuvantes colocados por fila en diluciones seriales: 1 – 0.01 µg de proteína, 2.5 – 0.025 µg de DDA y 0.25 – 0.0025 µg de MPL. La placa fue incubada durante 48 h a 37°C, 5% de CO₂. La lectura de viabilidad celular fue evaluada por reducción de MTT. Brevemente, 10 µL de MTT 5mg/mL fue adicionado a cada pozo de la placa y ésta fue re – incubada por 4 h. El medio fue removido y 100 µL de DMSO fue utilizado para solubilizar el formazan. La absorbancia fue determinada a 570 nm y la citotoxicidad fue calculada como $\% = (1 - (\text{Abs}_{\text{muestra}}/\text{Abs}_{\text{control}})) \times 100$.

8.6. Preparación de BCG (Phipps) para inmunización

La cepa de vacunación BCG (Phipps) fue sembrada por aislamiento en agar 7H11/OADC a partir de una alícuota almacenada en nitrógeno líquido. La placa fue incubada a 37°C hasta el crecimiento de colonias aisladas. Una de las colonias fue transferida a 25 mL de caldo 7H9/ADC/Glicerol 0.05%/Tiloxapol 0.02% y cultivada a 37°C en agitación (200 rpm) hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.4. Se generaron alícuotas de 4 mL (lote de trabajo) que se almacenaron

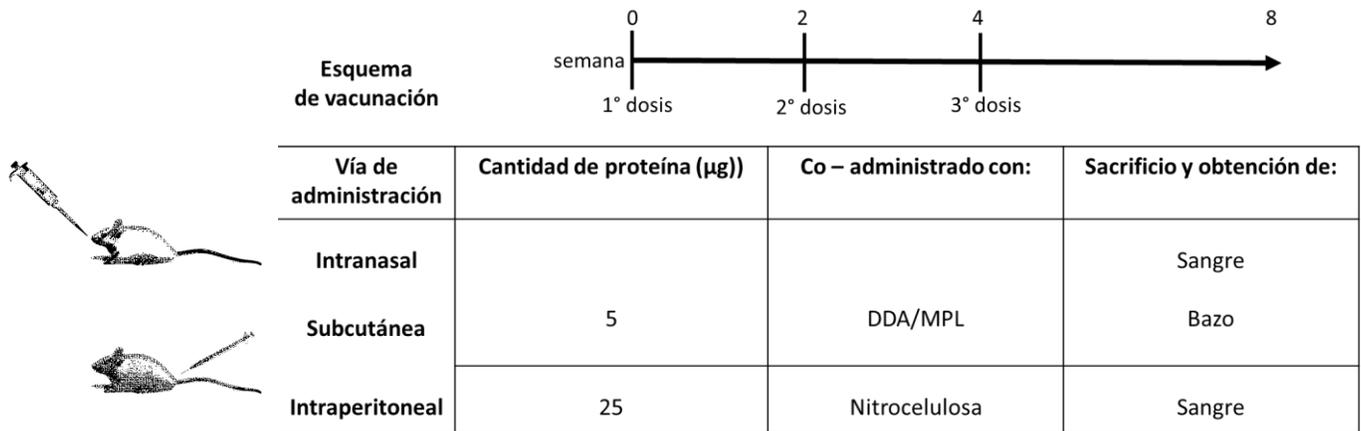
a -70°C hasta su uso. A partir de una alícuota se llevó a cabo un cultivo en 100 mL de caldo 7H9/ADC/Glicerol 0.05%/Tiloxapol 0.02% el cuál fue incubado a 37°C en agitación (200 rpm) hasta alcanzar una OD600 = 0.6. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada fue alicuotado y almacenado a -70°C hasta su utilización (lote de UFC). A partir de una alícuota de 1 mL se llevaron a cabo diluciones seriales en agar 7H11/OADC para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC).

8.7. Inmunización de ratones BALB/c con proteínas recombinantes HBHA

La inmunización subcutánea, intranasal e intraperitoneal se llevó a cabo en hembras BALB/c de 6 a 8 semanas, se utilizaron 3 ratones por grupo experimental. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los cuatro grupos experimentales evaluados para el caso de las dos primeras vías de inmunización fueron: 1) control negativo con PBS, 2) control positivo inmunizado con BCG (5 x 10⁵ UFC para la inmunización subcutánea y 7 x 10⁵ UFC para la intranasal), 3) proteína metilada rHBHA expresada en *R. erythropolis* / DDA 250 µg / MPL 25 µg y 4) proteína no metilada rHBHA expresada en *E. coli* / Polimixina B 2 µg/mL/ DDA 250 µg / MPL 25 µg. Para el caso de la inmunización intraperitoneal se evaluaron los siguientes grupos: 1) control negativo con nitrocelulosa, 2) control positivo inmunizado con BCG (7 x 10⁵ UFC), 3) proteína metilada rHBHA expresada en *R. erythropolis*/nitrocelulosa y 4) proteína no metilada rHBHA expresada en *E. coli* /nitrocelulosa. El esquema de vacunación se muestra en la tabla 3, para ello se realizaron tres inmunizaciones con un intervalo de dos semanas entre cada administración, a excepción de BGC la cual fue aplicada como dosis única y cuatro semanas después de la última inmunización los ratones fueron anestesiados y sacrificados por punción cardiaca para la obtención de sangre y bazo.

Para la inmunización intranasal y subcutánea se administraron 5 µg de proteína, mientras que para la intraperitoneal se utilizaron 25 µg. El PBS y las proteínas para el caso de la inmunización intranasal y subcutánea fueron previamente filtrados por membranas de 0.2 µM. Para el caso de la inmunización intraperitoneal las proteínas fueron resueltas en gel nativo SDS – PAGE 12%, transferidas a membrana de nitrocelulosa y luego digeridas con DMSO y buffer de carbonatos (Na₂CO₃ 693 mM, NaHCO₃ 278 mM, pH 9.6) para finalmente ser resuspendidas y administradas en PBS 1x. La inmunización subcutánea se llevó a cabo en la base de la cola con un volumen total de 100 µL, la intraperitoneal fue colocada por la parte inguinal en un volumen de 100 µL y la intranasal fue aplicada en las narinas en un volumen total de 40 µL.

Tabla 3.- Esquema de inmunización y administración de las proteínas rHBHA a los ratones BALB/c.



8.8. Identificación de anticuerpos producidos en ratones inmunizados con HBHA

El análisis de anticuerpos específicos de HBHA presentes en los sueros de ratones inmunizados con cada proteína recombinante se realizó mediante una prueba de ELISA. Las placas MaxiSorp de 96 pozos fueron recubiertas toda la noche en agitación a 4°C, con 100 µL de PBS 1x a una concentración proteica de 5 µg/mL. Las proteínas a evaluar fueron rHBHA expresada en *R. erythropolis* y rHBHA expresada en *E. coli*. Transcurrido dicho tiempo la placa fue lavada por duplicado con PBST y bloqueada con BSA 3% PBST por 1h. Posterior al lavado fueron adicionados 100 µL del pool de sueros de ratón de cada grupo en PBST – BSA 3%. La dilución utilizada fue 1:100 para el caso de los inmunizados por la vía subcutánea e intraperitoneal y 1:50 para los inmunizados por la vía intranasal. Una vez adicionado el suero se incubó 1 h a temperatura ambiente en agitación. Después de lavar de 3 a 5 veces con PBST se adicionaron 100 µL del anticuerpo secundario IgG total – HRP, IgG2b – HRP, IgG1 – HRP e IgM - HRP diluidos 1: 2000 en PBST- BSA3% y se incubaron 1 h en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron de 3 a 5 lavados con PBST y se adicionaron por pozo 100 µL de solución reveladora (1mg OPD/10 mL de amortiguador fosfato citrato 50 mM/ 5 µL de peróxido de hidrógeno). La placa fue incubada 25 min en oscuridad y la reacción fue detenida con 25 µL de ácido sulfúrico 3M. La placa fue leída en el Multiskan GO a 492 nm.

8.9. Obtención de esplenocitos de ratones inmunizados

Una vez realizada la punción cardiaca, el bazo de los ratones de cada grupo a evaluar fue obtenido en condiciones de esterilidad. Las células fueron disgregadas con una malla y colocadas en PBS 1x. La suspensión celular fue centrifugada a 1500 rpm y lavada por duplicado con PBS 1x, los eritrocitos fueron lisados con buffer de lisis RBC 1x (BioLegend) y los esplenocitos fueron lavados y resuspendidos en 3 mL de PBS 1x. El conteo de las células se realizó con cámara de Neubauer a partir de una dilución 1:10 en azul Tripan. Se procedió con el cultivo únicamente en los casos en que se obtuvo un porcentaje de viabilidad mayor o igual a 95%.

8.10. Tinción con CFSE y cultivo de células de bazo de ratones inmunizados

Para el cultivo fueron colocadas 1×10^6 células por pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano. Los esplenocitos obtenidos del paso anterior fueron lavados con PBS 1x a 37 °C y teñidos con CFSE. Brevemente, las células fueron resuspendidas en 1 mL de solución CFSE 5 μ M e incubadas durante 15 min en agitación (100 rpm) a 37°C en oscuridad. La reacción fue detenida con 5 mL de medio RPMI 1640 completo – 10% suero fetal bovino (SFB), las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 3 mL del mismo medio para incubarse en oscuridad 20 min a 37°C sin agitación. Después de centrifugar 5 min a 375 RCF las células fueron resuspendidas en 150 μ L de RPMI 1640 completo – 10% SFB por pozo y fueron colocadas en la placa de 96 pozos. Los diferentes tratamientos fueron agregados en un volumen de 50 μ L por columnas y las muestras de un mismo espécimen fueron colocadas por fila. Los cinco tratamientos a evaluar fueron: 1) control negativo con PBS, 2) control positivo con Concanavalina A (2 μ g por millón de células), 3) bacterias BCG a una multiplicidad de infección de tres bacilos por cada célula, 4) proteína metilada HBHA expresada en *R. erythropolis* y 5) proteína no metilada HBHA expresada en *E. coli* 5 μ g/ Polimixina B 2 μ g/mL. La placa fue incubada durante 5 días a 37°C, 5% CO₂.

