



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Programa de Magíster en Biotecnología Molecular

**DESARROLLO DE UN CANDIDATO
VACUNAL CONTRA LA TUBERCULOSIS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción
para optar al grado académico de Magíster en Biotecnología Molecular

POR: EVALDO MARTINO RIVAS SOLARI

Profesor Guía: Dr. Frank Camacho Casanova

Profesor Co-Guía: Dr. Oliberto Sánchez Ramos

Concepción, Chile, octubre de 2022

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Frank Camacho Casanova
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Oliberto Sánchez Ramos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dr. Ángel Oñate Contreras
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Iván González Chavarría
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Aláin González Pose
Facultad de Ciencias Básicas
Universidad de Medellín

Director de Programa

Dra. Coralia Rivas Rocco
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



PARA MI HIJA

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Frank Camacho Casanova, por apoyarme incondicionalmente en el desarrollo de la tesis, así como también en proyectos e ideas que se formularon en el camino, prestando siempre un poco de su tiempo para compartir sus conocimientos y experiencias cotidianas.

Al Dr. Oliberto Sánchez Ramos, por aceptarme para trabajar en el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes y facilitarme los elementos disponibles para realizar mi trabajo.

A mis amigos y todo el personal que trabaja en el laboratorio, por hacer del lugar de trabajo un lugar ameno para convivir.

A mis tíos, que me proporcionaron cariño, apoyo y un techo para vivir.

A mi pareja y mi hija, por darme un impulso para terminar mis tareas.

A mi madre, mi padre y hermana, por apoyarme en el camino de mi formación. Gracias por estar conmigo en la dicha y en las dificultades y por siempre creer en mí.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL	iv
INDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
RESUMEN GRÁFICO	xii
INTRODUCCIÓN	13
TUBERCULOSIS EN LA ACTUALIDAD	13
1. Impacto en la sociedad.	13
2. Tratamientos y vacunas actuales	16
RESPUESTA INMUNE Y TUBERCULOSIS	20
1. Elementos del sistema inmune.	20
2. Generación de memoria contra antígenos.	26
3. Inmunidad mucosal.	31
4. Inmunopatología en tuberculosis.....	33
5. Proteína de Mtb presente en el estado de latencia.....	40
VIRUS COMO HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS	44
1. Utilización de virus en nanomedicina.	44
2. Bacteriófagos como vehículos o <i>carriers</i> vacunales.....	48

3. Expresión de péptidos en la superficie de fagos filamentosos.	50
4. Ciclo de vida de bacteriófagos filamentosos.	56
5. Estimulación eficaz del sistema inmune por bacteriófagos.	58
6. Seguridad y transcitosis de bacteriófagos.	60
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	64
MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
MATERIALES.....	65
1. Reactivos y fungibles.	65
2. Proteínas.	66
3. Bacterias, virus y animales.	67
4. Soluciones.	67
5. Agares y medios de cultivo.	68
6. Equipos.	69
MÉTODOS	70
1. Generación de bacterias <i>Escherichia coli</i> recombinantes.	70
2. Producción y purificación de la proteína Acr.	73
3. Producción de bacteriófagos recombinantes.	77
4. Detección de proteínas.	80
5. Inmunización con bacteriófagos filamentosos en modelo murino.	83
6. Análisis y procesamiento de datos.	88
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
RESULTADOS.....	91



1. Generación de candidatos vacunales.....	91
2. Variación de los medios de cultivo bacteriano.....	95
3. Producción y purificación de la proteína Acr.....	99
4. Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por bacteriófagos.....	103
DISCUSIÓN.....	106
1. Generación de plásmidos.....	106
2. Generación de bacteriófagos.	107
3. Variación de los medios de cultivo fago-bacteriano.	109
4. Producción y purificación de la proteína Acr.....	110
5. Evaluación de la respuesta inmune humoral.	111
CONCLUSIONES.....	115
GLOSARIO	117
BIBLIOGRAFIA.....	122
ANEXOS.....	136
Anexo 1: Composición de geles SDS-PAGE en tampón tris-glicina.	136

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Moléculas de anticuerpos.	22
Figura 2. Las dos fases en la adquisición de las células B de memoria.....	27
Figura 3. Características morfológicas de células M.	32
Figura 4. Granuloma tuberculoso y sus componentes celulares.	37
Figura 5. Resumen de aplicaciones de los bacteriófagos en nanomedicina.....	46
Figura 6. Estructura de un bacteriófago filamentoso Ff.....	50
Figura 7. Tipos de sistemas de phage display.....	52
Figura 8. Ciclo infectivo de los bacteriófagos del grupo Ff.....	54
Figura 9. Genotipos y fenotipos esperados en el sistema n+n fagémido y no-fagémido.....	55
Figura 10. Tipos de ciclos de vida de bacteriófagos.....	57
Figura 11. Procesamiento de antígenos en CD con bacteriófagos filamentosos.....	60
Figura 12. Diseño de casete y vectores de expresión.....	71
Figura 13. Vector de expresión pET-Acr.....	74
Figura 14. Esquemas de inmunización.	85
Figura 15. Verificación de la secuencia Acr en el vector pUC57-Acr-Co1.....	92
Figura 16. Análisis de expresión bacteriófaga de la proteína Acr y de la proteína viral III.	94
Figura 17. Producción bacteriana en distintos medios de cultivo.....	96
Figura 18. Expresión de la proteína Acr en el bacteriófago M13 en biorreactor.....	97
Figura 19. Recuperación de bacteriófagos por precipitación con polietilenglicol.....	98
Figura 20. Expresión de la proteína Acr en el ϕ -Acr-Co1.	99

Figura 21. Purificación de la proteína Acr recombinante expresada en E. coli BL21.....	101
Figura 22. Detección, extracción de imidazol y cuantificación de proteína Acr expresada en E. coli BL21.....	102
Figura 23. Evaluación respuesta inmune humoral IgA e IgG según vía de inoculación.	104



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actuales candidatos vacunales preventivos contra TB en fase clínica.....	19
Tabla 2. Candidatos vacunales preventivos contra TB que utilizan la proteína Acr en fase preclínica.	43
Tabla 3. Receta para geles resolutorios SDS-PAGE de 1 mm de grosor.....	136
Tabla 4. Receta para geles concentradores SDS-PAGE de 1 mm de grosor.....	136



RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) es un patógeno del sistema respiratorio que infecta los pulmones, provocando tuberculosis (TB). La única vacuna aprobada para su uso en humanos, el Bacilo de Calmette y Guérin, ha resultado ineficaz eliminando al patógeno de circulación, mientras que su capacidad protectora varía significativamente según las poblaciones y edades. Mtb ha desarrollado capacidades de sobrevivencia y evasión al sistema inmune. Su éxito se refleja en su persistencia en la población humana, infectando a un cuarto de la población mundial y siendo capaz de mantenerse en el infectado por años de manera asintomática en estado latente. La proteína *16-kDa alpha-crystallin* (Acr), es un antígeno de Mtb reconocido en pacientes con TB activa y expresada en niveles elevados en el estado de latencia, siendo un factor de virulencia necesario para la colonización y evasión del sistema inmune. Mtb ataca las mucosas de las vías respiratorias, por lo que es necesario generar una respuesta inmune adaptativa con altos niveles de anticuerpos especializados en mucosas. IgA es el principal anticuerpo residente en las mucosas, participando en la inhibición de la adherencia bacteriana y la neutralización de toxinas y virus. El desarrollo de la respuesta inmune mucosal está asociado a la captación de antígenos por las células M, las cuales se encargan de iniciar la respuesta mucosal. Se ha descrito al péptido sintético Co1 como un ligando al receptor 5a presente en las células M, facultando el diseño de vehículos promotores de una respuesta mucosal. En este trabajo, la proteína Acr y el péptido Co1 se expresaron en la superficie del fago filamentoso M13, un virus bacteriano reconocido por infectar a *Escherichia coli* y de replicarse sin provocar la lisis bacteriana. Los bacteriófagos se inocularon en ratones C57BL/6 por la vía oral y subcutánea y se evaluó el desarrollo de anticuerpos IgA e IgG, demostrando que el bacteriófago M13 actúa como un *carrier* vacunal de la proteína Acr y que el péptido Co1 tiene un efecto directo en los niveles de anticuerpos generados.

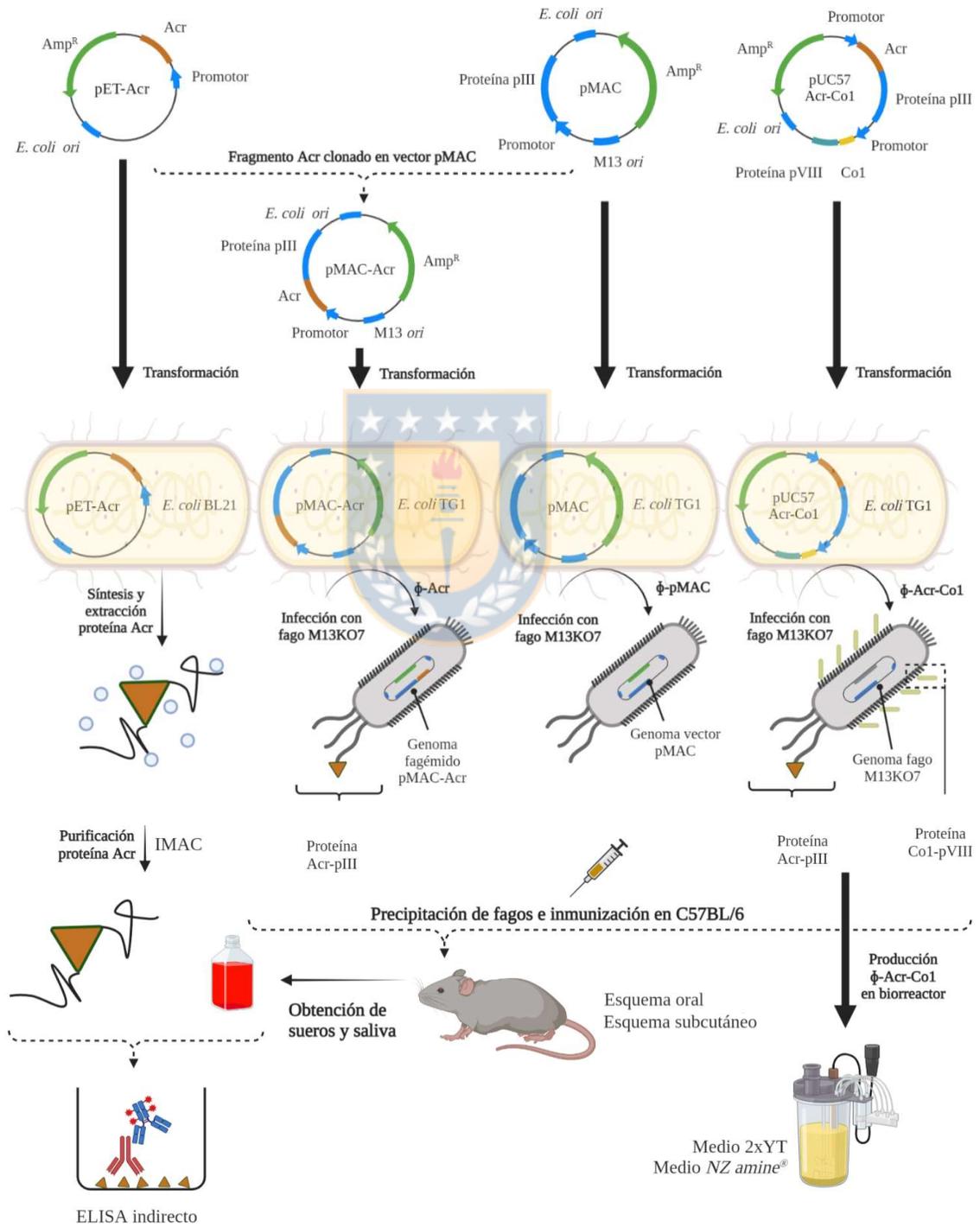
Palabras clave: Bacteriófago M13, *Mycobacterium tuberculosis*, Acr, Co1, vacuna.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) is a pathogen of the respiratory system, it infects the lungs causing tuberculosis (TB) disease. The only vaccine approved for use in humans, Bacillus Calmette and Guérin, has been ineffective in eliminating the circulating pathogen, while its protective capacity varies significantly according to population and age. Mtb has developed survival and evasion capabilities to the immune system. Its success is reflected by its persistence in human population, infecting a quarter of the world's population and being able to remain in the infected for years as asymptomatic way in latent state. The 16-kDa *alpha-crystallin* (Acr) protein is an Mtb antigen recognized in patients with active TB and expressed at high levels in the latency state, being a virulence factor necessary for colonization and evasion by the immune system. Mtb attacks the mucous membranes of the airways, so it is necessary to generate an adaptive immune response with high levels of specialized mucosal antibodies. IgA is the main mucosal-resident antibody, participating in the inhibition of bacterial adherence and the neutralization of toxins and viruses. The development of the mucosal immune response is associated with the uptake of antigens by M cells, which are responsible for initiating the mucosal response. The synthetic peptide Co1 has been described as a ligand to the 5a receptor present on M cells, enabling the design of vehicles that promote a mucosal response. In this work, Acr protein and Co1 peptide were expressed on the surface of filamentous phage M13, a bacterial virus known to infect *Escherichia coli* and to replicate without triggering bacterial lysis. The bacteriophages were inoculated into C57BL/6 mice by the oral and subcutaneous routes and the development of IgA and IgG antibodies was evaluated, demonstrating that the bacteriophage M13 acts as a vaccine carrier of the Acr protein and that the Co1 peptide has a direct effect on the levels of antibodies generated.