8.11. Inmunoensayo multiplex para determinación de citocinas

Los sueros fueron analizados para la detección de 8 citocinas: IFN γ , IL-12p70, IL-2, IL-4, IL-1 β , IL-10, TNF α , IL-17F, usando el kit MILLIPLEX mouse Th17 magnetic bead panel – Immunology multiplex assay (Merk). Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a las instrucciones del kit. Brevemente, los reactivos, muestras y estándares se prepararon de acuerdo a los procedimientos dictados en la hoja técnica. En una placa oscura de 96 pozos se adicionaron a cada pozo de la microplaca 25 μ L de buffer, 25 μ L del cocktail de micropartículas y 25 μ L de

sobrenadante de las células cultivadas en el paso anterior. La placa con la mezcla se incubó toda la noche a 4° en agitación horizontal. Posterior al lavado, se adicionaron 25 µL por pozo de anticuerpos de detección y se incubó la microplaca durante 1 h a temperatura ambiente en agitación horizontal. Una vez transcurrido dicho tiempo y sin retirar el contenido se adicionaron 25 µL de estreptavidina – biotina por pozo y se incubó 30 min en agitación a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados y 150 µL de buffer fue adicionado por pozo para determinar la concentración de citocinas en el equipo Luminex 100/200.

8.12. Evaluación de la proliferación celular por citometría de flujo

Pasado el tiempo de incubación, la placa de 96 pozos fue centrifugada a 1 500 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue almacenado a -70 °C hasta su utilización. Los pozos fueron lavados por duplicado con PBS 1x estéril y las células de cada pozo fueron resuspendidas en 50 µL del anticuerpo CD16/32 1:100 e incubadas en hielo y oscuridad durante 15 min. Lo anterior para bloquear los receptores Fc y evitar uniones inespecíficas. Posteriormente fueron agregados 50 µL de una mezcla que contenía a los anticuerpos CD3 (PE – Cy7), CD4 (PE) y CD8 (APC) utilizados en una dilución 1:100 y la placa fue incubada en hielo y oscuridad durante 15 minutos. Posteriormente la placa fue lavada por duplicado con PBS 1x y las células de cada pozo fueron fijadas con paraformaldehído. Para ello las células fueron resuspendidas en 200 µL de paraformaldehído al 3.5% e incubadas 30 min en hielo y oscuridad. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro Attune Nxt en los canales mostrados en la tabla 4. Los espectros de absorción y emisión son mostrados en la Figura 4. La proliferación fue determinada por la reducción en la cantidad de CFSE detectada, la cual es proporcional a la proliferación estimulada por cada tratamiento.

Tabla 4. Espectros de excitación y emisión de los fluorocromos a utilizar en el citómetro Nxt.

Anticuerpo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Canal
CFSE	488	521	BL1
CD3 – PE – Cy7	488	780/60	YL4
CD4 – PE	488	574/26	YL1
CD8 - APC	633	660	RL1

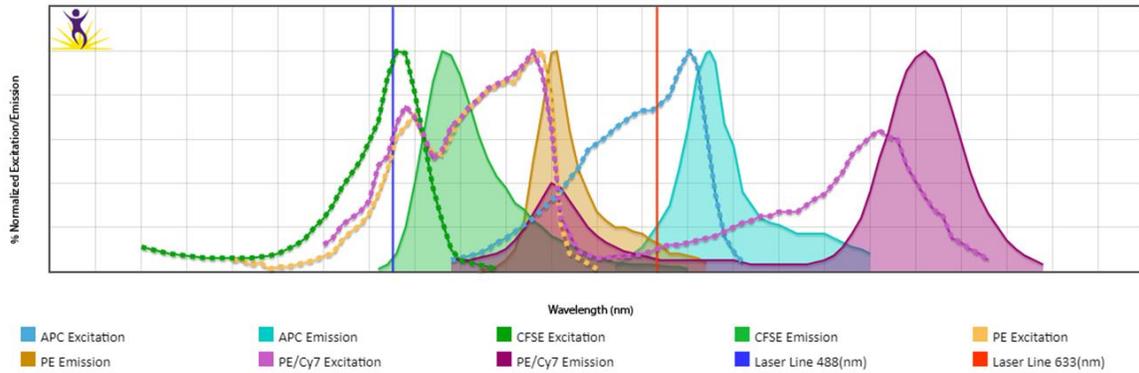


Figura 4. Espectros de absorción y emisión de los anticuerpos CD3 (PE – Cy7), CD8 (APC) y CD4 (PE) excitados por el láser azul (488 nm) o el rojo (633nm)

8.13. Análisis estadístico

Todos los datos son representados como la media \pm desviación estándar. Los datos fueron analizados por Anova de dos vías.

9. Resultados

9.1. Extracción y purificación de proteínas HBHA recombinantes

El rendimiento de las proteínas recombinantes HBHA extraídas de *R. erythropolis* L88 y *E. coli* Rosetta (DE3) es mostrado en la Tabla 5. Ambas proteínas se encontraron presentes tanto en la fracción soluble como en la insoluble.

Tabla 5. Rendimiento de las proteínas rHBHA expresadas en *E. coli* (rHBHA – EC) y *R. erythropolis* (rHBHA – RE)

Proteína	Medio de cultivo	Biomasa	mg totales
rHBHA – EC	1 L de LB/carbenicilina	6.2 g	50 mg
rHBHA - RE	1 L de LB/cloranfenicol	5.4 g	18 mg

Durante la purificación por columna de Ni²⁺/NTA las proteínas fueron eluidas a una concentración entre 40 – 120 mM de Imidazol para el caso de rHBHA – RE (Figura 5, A) y de 120 – 200 mM para el caso de rHBHA – EC (Figura 5, B). La pureza de las proteínas recombinantes teñidas con azul de Coomasie se muestra en la figura 6.

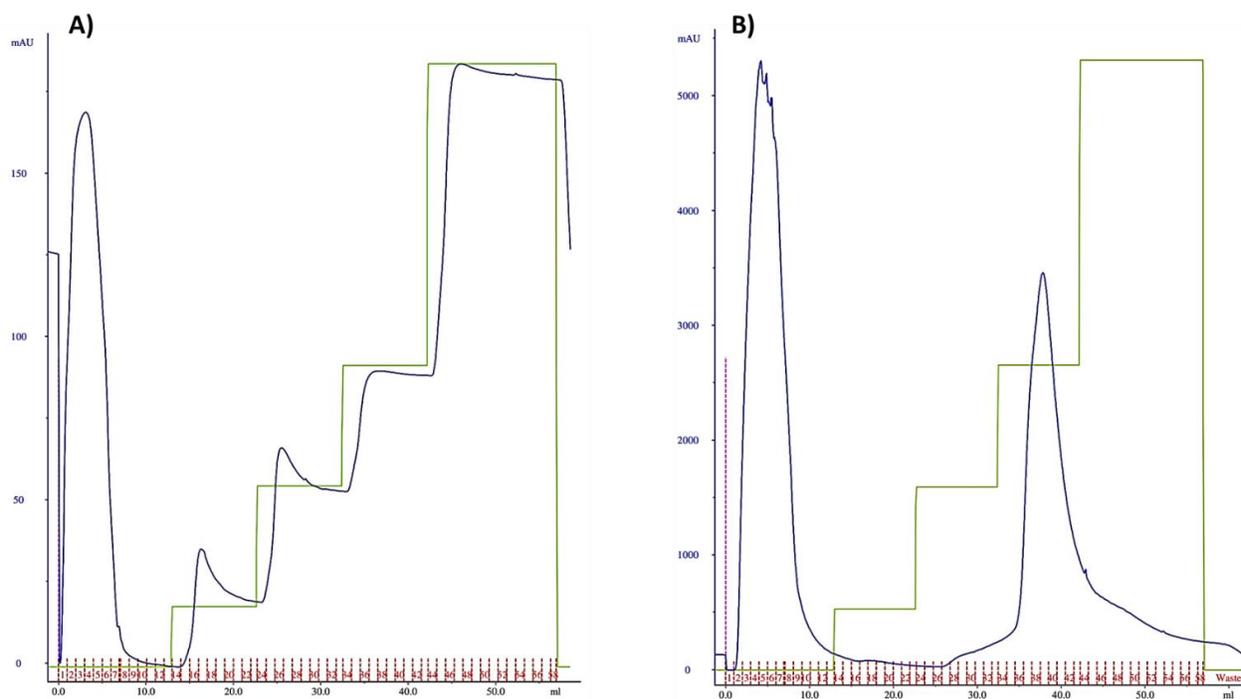


Figura 5.- Cromatogramas de la purificación de las proteínas HBHA recombinantes expresadas en A) *R. erythropolis* y B) *E. coli*. La línea azul corresponde a la absorbancia detectada en función de la proteína presente en cada fracción mientras que la línea verde corresponde al aumento en la concentración de Imidazol utilizado durante la fase de elusión.

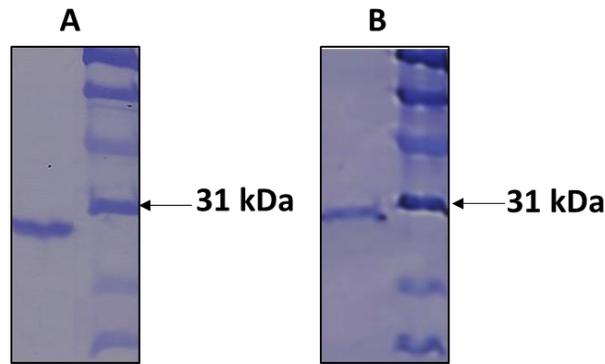


Figura 6.- SDS –PAGE de proteínas recombinantes HBHA obtenidas de *R. erythropolis* (A) y *E. coli* (B).

9.2. Western Blot y detección de lisinas metiladas en rHBHA – RE

Ambas proteínas HBHA recombinantes fueron reconocidas por los anticuerpos anti – His6 – HRP y pAb – conejo – anti HBHA, mientras que el anticuerpo anti – mono/dimetil – Lys – HRP reconoció únicamente a la rHBHA expresada en *R. erythropolis*, como puede observarse en la Figura 7. En el caso de rHBHA – EC se observaron tres bandas de diferente peso reconocidas tanto por el anticuerpo pAb – conejo – anti HBHA.

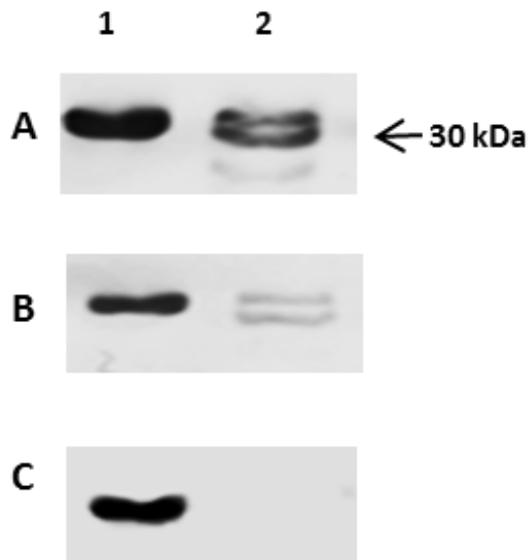


Figura 7.- Proteínas purificadas rHBHA – RE (carril 1) y rHBHA – EC (carril 2) detectadas por con pAb – conejo-anti HBHA (A), anti - His6 – HRP (B) y con anti – mono/dimetil – Lys – HRP (C).

9.3. Determinación de la masa molecular de rHBHA – RE por MALDI TOF

En la Figura 8 se muestra el espectro de masas de la proteína y se observa la presencia de un pico mayor de 22 828.181 Da que corresponde a la proteína rHBHA – RE. Este peso incluye a la proteína modificada con los residuos de aminoácidos (Met, Gly) resultantes de la clonación, la adición de un tallo de 6 histidinas y el peso teórico de la HBHA (21 475. 39 Da). Por lo tanto, el peso correspondiente a las PTM de la proteína es de 341.6 Da, lo que corresponde a la adición de 24.4 grupos metilo.

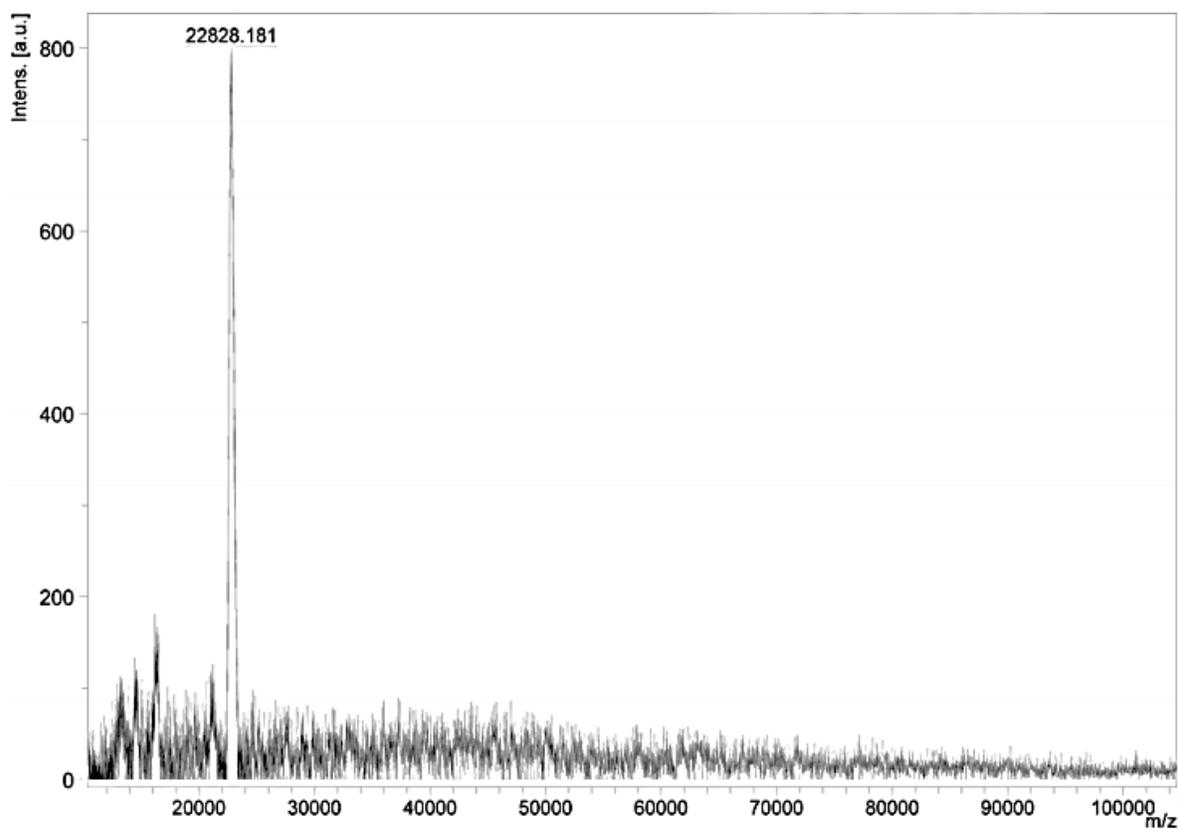


Figura 8.- MALDI – TOF de la proteína rHBHA – RE. El pico de 22 828. 181 Da, corresponde a la rHBHA, modificada por 24.4 grupos metilo.

9.4. Ensayo de toxicidad de HBHA hacia células Vero, A549 y RAW264.1

El efecto citotóxico de las proteínas rHBHA – EC (Figura 9, A) y rHBHA – RE (Figura 9, B) fue evaluado en células epiteliales A459 y Vero, así como en macrófagos murinos de la línea RAW264.7. Como se puede observar en la figura 6 A, la exposición de un millón de células a concentraciones menores a 50 μ g de proteína rHBHA – EC resultó en una toxicidad menor al

50% en células epiteliales de ambas líneas celulares mientras que en el caso de los macrófagos murinos la exposición hasta 100 μg de ésta proteína no tuvo ningún efecto citotóxico. En el caso de la proteína rHBHA – RE no se observó un efecto citotóxico mayor al 50% al exponerla a las tres líneas celulares evaluadas.

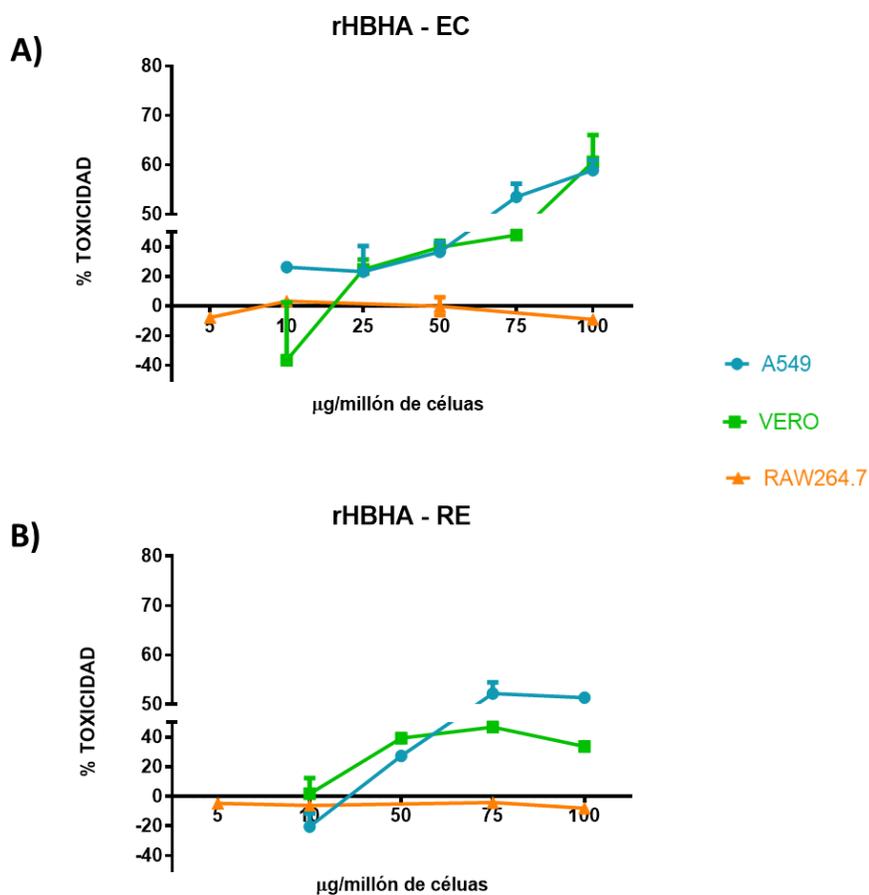


Figura 9.- Evaluación del efecto citotóxico de concentraciones de 5 a 100 μg de las proteínas **A)** HBHA expresada en *E. coli* (rHBHA – EC) y **B)** HBHA expresada en *R. erythropolis* (rHBHA – RE) en un millón de células de las líneas A549, Vero y RAW264.7.

9.5. Identificación de anticuerpos producidos en ratones inmunizados con HBHA

El suero de los ratones inmunizados por las vías subcutánea (Figura 10, A y B), intranasal (Figura 10, C y D) e intraperitoneal (Figura 8, E) fue evaluado para la detección anticuerpos de la clase IgG e IgM así como las subclases IgG1 e IgG2b. Como puede observarse en la Figura 10 la inmunización con rHBHA – EC por la vía intraperitoneal fue mejor en la inducción de anticuerpos

de la clase IgG en comparación con la proteína rHBHA – RE. La inmunización subcutánea con rHBHA - RE indujo la producción de anticuerpos de la clase IgG, subclase IgG1, que reconocieron por igual ambas proteínas. Mientras que diferencias significativas fueron encontradas en el reconocimiento de las proteínas por los anticuerpos presentes en los sueros de los ratones inmunizados por la vía subcutánea, siendo mayor hacia la proteína no metilada en comparación con la metilada.