Keywords: Bacteriophage M13, *Mycobacterium tuberculosis*, Acr, Co1, vaccine.

RESUMEN GRÁFICO



INTRODUCCIÓN

TUBERCULOSIS EN LA ACTUALIDAD.

1. Impacto en la sociedad.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), también llamada bacilo de Koch, que afecta principalmente a los pulmones y pudiendo comprometer a otros órganos por diseminación a través del sistema linfático o a través de la sangre (Sharma and Mohan 2017). Si esta enfermedad no es tratada de manera oportuna y adecuada, puede provocar serias complicaciones estructurales, metabólicas y/o vasculares, viéndose afectados principalmente los pulmones del individuo, disminuyendo las posibilidades de sobrevivencia del enfermo (Shah and Reed 2014).

Existen evidencias clínicas de la infección con Mtb desde hace siglos, donde los términos ocupados para describir las características microbiológicas del patógeno se han usado ambiguamente. Con el propósito de clarificar, se debe diferenciar entre persistencia, latencia y dormancia. Persistencia es la habilidad de un organismo para mantener una infección a pesar de la respuesta inmune o un tratamiento antibiótico (Jung et al. 2019), latencia se refiere a la presencia de un organismo infeccioso persistente que mantiene lesiones asintomáticas en el infectado en un estado parecido a la dormancia (Melenotte et al. 2019), pudiendo reactivarse cuando las condiciones son las adecuadas. Por último, dormancia es un período en el ciclo biológico de un organismo donde el crecimiento, desarrollo y actividad metabólica se reducen considerablemente con el fin de permitir que el organismo pueda sobrevivir ante condiciones de estrés (Rittershaus et al. 2013).

En la actualidad, la TB es posiblemente la enfermedad infecciosa más persistente en el mundo, lo cual constituye un enorme reservorio de la infección. Según estimaciones

de la Organización Mundial de la Salud (OMS), una cuarta parte de la población mundial está infectada con Mtb, pero no todas las infecciones causadas por este patógeno provocan la enfermedad. Muchas de las infecciones son asintomáticas y el bacilo queda en un estado latente esperando el momento para reactivarse (WHO 2021a).

Al año 2021 y según estadísticas de la OMS, ésta ha declarado a la TB como una epidemia y una emergencia médica mundial por su gran incidencia, prevalencia y mortalidad. Esta enfermedad constituye la treceava causa de muerte en el mundo entre todas las razones posibles de muerte, pero es la principal causa de muerte provocada por un sólo agente infeccioso, superando al coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) y al virus de inmunodeficiencia humana, a pesar del gran impacto mundial que ha tenido la pandemia del SARS-CoV-2 (WHO 2021b).

Para el año 2020, se estimaron 9,9 millones de personas enfermas con TB en el mundo, de las cuales 1,3 millones de ellas fallecieron por la enfermedad, siendo el 89% de ellas personas iguales o mayores de 15 años. Es importante acotar que la pandemia del SARS-CoV-2 ha disminuido los diagnósticos de la enfermedad, lo que ha provocado un aumento en la cantidad de muertes en relación con el año 2019, retrocediendo a valores de mortalidad similares a los del año 2017 (WHO 2021a).