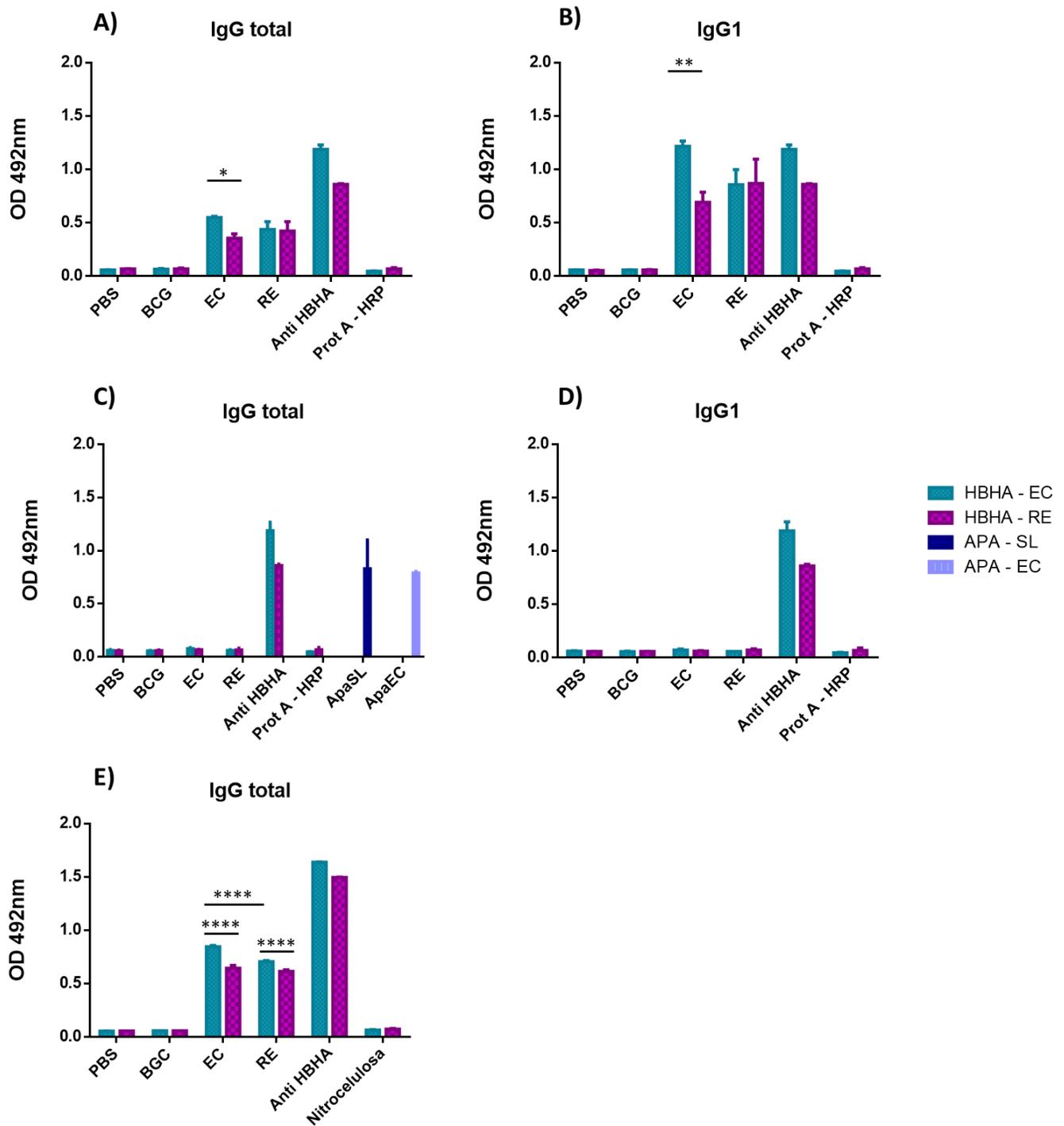


Figura 10.- Anticuerpos de la clase IgG, subclase IgG1, presentes en los sueros de los ratones inmunizados con PBS, *M. bovis* (BCG) Phipps, HBHA – EC (EC) o con HBHA – RE (RE) por la vía **A) y B)** subcutánea (n = 9), **C) y D)** intranasal (n = 9) e **E)** intraperitoneal (n = 3). Los asteriscos marcan diferencias significativas: ****, $P \leq 0.0001$; ***, $P \leq 0.001$; **, $P \leq 0.01$, *, $P \leq 0.05$.

En el caso de la inmunización vía intranasal no se observó la presencia de anticuerpos de ninguna clase. Como control de la vía de inmunización se utilizaron a las proteínas recombinantes Apa expresada en *Streptomyces lividans* (Apa – SL) y *E. coli* (Apa – EC), dado que trabajos previos en nuestro laboratorio han reportado su reconocimiento por anticuerpos presentes en el suero de ratones inmunizados por la vía intranasal con dichas proteínas.

En ninguno de los grupos evaluados se detectó la presencia de anticuerpos de la clase IgM o de la subclase IgG2b.

9.6. Determinación de citocinas

Se detectó la presencia de siete de las ocho citocinas evaluadas en los sobrenadantes del cultivo de esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados con las proteínas rHBHA – EC y rHBHA – RE y estimulados *in vitro* con las mismas. Como puede observarse en las Figuras 11 y 12, la concentración de citocinas expresadas en los grupos de ratones inmunizados por la vía subcutánea fue mayor en comparación con aquellos inmunizados por la vía intranasal.

En los ratones inmunizados por la vía subcutánea se observó una alta producción de IFN- γ , IL-17 e IL-10 tanto por los ratones inmunizados con rHBHA – EC como con rHBHA – RE, en comparación con los ratones inmunizados con BCG. La mayor concentración de IFN- γ fue producida en respuesta al estímulo con la proteína metilada, en todos los grupos, siendo mayor para los ratones inmunizados con la misma proteína. Mientras que no hubo diferencia significativa entre la producción de IL-17 e IL-10 en respuesta a ambas proteínas. La inmunización y estímulo con BCG incremento la expresión de TNF- α . La concentración de IL-1 β fue menor a 50 pg/mL en todos los grupos y no se observaron diferencias significativas en su expresión. La inmunización con rHBHA – RE incrementó la concentración de IL-2 con respecto a los otros grupos aunque no hubo diferencia significativa en su expresión frente al estímulo con ambas proteínas. A pesar de que la concentración de IL-4 incremento en los ratones inmunizados y estimulados con la proteína metilada sus valores fueron menores a 100 pg/mL.

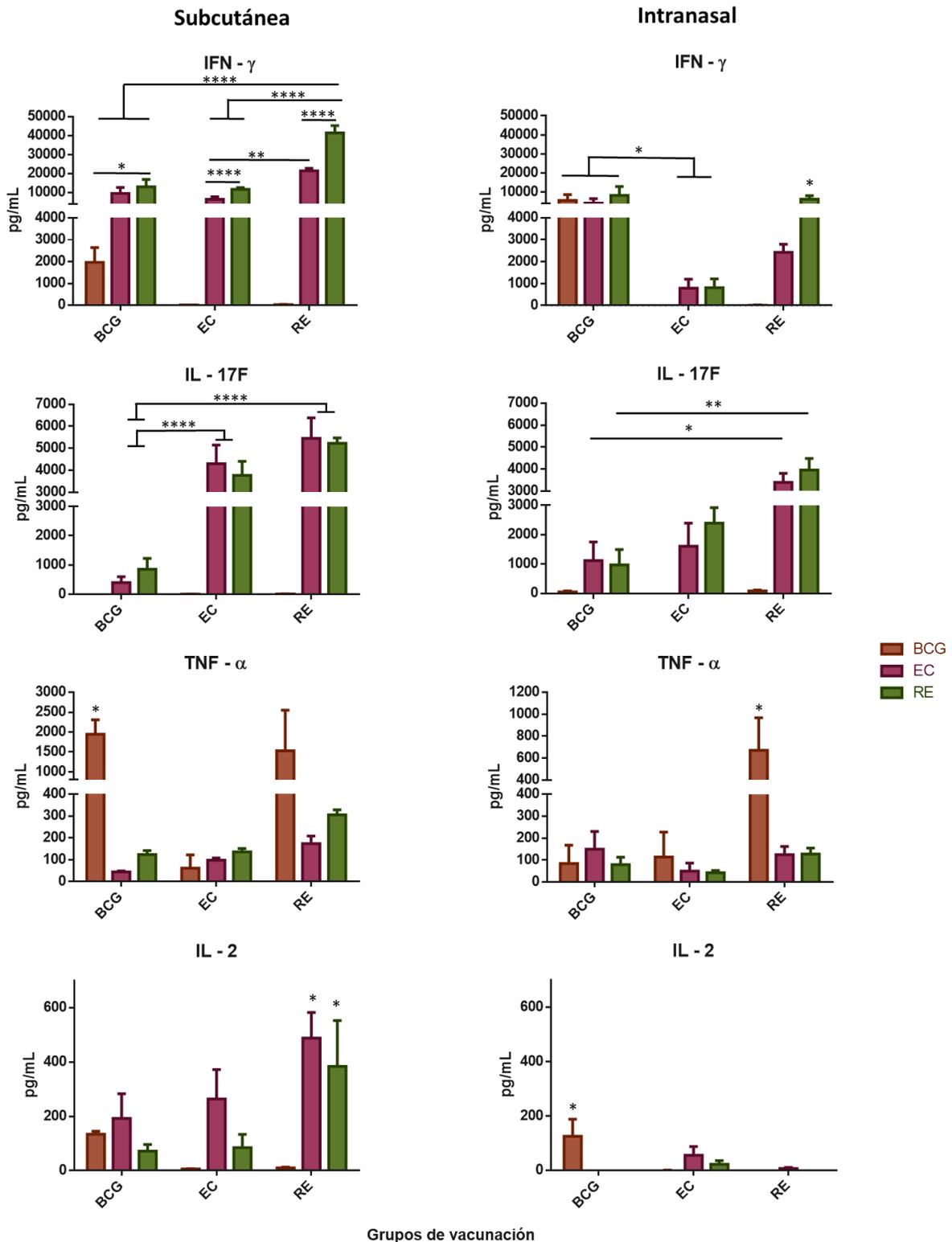


Figura 11.- IFN- γ , IL-17F, TNF- α e IL-2 presentes en los sobrenadantes del cultivo de esplenocitos de los ratones inmunizados (n = 9) por la vía subcutánea e intranasal con el bacilo *M. bovis* (BCG) o las proteínas recombinantes HBHA expresadas en *E. coli* (EC) y *R. erythropolis* (RE) y estimulados con BCG y ambas proteínas HBHA. Los asteriscos indican diferencias significativas: ****, $P \leq 0.0001$; **, $P \leq 0.01$; *, $P \leq 0.05$.

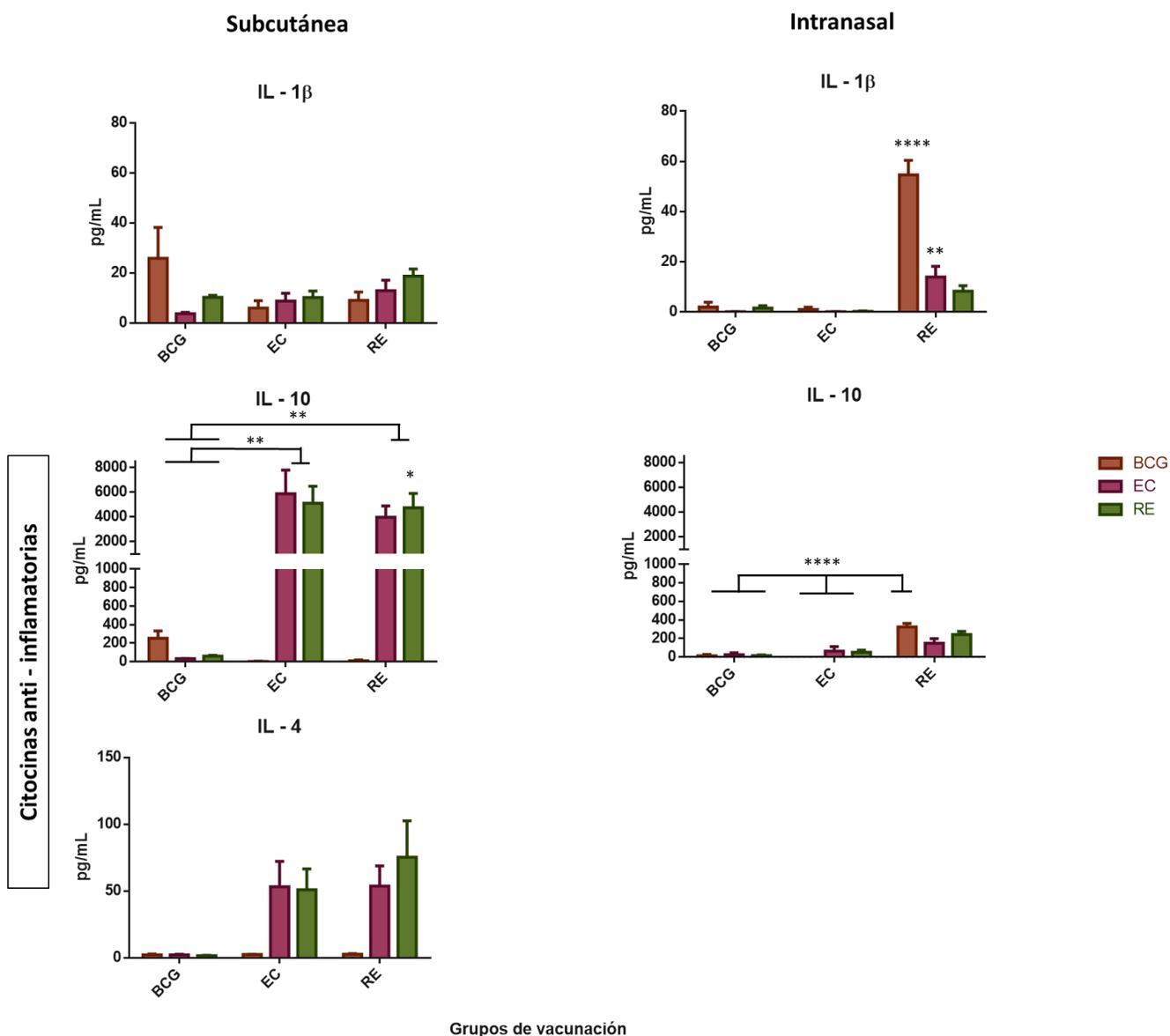


Figura 12.- IL-1 β , IL-10 e IL-4 presentes en los sobrenadantes del cultivo de esplenocitos de los ratones inmunizados (n= 9) por la vía subcutánea e intranasal con el bacilo *M. bovis* (BCG) o las proteínas recombinantes HBHA expresadas en *E. coli* (EC) y *R. erythropolis* (RE) y estimulados con BCG y ambas proteínas HBHA. Los asteriscos indican diferencias significativas: ****, $P \leq 0.0001$; **, $P \leq 0.01$.

Así mismo, resulta de interés particular el incremento de los valores de IFN- γ e IL-17 expresadas por los ratones inmunizados por la vía subcutánea con BCG en respuesta al estímulo con rHBHA – RE en comparación con los valores obtenidos por el estímulo con el mismo bacilo.

En los ratones inmunizados por la vía intranasal la mayor concentración de IFN- γ fue producida por los ratones inmunizados con BCG y rHBHA – RE, en el primer caso la expresión de esta citocina incrementó frente al estímulo con el bacilo y las proteínas mientras que en el segundo caso únicamente con la misma proteína metilada. De la misma forma la expresión de IL-17 fue significativamente mayor en los ratones inmunizados con rHBHA – RE y estimulados con ambas proteínas en comparación con los de BCG. Para el grupo de ratones inmunizados con esta proteína se observó una mayor expresión de IL – 10, IL -1 β y TNF- α en respuesta al estímulo con el bacilo BCG. Mientras que la mayor expresión de IL-2 se encontró en los ratones inmunizados y estimulados con BCG. La inmunización por esta vía no indujo la expresión de IL-4 en ningún grupo.

9.7. Evaluación *in vitro* de la proliferación celular inducida por las proteínas rHBHA

La proliferación celular de linfocitos en respuesta al estímulo *in vitro* con el bacilo BCG o las proteínas recombinantes es mostrado en la figura 13. Como puede observarse, no hubo proliferación en los linfocitos de ratones inmunizados por la vía intranasal. Mientras que la inmunización subcutánea con la proteína rHBHA – RE indujo la proliferación de linfocitos CD3⁺ en respuesta al estímulo con rHBHA – EC. Este valor de proliferación mostró diferencias significativas con respecto al inducido por el mismo estímulo en los ratones inmunizados con BCG. Para el caso de los linfocitos CD3⁺CD4⁺CD8⁺ el mayor valor de proliferación celular se observó en los ratones inmunizados con rHBHA – RE y estimulados con la misma proteína. Este valor fue significativamente mayor que la proliferación inducida por la inmunización con BCG o la proteína no metilada.

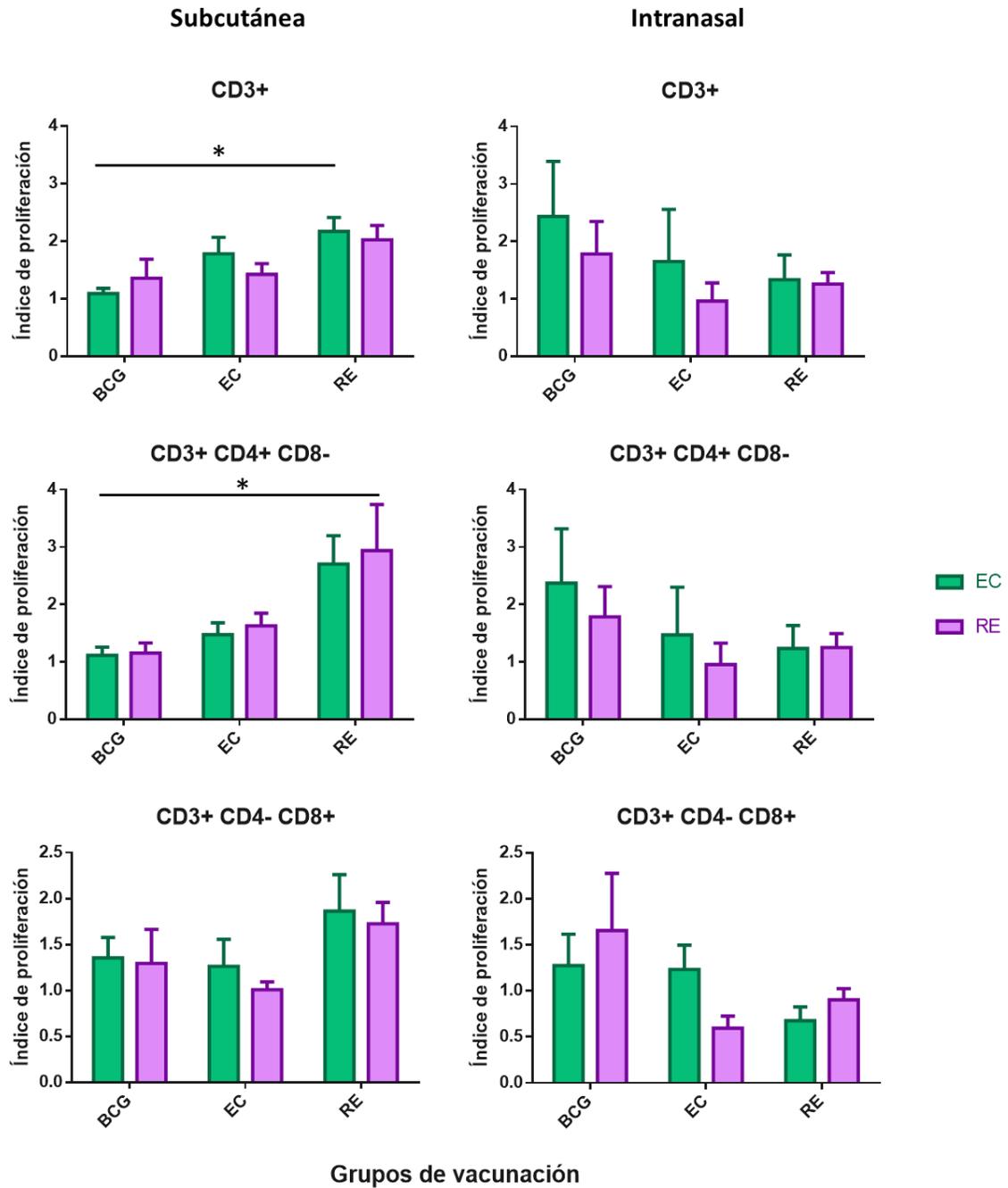


Figura 13. Índice de proliferación de linfocitos CD3+, CD3+CD4+CD8-, CD3+CD4-CD8+ de ratones inmunizados por la vía subcutánea (n= 9) o intranasal (n= 9) y estimulados *in vitro* con BCG, rHBHA – EC (EC) o rHBHA – RE (RE). Los asteriscos indican una diferencia significativa: *, P ≤ 0.05.