La OMS propone como meta para el año 2030 llegar a tasas de incidencia de TB menores a los 10 casos por cada 100000 habitantes $\left(10 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{habs.}]}\right)$, propuesta que países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Australia y varios países europeos han logrado, pero muchas regiones de África y el sur-este de Asia están lejos de lograr, lugares que concentran tasas de incidencia promedio de $220 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{habs.}]}$ y $211 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{habs.}]}$, respectivamente (WHO 2021a).

En Chile al año 2019, 2759 personas se enfermaron por primera vez de TB, lo que se traduce en una tasa de incidencia de $14,4 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{habs.}]}$ anual (MINSAL 2019), entendiéndose como tasa de incidencia al número de casos nuevos de una enfermedad en

una población determinada y en un periodo determinado, diferenciándose de la tasa de morbilidad, la cual cuenta la cantidad total de individuos considerados enfermos o que son afectados por una enfermedad en un espacio y tiempo determinado (Fajardo-Gutiérrez 2017).

Las tasas de morbilidad son particularmente elevadas en las zonas fronterizas del norte del país. La región de Arica y Parinacota con $34 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{habs.}]}$ y la región de Tarapacá con $32,8 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{habs.}]}$ son las regiones con mayores tasas de morbilidad del país (MINSAL 2019), números particularmente altos atribuibles principalmente al flujo migrante con países como Perú y Bolivia, con tasas de incidencia de $116 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{habs.}]}$ y $105 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{hab.}]}$, respectivamente (WHO 2021a). Además, a partir del 2014, ha habido un aumento importante de población incidente de Haití y Venezuela (Canales 2019), condición que ha contribuido al aumento en la morbilidad por TB en Chile debido al escaso control médico fronterizo de ciudadanos provenientes de países con un sistema de salud tan rudimentario como el de Haití, donde la tasa de incidencia de TB se promedia a $168 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{habs.}]}$ (WHO 2021a).

Si bien, sí se solicitan chequeos médicos antes del ingreso o bien tras la llegada al país, muchas veces la línea entre la protección de la población del país que acoge y los derechos del inmigrante es delgada y los exámenes de salud obligatorios han sido criticados por organismos expertos en derechos humanos que consideran que confieren estigmatización (Balcells and Alarcón 2017).

En Chile, hasta el año 2014, la tasa de morbilidad de TB en todas sus formas fue de $13,4 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{habs.}]}$, su punto más bajo, con una tasa de reducción de la morbilidad de 1,5% anual, lo que significaría que para el año 2020 Chile habría alcanzado una morbilidad de TB de $11,2 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{habs.}]}$. Sin embargo, a partir de allí, las tasas de morbilidad subieron significativamente llegando a $15,2 \frac{[\text{casos}]}{100000 [\text{hab.}]}$ para el año 2019, aumentando la tasa de morbilidad un 13,4% en el periodo 2014 – 2019 (MINSAL 2019).

2. Tratamientos y vacunas actuales

El tratamiento actual contra TB comprende el uso de antibióticos para ayudar al sistema inmune a combatir la enfermedad. Cuando el bacilo se encuentra en una fase activa y el afectado presenta todos los síntomas de la enfermedad, las personas pueden esparcir la bacteria a sus alrededores y es muy importante que la enfermedad sea tratada. El tratamiento aplicado dependerá del historial médico que posea el enfermo basado en las posibles resistencias a antibióticos que pueda poseer, ya que el uso inadecuado de estos medicamentos ha potenciado al patógeno a mutar y generar cepas de TB resistentes a múltiples drogas (TB-MDR), inhabilitando la acción de los medicamentos más poderosos que existen contra la enfermedad, siendo un tema de preocupación mundial que no puede ignorarse (Singh and Chibale 2021).

La resistencia a los medicamentos aparece como consecuencia inevitable del uso de drogas. La aparición de cepas de TB-MDR es consecuencia del uso indebido de los antibióticos en el paciente a tratar. Diagnósticos tardíos, la administración de regímenes terapéuticos inadecuados por parte de los agentes de salud en regiones con sistemas de salud precarios y la falta de adherencia al largo tratamiento son los principales factores que originan resistencia a los medicamentos (Singh et al. 2020).

Para pacientes que padecen TB por primera vez se aplica un cóctel de 4 antibióticos de primera línea (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) por un periodo de 6 meses, aunque en algunos países se aplica un régimen de 8 meses. Si el paciente es reincidente entonces se debe determinar la resistencia a las drogas de primera línea previamente al inicio del tratamiento y dependiendo del resultado se determina si se debe aplicar o no un tratamiento para TB-MDR (WHO 2010). Los tratamientos contra TB-MDR deben ser diagnosticados apropiadamente y los protocolos de diagnóstico y tratamiento están descritos por la OMS en directrices consolidadas sobre el tratamiento de la TB farmacorresistente (WHO 2019).

Con relación a la prevención de la enfermedad, la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA), la agencia evaluadora de drogas nuevas más relevante del mundo dispone para su uso en humanos una única vacuna antituberculosa aprobada: el Bacilo de Calmette y Guérin (BCG). La vacuna BCG es creada a partir de la cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis*, una bacteria que afecta a los bovinos y comparte más de un 90% de homología con Mtb, la cual ha sido atenuada para ser usada como vacuna en humanos (Fatima et al. 2020).

A pesar de que la vacuna se comenzó a utilizar en 1921 (Luca and Mihaescu 2013), no se ha logrado erradicar la enfermedad del planeta, a diferencia de otras enfermedades tales como la viruela en 1980 o la peste bovina en 2011 según la OMS y la Organización Mundial de Sanidad Animal, respectivamente, lo que ha puesto en discusión la efectividad protectora de la vacuna BCG, la cual proveería sólo protección parcial (Katelaris et al. 2020).

Diferencias contradictorias se han encontrado en grupos de personas vacunadas con BCG y monitoreadas por un periodo de 20 años, en donde 54.239 niños de entre 14 a 15 años del Reino Unido demostraron una eficacia en la protección del 77% (Hart and Sutherland 1977) mientras que, en Estados Unidos se realizaron dos estudios: uno con 191.827 niños de entre 1 a 18 años vacunados de Puerto Rico y otro con 64.136 niños de cinco años realizado en Georgia y Alabama, en donde se demostró una efectividad protectora de tan sólo un 16% en Puerto Rico y un 29% en Alabama y Georgia (Comstock et al. 1974; Comstock et al. 1976).

Un factor importante a considerar en la interpretación de los resultados de eficacia es el hecho de que BCG no es una única cepa farmacológicamente bien definida, sino que es un conjunto de diferentes cepas hijas, que han adquirido variaciones fenotípicas y genotípicas durante el tiempo transcurrido en cultivo *in vitro* en diferentes laboratorios (Bottai and Brosch 2016). Las cepas distribuidas en el mundo tienen distintos niveles de virulencia las cuales están relacionadas con duplicaciones y deleciones en el genoma, en

donde cepas con mayor virulencia han mostrado un mayor grado de protección en ratones (Zhang et al. 2016).

A pesar de las contradicciones en los estudios de efectividad protectora, según meta-análisis hasta el año 2000 sin restricción etaria, BCG reduce el riesgo de contraer TB en promedio un 50% de los casos en todo el mundo, pero con un gran rango de variabilidad (Brewer 2000). Si detallamos los análisis en estudios más actuales a niños, BCG protege contra la infección de Mtb un 27% al compararse con niños que no fueron vacunados; detiene la progresión desde la infección a la enfermedad activa un 58% y por último, protege contra la enfermedad activa un 71% (Roy et al. 2014).

Estudios epidemiológicos sugieren que, para controlar la diseminación de la enfermedad, es necesaria una nueva vacuna que reemplace o potencie su efecto protector, particularmente en adolescentes y adultos. Esfuerzos a nivel mundial se realizan para desarrollar nuevas vacunas con una aplicabilidad más amplia y mejor durabilidad protectora que la BCG (Schrager et al. 2020). En la **tabla 1** se mencionan los candidatos vacunales que están actualmente en estudios clínicos, agrupados en dos categorías generales: vacunas derivadas de célula completa de *Mycobacterium* y vacunas de subunidades, dirigidas a un número limitado de antígenos seleccionados.

Esta evidencia ha llevado al planteamiento de varias hipótesis para explicar las fallas en la vacunación contra la TB. Estas incluyen: condiciones climáticas, las bases genéticas del huésped, la edad en la que la vacuna fue administrada y la cepa de BCG utilizada (Abubakar et al. 2013). La exposición previa a ambientes de micobacterias, lo cual es bastante común en condiciones climáticas tropicales, encabeza a las hipótesis que comprometen la protección ofrecida por la vacunación con BCG (Fatima et al. 2020). De esta manera, se evidencian las limitaciones de la vacunación con BCG en la protección y restricción de la transmisión de Mtb (WHO 2021a).

Origen de <i>Mycobacterium</i>		Modificación o inactivación	
Vivas atenuadas			
VPM1002 (Nieuwenhuizen et al. 2017)	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG-Prague	Eliminación del gen para ureasa C. Expresa listerolisina de <i>L. monocytogenes</i> para crear poros en el fagosoma	
MTBVAC (Gonzalo-Asensio et al. 2017)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Eliminación de genes de virulencia <i>phoP</i> y <i>fadD26</i>	
BCG booster revaccination (Nemes et al. 2018)	<i>Mycobacterium bovis</i>	Pasajes seriados de cultivo con selecciones poco virulentas	
Inactivadas o extracto			
<i>M. Vaccae</i> (Yang et al. 2011)	<i>Mycobacterium vaccae</i>	Muerta por calor	
MIP (Saqib et al. 2016)	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>	Muerta por calor	
DAR-901 booster (von Reyn et al. 2017)	<i>Mycobacterium obuense</i>	Muerta por calor	
RUTI (Nell et al. 2014)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Fragmentos de Mtb encapsulados en liposomas	
	Antígeno	Adyuvante o vector viral	Descripción
Proteína + adyuvante			
M72/AS01 _E (Tait et al. 2019)	Rv1196/Rv0125	AS01	Ambos antígenos fusionados e involucrados en la evasión del sistema inmune. Formación liposomal. Dirigido a TLR-4
H56:IC31 (Luabeya et al. 2015)	ESAT-6, Ag85B, Rv2660c	IC31	Adyuvante dirigido a TLR-9. Uso de péptidos antibacteriales y oligos sintéticos
ID93/GLA-SE (Penn-Nicholson et al. 2018)	Rv2608, Rv3619, Rv3620, Rv1813	GLA-SE	3 antígenos pertenecen a factores de virulencia y 1 a latencia. El adyuvante es un agonista al TLR-4
GamTBvac (Tkachuk et al. 2017)	Ag85A, CFP-10, ESAT-6	CpG, ODN	Adyuvante agonista a TLR-9. La proteína de fusión tiene un dominio de unión a dextrano inmovilizado
H1:IC31 (Mearns et al. 2017)	Ag85B/ESAT-6	IC31	Antígenos en una proteína de fusión con adyuvante hacia TLR-9
AEC/BC02 (Lu et al. 2015)	ESAT-6/CFP-10, Ag85B	CpG, sal de aluminio	CFP-10/ESAT-6 son una proteína de fusión, agregados en conjunto con Ag85B y los adyuvantes
Proteína + vector viral			
Ad5Ag85A (Smaill and Xing 2014)	Ag85A	Ad5	Vector adenoviral humano serotipo 5, expresando Ag85A
ChAdOx1 85A + MVA85A boost (Stylianou et al. 2015)	Ag85A	ChAdOx1, MVA	Utilización de adenovirus de chimpancé y el virus vacuna modificado de Ankara
TB/Flu-04L (Sergeeva et al. 2017)	Ag85A, ESAT-6	Flu-04L	Utilización del virus H1N1 deficiente de la influenza

Tabla 1. Actuales candidatos vacunales preventivos contra TB en fase clínica.