10. Discusión

Las alarmantes cifras de mortalidad y morbilidad por tuberculosis reportadas por la OMS en 2019 y la variable eficiencia de la vacuna BCG contra la enfermedad hace esencial la búsqueda de nuevos antígenos que induzcan una respuesta inmune robusta contra la micobacteria o fortalezcan la obtenida con la vacunación con BCG. En este sentido la proteína HBHA ha sido un candidato potencial al desarrollo de vacunas de subunidad. Sin embargo, se ha descrito que su eficacia en la protección contra el bacilo es dependiente de la presencia de un patrón característico de metilaciones en el extremo carboxilo de la proteína el cual se encuentra presente únicamente en la proteína obtenida de *M. tuberculosis* o *M. bovis* BCG (Petthe *et al.* 2002; Temmerman *et al.* 2004). Diversos trabajos (Parra *et al.* 2004; Teng *et al.* 2017) han reportado dificultades en la obtención de esta proteína a partir de estos organismos debido su baja concentración, prolongado tiempo de incubación y purificados no homogéneos. La extracción de HBHA recombinante a partir de otros microorganismos (*M. smegmatis*, *P. pastoris* o *E. coli*), a pesar de mejorar el rendimiento y el tiempo de incubación, no ha sido útil en la protección contra *M. tuberculosis* en modelos murinos debido a la ausencia o diferencia del patrón de metilación característico de la proteína nativa. En este trabajo, el rendimiento de la HBHA recombinante obtenida de *R. erythropolis* (rHBHA – RE), un actinomiceto relacionado taxonómicamente con las micobacteria que presenta una proteína homóloga a HBHA, fue de 18 mg/L, un valor mayor que el reportado para la rHBHA de *M. bovis* BCG o *M. tuberculosis* (datos no publicados). Además, la proteína rHBHA – RE es modificada post – traduccionalmente *in vivo* mediante la metilación de lisinas, como fue evidenciada por Western Blot utilizando el anticuerpo comercial Anti – mono/dimetil – lys – HRP. Aunado a lo anterior, el análisis de masas evidenció que 24.4 grupos metilos podrían estar adicionados en las lisinas de la rHBHA – RE. Este resultado coincide con lo reportado anteriormente por Petthe *et al.*, (2002) quienes demostraron que la proteína HBHA obtenida de *M. tuberculosis* consiste de isoformas que pueden presentar de 20 a 26 grupos metilo.

El papel de la metilación en la regulación de la expresión genética de células eucariontes está bien documentado, sin embargo, en procariontes su papel es incierto. En organismos como *Synechocystis sp.* la metilación del pili regula la movilidad celular (Lanouette *et al.*, 2014) mientras que en algunas micobacterias (*M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. smegmatis*) la trimetilación de la proteína HupB interfiere con la adherencia bacteriana a macrófagos THP1 en estudios *in vitro*

(Yaseen I. *et al.*, 2018). Para la proteína HBHA se ha reportado la importancia de la metilación en la protección ofrecida a ratones frente a la infección con *M. tuberculosis* (Parra *et al.*, 2004; Temmerman *et al.*, 2004). En concordancia con lo ya reportado, en este estudio demostramos que la presencia de dimetilaciones en la proteína rHBHA – RE incrementó la respuesta inmune celular en ratones inmunizados con ella, en comparación con aquellos que fueron administrados con BCG o la proteína no metilada expresada en *E. coli*. Lo anterior evidenciado mediante la evaluación de la proliferación de linfocitos y la expresión de citocinas como IFN- γ , IL-17F, TNF- α , IL-1 β e IL-2. Además, demostramos que las proteínas HBHA recombinantes no tienen un efecto citotóxico sobre células epiteliales Vero y A459 ni sobre macrófagos murinos de la línea RAW264.7 en las concentraciones utilizadas para la inmunización de ratones o para el estímulo *In vitro*.

Usando tres diferentes vías de inmunización demostramos que la administración subcutánea e intraperitoneal con las proteínas rHBHA – EC y rHBHA – RE indujo en ratones la producción de anticuerpos de la clase IgG, específicamente subclase IgG1 para el caso de la administración subcutánea, los cuales reconocieron ambas proteínas, principalmente rHBHA – EC. Estudios previos en humanos (Silva de Araujo *et al.*, 2018) han demostrado la presencia de anticuerpos IgG1 en pacientes con tuberculosis activa, los cuales reconocen antígenos tales como HBHA, ESAT6, CFP10, Rv2628, Rv2029c y Rv2031c. La presencia de estos anticuerpos puede potenciar la toma bacteriana, debido a que los macrófagos tienen receptores de alta afinidad para las regiones Fc de estas biomoléculas. En adición, Jacobs *et al.* (2016) demostraron que las IgG1 de pacientes con tuberculosis fueron capaces de estimular en monocitos la producción de TNF- α . Por lo anterior, podría suponerse que la inducción de esta subclase de anticuerpos por las proteínas HBHA recombinantes podría ser de importancia en el desarrollo de una respuesta inmune humoral protectora contra el bacilo.

La inducción de anticuerpos por la HBHA también fue reportada por Temmerman *et al.* (2004), quienes demostraron la presencia IgG1, IgG2a e IgG2b en sueros de ratones BALB/c inmunizados subcutáneamente con la proteína nHBHA de *M. tuberculosis* H37Ra o con rHBHA expresada en *E. coli* BL21(DE3). Dichos autores encontraron que ambos grupos de ratones produjeron cantidades comparables de anticuerpos dirigidos contra HBHA y que esos anticuerpos reconocían de la misma forma ambas proteínas. Así mismo, algunos estudios (Kohama *et al.* 2018; Parra *et al.*, 2004; Temmerman *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2017) demostraron que la presencia

de metilaciones en la proteína HBHA no tiene influencia en el perfil de isotipo de los anticuerpos específicos de la proteína ni en el incremento en la producción de ellos, dado que anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b fueron encontrados en el suero de ratones inmunizados con proteínas metiladas (nHBHA de *M. tuberculosis* o rHBHA expresada en *M. smegmatis*) o no metiladas (HBHA recombinantes expresadas en *E. coli* y *P. pastoris*).

Por el contrario, la inmunización intranasal con las proteínas recombinantes HBHA no generó la producción de anticuerpos de ningún tipo en suero. Pensando que esta diferencia pudo deberse a la vía de administración se utilizaron como control a las proteínas recombinantes Apa, expresadas en su forma glicosilada en *Streptomyces lividans* o en su forma no glicosilada en *Escherichia coli*, las cuales han inducido la producción de anticuerpos IgG en modelos murinos inmunizados con ellas por la vía intranasal (datos no publicados). Por lo tanto, la ausencia de anticuerpos en los ratones inmunizados por esta vía podría deberse a propiedades intrínsecas de la proteína más que a modificaciones post – traduccionales o a la vía de administración. Sin embargo, es pertinente la evaluación de la presencia de estos anticuerpos en el lavado de fluido bronqueoalveolar (BALF) debido a que la estimulación de la respuesta inmune por la administración intranasal de la proteína sería más evidente a nivel de vías respiratorias. Tal como fue demostrado por Li *et al* (2018), quienes compararon la respuesta inmune inducida por la proteína Esx – 1 en ratones inmunizados por la vía subcutánea e intranasal y demostraron que la mayor producción de anticuerpos se encontraba en el BALF de ratones inmunizados intranasalmente mientras que estos valores fueron mayores en el suero de aquellos inmunizados por la vía subcutánea.

La presencia de anticuerpos de la clase IgM fue evaluada debido a que Shin *et al.*, (2006) reportaron el reconocimiento de la proteína nHBHA de *M. tuberculosis* por anticuerpos IgM presentes en el suero de pacientes con tuberculosis crónica. Así mismo, demostraron que esta respuesta es afectada por la presencia de metilaciones, dado el reconocimiento de la proteína nativa o la recombinante en *M. smegmatis* pero no así el de la proteína no metilada expresada en *E. coli*. Sin embargo, en nuestro modelo no encontramos la generación de anticuerpos IgM. Por lo tanto, la presencia de IgM en pacientes con tuberculosis podría deberse al estímulo constante que se tiene con el bacilo y su producción podría estar relacionada con la disminución de la adherencia a células epiteliales y/o diseminación.