RESPUESTA INMUNE Y TUBERCULOSIS.

1. Elementos del sistema inmune.

Ante la intrusión de un agente foráneo el primer sistema de defensa del ser humano es el sistema inmune innato, el cual se encarga de obstaculizar la entrada de microorganismos y eliminar o limitar el crecimiento de muchos de ellos. El sistema inmune innato detecta patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) y patrones moleculares asociados a daños (*damage-associated molecular patterns*, DAMP) (Roh and Sohn 2018) a través de los receptores para el reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*, PRR), los cuales están ubicados en la superficie, en las vesículas fagocíticas y en el citosol de varios tipos celulares, todas las cuales son localizaciones donde se podrían encontrar microbios, activándose así el reclutamiento de leucocitos y proteínas plasmáticas de la sangre para acumularlas en el sector de intrusión del patógeno (Li and Wu 2021). Este mecanismo de reconocimiento y acción promueve las funciones antimicrobianas y proinflamatorias de las células en las que se expresan. Sin embargo, los patógenos han evolucionado para evadir la respuesta inmune innata a través de mutaciones sin afectar su propia supervivencia (Aguirre-Garcia et al. 2018).

Si el sistema inmune innato es sobrepasado se activa el sistema inmune adaptativo, una defensa más potente y especializada que consiste en el reconocimiento de elementos extraños para su eliminación en un subsecuente encuentro. La respuesta inmune adaptativa proporciona al sistema inmunitario la capacidad de reconocer y recordar patógenos específicos a través del reconocimiento de sus antígenos, ofreciendo respuestas más potentes cada vez que el patógeno es reencontrado (Murphy and Weaver 2017).

Los principales efectores del sistema inmune adaptativo son células especializadas denominadas linfocitos T y B, cuya respuesta es específica para cada antígeno. Ante una primera exposición a un antígeno o respuesta primaria, los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas para producir inicialmente anticuerpos de baja afinidad, un formato

polivalente que permite reconocer una mayor cantidad de antígenos a costa de menor especificidad (St John and Rathore 2019). A medida que se va desarrollando la respuesta inmune adaptativa, en los linfocitos B ocurre un proceso de activación, proliferación e interacción con los linfocitos T CD4⁺ o T cooperadores (*T helper*, T_H), diferenciándose a células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad (IgG, IgA, IgE) a través del proceso de hipermutación somática en los genes de las inmunoglobulinas y del desarrollo de la selección clonal (Chi et al. 2020).

Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas (Ig), son proteínas circulantes que se producen en respuesta a la exposición de antígenos, utilizadas por el sistema inmune para identificar y neutralizar elementos extraños, tales como bacterias, virus, hongos o parásitos. Como se muestra en la **figura 1**, todas las moléculas de anticuerpos comparten las mismas características estructurales básicas, pero muestran una variabilidad acentuada en las regiones donde se unen los antígenos y, según su asociación, pueden llegar a formar monómeros, dímeros o pentámeros (Ma and O'Kennedy 2015).

Una típica molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, posee dos copias de cada una de sus cadenas: la cadena liviana (~24 kDa) y la cadena pesada (~55 kDa). Las cadenas se unen de tal manera que crean una estructura tridimensional unidas al centro por un enlace flexible que funciona como “bisagra”, evidenciándose tres dominios estructurales: el fragmento cristalizante (Fc), región que interactúa con los receptores de superficie celular y proteínas del sistema de complemento y es la misma para todos los anticuerpos de una clase; y dos fragmentos de unión a antígeno (Fab), regiones que definen la especificidad del anticuerpo por contener secciones altamente variables. La región variable de ambos brazos es la encargada de la unión al antígeno (Ma and O'Kennedy 2015; Stanfield and Wilson 2014).

Los anticuerpos son sintetizados por las células plasmáticas, existiendo diferentes isotipos de anticuerpos basados en la estructura de cadena pesada que posean. Se conocen cinco clases diferentes de isotipos en humanos que desempeñan funciones diferentes:

IgM, IgA, IgG, IgE e IgD; las cuales contribuyen a dirigir la respuesta inmune adecuada para cada ocasión. Los anticuerpos producidos tras el primer contacto con el antígeno son de baja afinidad, generalmente IgM, y se generan mediante un mecanismo independiente del centro germinal. Los centros germinales son microestructuras anatómicas que aparecen en los folículos linfoides durante la respuesta inmunitaria y en las que se produce la colaboración con los linfocitos T (Shlomchik and Weisel 2012).

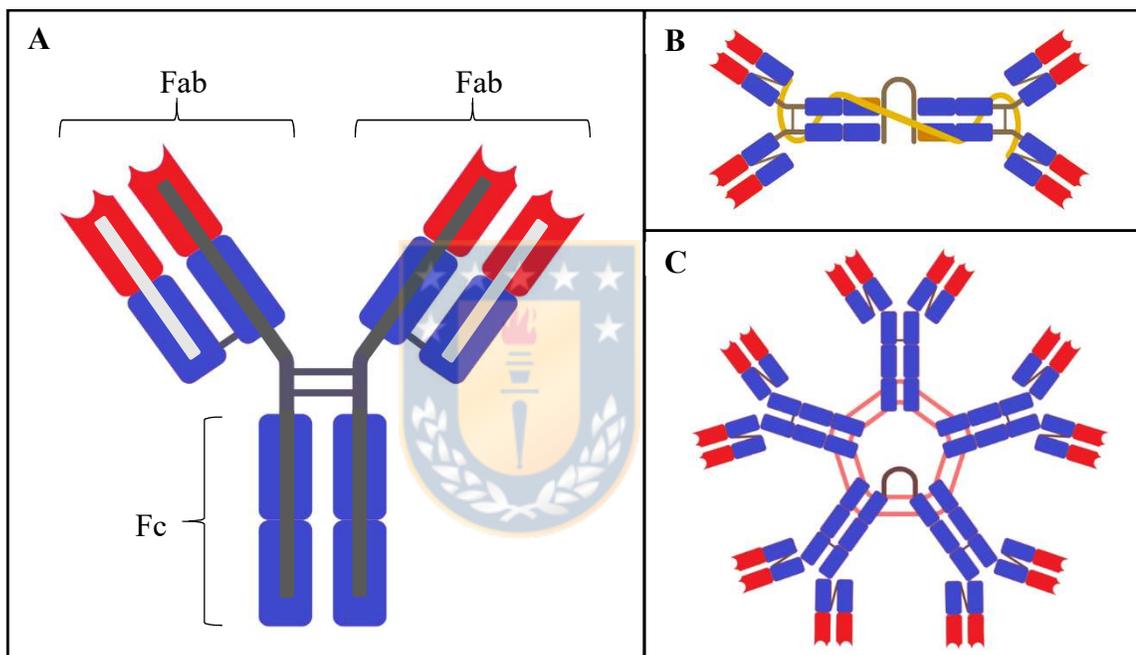


Figura 1. Moléculas de anticuerpos.

(A) Estructura esquemática de una molécula de anticuerpo monomérica (IgG). Un anticuerpo está compuesto por dos idénticas cadenas pesadas (gris) y dos idénticas cadenas livianas (blanco). Además, cada cadena tiene una región constante (azul) y una región variable (rojo). (B) Asociaciones multiméricas, tales como IgA pueden formar dímeros mientras que asociaciones como (C) IgM pueden formar pentámeros.

Una nueva exposición al mismo antígeno produce una respuesta inmune secundaria, la cual es más rápida y duradera e implica la producción de distintas clases de anticuerpos de alta afinidad. Tal efecto se logra con la diferenciación de linfocitos B a linfocitos B de memoria y células plasmáticas de larga duración, lo cual tiene lugar tras

su interacción con otros elementos del sistema inmune al interior del centro germinal (Suan et al. 2017).

Esta capacidad que tienen los linfocitos B para producir diferentes isotipos de anticuerpos proporciona una gran plasticidad en las respuestas inmunitarias adaptativas, permitiendo la generación de anticuerpos específicos para las diferentes funciones efectoras. Este cambio de isotipo en respuesta a los diferentes tipos de estímulo está mediado por los linfocitos T_H foliculares (Crotty 2019).

Los T_H están divididos en varias subclases que tienen diferentes funciones dependiendo del tipo de infección existente en el organismo. Para inducir la diferenciación a cada subclase son necesarias las citoquinas, un mensajero hormonal encargado de amplificar y dirigir la generación de un apropiado patrón de inmunidad para combatir amenazas al organismo. Dependiendo del tipo de citoquina secretada, los linfocitos T_H se pueden diferenciar en siete subclases: T_H1 , T_H2 , T_H17 , T_HF (T_H foliculares), T_H9 , T_H22 y T reguladores (Holdsworth and Gan 2015).

La diferenciación de células T_H en T_H1 , T_H2 o T_H17 ocurre después de un contacto directo con las células presentadoras de antígenos (CPA). Las CPA, específicamente la célula dendrítica (CD), interacciona con el patógeno y lo reconoce de acuerdo a su naturaleza a través de los PAMP que posea el organismo y por los DAMP que se hayan provocado, por medio de los PRR de la CD (Li and Wu 2021; Roh and Sohn 2018).

Existen cinco clases de PRR: los receptores tipo Nod (Kim et al. 2016), receptores de lectina tipo-C (Brown et al. 2018), receptores tipo AIM2 (Man et al. 2016), receptores tipo RIG-I (Rehwinkel and Gack 2020) y los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR), siendo estos últimos los más conocidos (Fitzgerald and Kagan 2020). Estos receptores se encargan de detectar factores derivados de patógenos y transducir señales de activación en las células, iniciando la respuesta adaptativa (Li and Wu 2021).

Una vez que una CD inmadura ha entrado en contacto con el patógeno, las distintas señales obtenidas por la interacción de sus receptores con todos los factores asociados a la invasión de un agente foráneo provocan la maduración y migración de la CD hacia los órganos linfoides, lugar donde interactúan con las células T vírgenes, promoviendo su diferenciación. La estimulación ocurre por parte de la CD al presentar el antígeno a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) hacia la célula T por medio del receptor de célula T (*T-cell receptor*, TCR) y las diferentes señales polarizantes (mayormente citoquinas), que selectivamente promueven la diferenciación hacia una respuesta T_H1 , T_H2 o T_H17 (Kaiko et al. 2008).