Estudios previos en modelos murinos (Kohama *et al.* 2018; Parra *et al.*, 2004; Temmerman *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2017) han demostrado que HBHA induce una respuesta inmune de tipo Th1 en los ratones inmunizados con ella, dada la alta producción de IFN- γ por los linfocitos estimulados *in vitro* con esta proteína. De la misma forma, estudios en humanos (Hougardy *et al.*, 2007; Masungi *et al.*, 2002; Temmerman *et al.*, 2004; Zannetti *et al.*, 2005) han demostrado la producción de esta citocina por células mononucleares de sangre periférica de pacientes con tuberculosis latente frente al estímulo con la proteína. La importancia del IFN- γ en la protección contra las enfermedades micobacterianas ha sido bien documentada en modelos animales. Esta citocina ha sido usada exitosamente como terapia adyuvante, específicamente en el tratamiento de tuberculosis multi – drogo – resistente y se ha considerado que los antígenos capaces de estimular su producción son candidatos potenciales al desarrollo de vacunas anti – tuberculosis. Sin embargo, no existen estudios que hayan evaluado la producción de otras citocinas en ratones inmunizados con HBHA.

En este trabajo se evaluó la producción de 8 citocinas por los linfocitos de ratones inmunizados con HBHA mediante dos diferentes vías. Al igual que los datos reportados anteriormente, tanto en modelos murinos como en humanos, la proteína HBHA indujo la expresión de IFN- γ en concentraciones mayores a 1000 pg/mL, tanto con la inmunización subcutánea como con la intranasal. La inmunización con la HBHA metilada expresada en *R. erythropolis* indujo una producción más alta de citocinas en comparación con la inducida por la inmunización con la proteína no metilada expresada en *E. coli*. Lo anterior había sido reportado por Temmerman *et al.* (2004) con respecto a la expresión de IFN- γ , por lo que la presencia de metilaciones en la proteína rHBHA – RE podría jugar un papel clave en la expresión de esta citocina. En los ratones inmunizados por la vía subcutánea con rHBHA – RE la concentración de IFN- γ (40 000 pg/mL) fue mayor en comparación con los datos reportados por otros trabajos (Temmerman *et al.*, 2004) en los que han evaluado la producción de esta citocina en ratones inmunizados con nHBHA de *M. tuberculosis* (20 000 pg/mL). Aunque, este valor fue menor que el reportado en un esquema de refuerzo de la vacuna BCG con la proteína HBHA en el que se observó la expresión de hasta 60 000 pg/mL de esta citocina (Rouanet *et al.*, 2009). A pesar de que la inmunización subcutánea con rHBHA – RE indujo la expresión de citocinas características de la respuesta Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-2) también se estimularon citocinas de la respuesta Th17 (IL-17F) y citocinas anti – inflamatorias (IL-10).

El papel protector de las citocinas de la respuesta Th1 contra la tuberculosis está bien documentado y la presencia IL-17 como inductor de una respuesta Th1 óptima e inmunidad protectora contra la micobacteria (Torrado *et al.*, 2011) sugiere que la proteína rHBHA – RE podría tener un papel protector en ratones contra el reto con *M. tuberculosis*. Anteriormente se ha reportado (Torrado *et al.*, 2010) el desarrollo de células T_H17 en presencia de IL-1 β y TNF- α , quienes pueden actuar como cofactores en su diferenciación. La inducción de estas citocinas por rHBHA – RE pudo haber sido clave en los altos niveles de IL-17. Además, se ha reportado que la expresión de esta citocina ocurre en ausencia de IL-12, citocina clave en el desarrollo de una respuesta T_H1, lo que explicaría la ausencia de esta citocina en los resultados obtenidos. Sin embargo, es necesaria la realización de una cinética de citocinas, estimuladas por el re – estímulo con la proteína rHBHA – RE, para tener un panorama más claro del efecto regulador que podrían tener entre ellas. En este contexto, la co – expresión de IL-10 con IFN – γ o IL- 17 ha sido reportado previamente (Domingo – Gonzáles *et al.*, 2017), tanto en humanos como en ratones, y podría estar relacionada con una regulación negativa debido a la alta expresión de estas citocinas en respuesta a la rHBHA – RE.

Resulta de interés particular el perfil de citocinas expresado en los ratones inmunizados por la vía subcutánea con BCG en respuesta al estímulo con la proteína rHBHA – RE. Lo anterior debido a que el re – estímulo con el bacilo induce altos niveles de citocinas clave en la activación de macrófagos (IFN- γ), reclutamiento de neutrófilos (IL-1 β e IL-17) y formación del granuloma (TNF- α). Sin embargo, la expresión de IFN- γ e IL-17 incrementan en respuesta al re – estímulo con la proteína rHBHA – RE. Lo que sugiere que un esquema de refuerzo de la vacuna BCG con rHBHA – RE permitiría el desarrollo de una respuesta inmune humoral y celular robusta, dirigida por la producción de IgG, proliferación celular de linfocitos y producción de IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-1 β e IL-2, que podría potenciar el efecto protector de la vacuna BCG frente a la infección con *M. tuberculosis*.

La vía de inmunización de las proteínas recombinantes HBHA fue determinante en la intensidad de la respuesta inmune generada. Lo anterior dado que la inmunización intranasal, a pesar de inducir las mismas citocinas que la subcutánea, disminuyó sus valores de concentración. Esta diferencia ya había sido reportada anteriormente por Li *et al.*, (2018) quienes observaron que la inmunización subcutánea expandió sistémicamente las células T CD4⁺ específicas de Rv3615c (en términos de elevadas citocinas en suero, frecuencia de células que expresaron citocinas y

cantidad de citocinas en bazo y nódulos linfáticos) en contraste con la inmunización intranasal, la cual preferiblemente elevó citocinas y células productoras de ellas en fluido de lavado bronqueoalveolar. Estos mismos autores evidenciaron que los valores de citocinas inducidos por la inmunización subcutánea fue mayor en comparación con la inducida por la inmunización intranasal al evaluar bazo y nódulos linfáticos.

Hasta el momento no existen trabajos en los que se haya evaluado la proliferación celular inducida por la proteína HBHA. En este trabajo demostramos que rHBHA – RE indujo la proliferación de linfocitos T CD4⁺ en los bazos de ratones inmunizados por la vía subcutánea. Esta respuesta presentó diferencias significativas con respecto a la proteína no metilada rHBHA – EC, al igual que con la expresión de citocinas, esta diferencia podría deberse a la presencia de metilaciones. De la misma forma, la vía de administración fue relevante en la respuesta proliferativa de los linfocitos, ya que no se observó esta respuesta en aquellos obtenidos de los ratones inmunizados por la vía intranasal. Sin embargo, es pertinente la evaluación de la linfoproliferación en pulmones para descartar la eficacia de la proteína por esta vía de administración.

11. Conclusiones

Las proteínas recombinantes HBHA - RE metilada y HBHA – EC no metilada indujeron una respuesta inmune humoral en los ratones inmunizados con ellas; la inmunización intraperitoneal y subcutánea indujo la producción de anticuerpos IgG, subclase IgG1.

La respuesta inmune celular inducida por las proteínas recombinantes HBHA metilada y no metilada presentó diferencias; siendo más efectiva la rHBHA – RE metilada en la inducción de citocinas protectoras (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-1 β , IL-17) y la proliferación de linfocitos T CD4⁺ en comparación con la rHBHA – EC y BCG. Estos valores fueron mayores en los ratones inmunizados por la vía subcutánea en comparación con la vía intranasal. Así mismo la inmunización subcutánea con rHBHA – RE y el re – estímulo *in vitro* con el bacilo BCG incrementó la expresión de citocinas características de la respuesta T_{H1} (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-1 β) y T_{H17} (IL-17) en comparación con los ratones inmunizados y estimulados *in vitro* con BCG.

Las proteínas recombinantes HBHA no son tóxicas para células epiteliales Vero o A549 a concentraciones menores a 75 μ g/millón de células ni para macrófagos murinos a concentraciones de hasta 100 μ g/millón de células.

12. Perspectivas

Debido a la inducción de una respuesta inmune humoral y celular inducida en ratones BALB/c en respuesta a la inmunización subcutánea con rHBHA – RE y al incremento en la expresión de citocinas protectoras (IFN- γ , IL-17, IL-2, TNF- α , IL-1 β) inducida por esta proteína en los ratones inmunizados con BCG es pertinente evaluar el efecto protector de rHBHA – RE en un esquema de vacuna de subunidad y en uno de refuerzo de la vacuna BCG para determinar su efecto protector frente a la infección con *M. tuberculosis*, principalmente mediante la reducción del número de unidades formadoras de colonia en el bazo y pulmón de ratones BALB/c inmunizados por la vía subcutánea.

13. Referencias

1. Abhinav KV, Sharma A, Vijayan M. Identification of mycobacterial lectins from genomic data. *Proteins*. 2013; 81: 644 – 657
2. Achkar J, Chan J, Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev*. 2015; 264: 167 – 181,
3. Aerts L, Selis E, Corbière V, Smits K, Van Praet A, Dauby N, *et al*. HBHA – Induced polycytotoxic CD4⁺ T lymphocytes are associated with the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection in humans. *J Immunol*. 2019; 15: 421 – 427
4. Aagaard CS, Hoang TT, Vingsbo – Lundberg C, Dietrich J, Andersen P. Quality and vaccine efficacy of CD4⁺ T cell responses directed to dominant and subdominant epitopes in ESAT – 6 from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2009; 183: 2659 – 2668.
5. Bañuls AL, Sanou A, Anh NT, Godreuil S. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *J Med Microbiol*. 2015; 64: 1261 – 1269
6. Dalmia N, Ramsay AJ. Prime – boost approaches to tuberculosis vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2012; 11: 1221 – 1231
7. Delogu G, Bua A, Pusceddu C, Parra M, Fadda G, Brennan MJ, Zanetti S. Expression and purification of recombinant methylated HBHA in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 239: 33 – 39.
8. Domingo – Gonzales R, Prince O, Cooper A, Khader S. Cytokines and chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbiol Spectr*. 2016; 4: 10.1128/microbiolspect.TB2-0018-2016.
9. Esposito C, Castisani M, Gabriella D, Falcigno L, Pedone E, Galdiero S, Berisio R. Mapping key interactions in the dimerization process of HBHA from *Mycobacterium tuberculosis*, insights into bacterial agglutination. *FEBS Letters*. 2012; 568: 659 – 667.
10. Fukui M, Shinjo K, Umemura M, Shigeno S, Harakuni T, Arakawa T, Matsuzaki G. Enhanced effect of BCG vaccine against pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice with lung Th17 response to mycobacterial heparin – binding hemagglutinin adhesin antigen. *Microbiol Immunol*. 2015; 59: 735 – 743.
11. Guerrero G, Debie AS, Loch C. Boosting with mycobacterial heparin – binding haemagglutinin enhances protection of *Mycobacterium bovis* BCG – vaccinated newborn mice against *M. tuberculosis*. *Vaccine*. 2010; 28: 4340 – 4347.

12. Guerrero G, Locht C. Recombinant HBHA Boosting effect on BCG – Induced Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Dev Immunol. 2011; 2011; 730702
13. Hartman TE, Wang Z, Jansen RS, Gardete S, Rhee KY. Metabolic perspectives on persistence. Microbiol Spectr. 2017; 5
14. Host H, Drobecq H, Locht C, Menozzi F. Enzymatic methylation of the *Mycobacterium tuberculosis* heparin – binding haemagglutinin. FEMS Microbiol Lett. 2007; 268: 144 - 150
15. Hougardy JM, Schepers K, Place S, Drowart A, Lechevin V, Verscheure V, *et al.* Heparin – Binding – Hemagglutinin – Induced IFN – γ release as a diagnostic tool for latent tuberculosis. PLoS one. 2007; 10: e926.
16. Huang TY, Irene D, Zulueta MM, Tai TJ, Lain SH, Cheng CP, *et al.* Structure of the complex between heparan sulfate octasaccharide and Mycobacterial Heparin – Binding Hemagglutinin. Angew Chem Int Ed Engl. 2017; 56: 4192 – 4196.
17. Jacobs A, Mongkolsapaya J, Screaton GR, McShane H, Wilkinson RJ. Antibodies and tuberculosis. Tuberculosis. 2016; 101: 102 – 113.
18. Jaseosky LD, Scriba TJ, Hanekom WA, Goldfeld AE. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. Immunol Rev. 2015; 264: 74 – 87.
19. Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. Lancet. 2010; 12: 2110 – 2119
20. Khan N, Vidyarthi A, Amir M, Mushtaq K, Agrewala JN. T-cell exhaustion in tuberculosis: pitfalls and prospects. Crit Rev Microbiol. 2017; 43: 133 – 141.
21. Kohama H, Umemura M, Okamoto Y, Yahagi A, Goga H, Harakuni T, Matsuzaki G, Arakawa T. Mucosal immunization with recombinant heparin – binding haemagglutinin adhesin suppresses extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette – Guerin (BCG) in infected mice. Vaccine. 2008; 26: 924 – 932.
22. Kumar P, Amara RR, Challu VK, Chadda VK, Satchidanandam V. The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon – secreting CD4⁺ and CD8⁺ T cells from purified protein derivative – positive individuals and affords protection in a guinea pig model. Infect Immun. 2003; 71: 1929 – 1937.
23. Krishnan N, Robertson BD, Thwaites G. The mechanism and consequences of the extra – pulmonary dissemination of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. 2010; 90: 361 – 366
24. Lanouette S, Mongeon V, Figers D, Couture JF. The functional diversity of protein lysine methylation. Mol Sys Biol. 2014; 10: 724

25. Li J, Zhao J, Shen J, Wu C, Liu J. Intranasal immunization with *Mycobacterium tuberculosis* Rv3615c induces sustained adaptive CD4⁺ T – cell and antibody responses in the respiratory tract.
26. Lewellys FB, Brennan MJ, Rosenstein PK, Sadoff JC. Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21: 331 – 338.
27. Locht C, Hougardy JM, Rouanet C, Place S, Mascart F. Heparin – binding hemagglutinin, from an extrapulmonary dissemination factor to a powerful diagnostic and protective antigen against tuberculosis. *Tuberculosis.* 2006; 86: 303 – 309.
28. Masungi C, Temmerman S, Van Vooren JP, Drowart A, Pethe K, Menozzi FD, Locht C, Mascart F. Differential T and B cell responses against *Mycobacterium tuberculosis* heparin – binding hemagglutinin adhesin in infected healthy individuals and patients with tuberculosis. *Jour Infect Dis.* 2002; 185: 513 – 520.
29. Mayer – Barber KD, Barber DL. Innate and adaptive cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015; 5: a018424
30. Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude – Sharp M, Muller J, Bischoff R, Brennan MJ, Locht C. Identification of a Heparin – Binding Hemagglutinin present in Mycobacteria. *J Exp Med.* 1996; 184: 993 – 1001.
31. Morandi M, Sali Michela, Manganelli R, Delogu G. Exploiting the mycobacterial cell Wall to design approved vaccines against tuberculosis. 2013; 7: 169 – 181
32. Parra M, Pickett T, Delogu G, Dheenadhayalan V, Debie AS, Locht C, Brennan MJ. The mycobacterial heparin – binding hemagglutinin is a protective antigen in the mouse aerosol challenge model of tuberculosis. *Infect Immun.* 2004; 72: 6799 - 6805
33. Pethe K, Bifani P, Drobecq H, Sergheraert C, Debie AS, Locht C, Menozzi FD. Mycobacterial heparin – binding hemagglutinin and laminin – binding protein share antigenic methylisines that confer resistance to proteolysis. *PNAS.* 2002; 99: 10759 – 10764.
34. Poeta P, Silva V, Guedes A, Pereira JE, Coelho AC, Igrejas C. Tuberculosis in the 21st century: current status of diagnostic methods. *Exp Lung Res.* 2018; 44: 352 – 360
35. Portugal MI, Todeschini AR, de Lima CS, Silva CAM, Mohana – Borges R, Tom HM, *et al.* Characterization of two heparan sulphate – binding sites in the mycobacterial adhesin Hlp. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 75
36. Rouanet C, Debie AN, Lecher S, Locht C. Subcutaneous boosting with heparin binding haemagglutinin increases BCG – induced protection against tuberculosis. *Microb Infect.* 2009; 11: 995 – 1001.

37. Sáenz B, Hernández – Pando R, Fragoso G, Bottaso O, Cárdenas G. The dual face of central nervous system tuberculosis: A new Janus Bifrons? *Tuberculosis*. 2013; 93: 130 – 135.
38. Schepers K, Dirix V, Mouchet F, Verscheure V, Lecher S, Loch C, Mascart F. Early cellular immune response to a new candidate mycobacterial vaccine antigen in childhood tuberculosis. *Vaccine*. 2015; 33: 1077 – 1083.
39. Scott AN, Menzies D, Tannenbaum TN, Thibert L, Kozak R, Joseph L, *et al.* Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit – variable – number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 89 – 94.
40. Shin AR, Lee KS, Lee JS, Kim SY, Song CH, Jung SB, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* HBHA protein reacts strongly with the serum immunoglobulin M of tuberculosis patients. *Clin Vaccine Immunol*. 2006; 13: 869 – 875.
41. de Araujo LS, da Silva NBM, Leung JAM, Mello FCQ, Saad MHF. IgG subclasses response to a set of mycobacterial antigens in different stages of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis*. 2018; 108: 70 – 76. g
42. Teimourpour R, Sadeghian A, Meshkat Z, Esmaelizad M, Sankian M, Jabbari AR. Construction of a DNA vaccine encoding *Mtb32C* and *HBHA* genes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Jundishapur J Microbiol*. 2015; 8: e21556.
43. Temmerman S, Pethe K, Parra M, Alonso S, Rouanet C, Pickett T, *et al.* Methylation – dependent T cell immunity to *Mycobacterium tuberculosis* heparin – binding hemagglutinin. *Nat Med*. 2004; 10: 935 – 941.
44. Torrado E, Cooper AM. IL – 17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010; 21: 455 – 462.
45. Yang JD, Mott D, Sutiwisesak R, Lu YJ, Raso F, Stowell B, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* – specific CD4⁺ y CD8⁺ T cells differ in their capacity to recognize infected macrophages. *PLoS Pathog*. 2018; 14: e1007060
46. Van Els CA, Corbière V, Smits K, van Gaans – van den Brink JA, Poelen MC, Mascart F *et al.* Toward understanding the essence of post – translational modifications for the *Mycobacterium tuberculosis* immunoproteome. *Front Immunol*. 2014; 5: 361
47. Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11: 343 – 345.

48. Walzl G, McNerney R, du Plessis N, Bates M, McHugh TD, Chegou NN, Zumla A. Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18: e199 – e210.
49. Wen HL, Li CL, Li G, Lu YH, Li HC, Li T, *et al.* Involvement of methylated HBHA expressed from *Mycobacterium smegmatis* in a IFN – γ release assay to aid discrimination between latent infection and active tuberculosis in BCG – vaccinated populations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017; 36: 1415 – 1423.
50. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takasu K, *et al.* Initiation of the adaptative immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med.* 2008; 205: 105 – 115.
51. Wyndham – Thomas C, Corbière V, Dirix V, Smits K, Domont F, Libin M, *et al.* Key role of effector memory CD4⁺ T lymphocytes in a short – incubation heparin – binding hemagglutinin gamma interferón release assay for the detection of latent tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2014; 21: 321 – 328.
52. Yaseen I, Choudhury M, Sritharan M, Khosla S. Histone methyltransferase SUV39H1 participates in host defense by methylating mycobacterial histone – like protein HupB. *The EMBO journal.* 2018; 37: 183 – 200.
53. Zanetti S, Bua A, Delogu G, Pusceddu C, Mura M, Saba F, *et al.* Patients with pulmonary tuberculosis develop a strong humoral response against methylated heparin – binding hemagglutinin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12: 1135 – 1138.
54. Zaw MT, Emran NA, Lin Z. Mutations inside rifampicin – resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin – resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Public Health* 2018;11: 605 – 610.
55. Zhao S, Zhao Y, Mao F, Zhang C, Bai B, Zhang H, Shi C, Xu Z. Protective and therapeutic efficacy of *Mycobacterium smegmatis* expressing HBHA – hIL12 fusion protein against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *PLoS ONE.* 2012; 7: e31908.