La respuesta T_H1 se caracteriza por la secreción de interleuquina (IL) 12 por parte de las CD y macrófagos, induciendo a las T_H la producción de interferón gama ($INF-\gamma$), sirviendo como una señal autocrina para generar una retroalimentación positiva y seguir produciendo $INF-\gamma$. La producción de IL-12 también activa las células asesinas naturales (*natural killer*, NK) para liberar $INF-\gamma$, potenciando aún más la producción de IL-12. Además, $INF-\gamma$ actúa como un inhibidor de la vía T_H2 , previniendo la proliferación de esa subclase de linfocitos $CD4^+$ (Annunziato and Romagnani 2009).

Esta respuesta está dirigida a la destrucción de organismos invasores intracelulares. Para este fin, los macrófagos son activados y tienen la tarea de destruir a los microbios fagocitados gracias a la acción de especies reactivas al oxígeno, óxido nítrico y enzimas lisosómicas en el interior de estos (Weiss and Schaible 2015). También se estimula la producción de anticuerpos para facilitar la detección de los patógenos circulantes y se promueve la inflamación local, aumentando la atracción neutrófilos y más macrófagos.

Por otra parte, la respuesta T_H2 se considera la acción contra parásitos e involucra principalmente la acción de IL-4, liberada por mastocitos. IL-4 induce la diferenciación de los linfocitos T_H y promueve la síntesis de IL-4 con el fin de generar una retroalimentación positiva y continuar su producción. El resultado es la generación del

fenotipo típico de una respuesta T_{H2} , caracterizado por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. IL-4 inhibe la expresión del receptor de IL-12 y, por consiguiente, el desarrollo de una respuesta T_{H1} (Paul and Zhu 2010).

Los parásitos, de mucho mayor tamaño que los macrófagos, son imposibles de fagocitar y por ende el sistema inmune promueve la producción del anticuerpo especializado IgE a través de la producción de IL-4. Mastocitos y eosinófilos, activados por IL-5, se unen a la porción Fc del anticuerpo y destruyen al parásito por acción de las enzimas que estos tipos celulares poseen (Ravin and Loy 2016). Finalmente, IL-13 se encarga de la producción de moco, el cual ayuda a expeler los organismos muertos fuera del cuerpo (Herbert et al. 2019).

Con relación a los linfocitos T_{H17} , su diferenciación comienza con la estimulación de los linfocitos T_H vírgenes por el factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*, TGF- β) e IL-6, citoquinas secretadas por las CD. La citoquina IL-21 también puede estimular la diferenciación en conjunto con TGF- β . IL-21 es luego secretada por los mismos linfocitos T_{H17} para autopotenciarse. La diferenciación T_{H17} la inhiben el INF- γ y la IL-4, por lo tanto, las respuestas T_{H1} y T_{H2} fuertes tienden a suprimir el desarrollo de linfocitos T_{H17} (Zhang 2018).

Los linfocitos T_{H17} se encargan de combatir infecciones extracelulares. Esto lo realizan a través del reclutamiento de leucocitos, sobre todo neutrófilos, en las zonas de infección. El principal objetivo de esta respuesta es eliminar bacterias extracelulares y hongos con la mediación de IL-17, citoquina secretada por los linfocitos T_{H17} con el propósito de estimular la producción de sustancias antimicrobianas y de reclutar neutrófilos (Iwakura et al. 2011).

Por otro lado, los linfocitos T_{HF} son un tipo especial de linfocitos $CD4^+$ que se han especializado en servir de apoyo al desarrollo de los linfocitos B. Estos linfocitos residen en los nódulos linfoides y el bazo con el fin de interactuar con los linfocitos B, a

diferencia de linfocitos como T_{H1} , T_{H2} o T_{H17} ; destinados predominantemente a dejar el tejido linfoide y desplazarse a sitios de infección o inflamación (Vinuesa et al. 2016).

2. Generación de memoria contra antígenos.

Las células T_{HF} desempeñan un papel fundamental en la mediación de la selección y la supervivencia de las células B. Estas intervienen en la activación de linfocitos B, su diferenciación, proliferación e incluso su muerte (Crotty 2019). La mayoría de los linfocitos B activados por los linfocitos T_{HF} se diferencian a células secretoras de anticuerpos, pero una fracción de linfocitos B adquieren la capacidad de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados. A estos tipos de linfocitos B se les denomina linfocitos B de memoria (Kurosaki et al. 2015). Los linfocitos B de memoria son fundamentales al momento de generar una respuesta inmune adaptativa secundaria, debido a que la reacción de estos linfocitos al mismo antígeno lleva a la producción de mayores cantidades de anticuerpos específicos en menor tiempo (Palm and Henry 2019).

Como se muestra en la **figura 2**, existen dos fases en la adquisición de memoria por las células B. La primera fase parte con una célula B virgen circulante en busca de antígenos, la cual capta uno a través del receptor de célula B (*B cell receptor*, BCR). El linfocito B procesa el antígeno y lo presenta a los linfocitos T_{HF} , los cuales se encargan de viajar a los folículos B para interactuar con otros linfocitos B vírgenes y promover la proliferación y diferenciación (Crotty 2019). Estos linfocitos B vírgenes pueden diferenciarse en tres clases de células: células plasmáticas de corta duración, células B de memoria independientes de centro germinal, y células B de centro germinal (B_{CG}).

La segunda fase comienza con la entrada del linfocito B_{CG} a la zona oscura del centro germinal, la cual está ubicada en los folículos B. El linfocito entonces sufre proliferación e hipermutación somática, generando variabilidad en el BCR de los linfocitos B_{CG} . Posteriormente los linfocitos B_{CG} viajan a la zona clara del centro germinal donde son expuestos al antígeno gracias a la acción de CD foliculares (Akkaya et al. 2020).

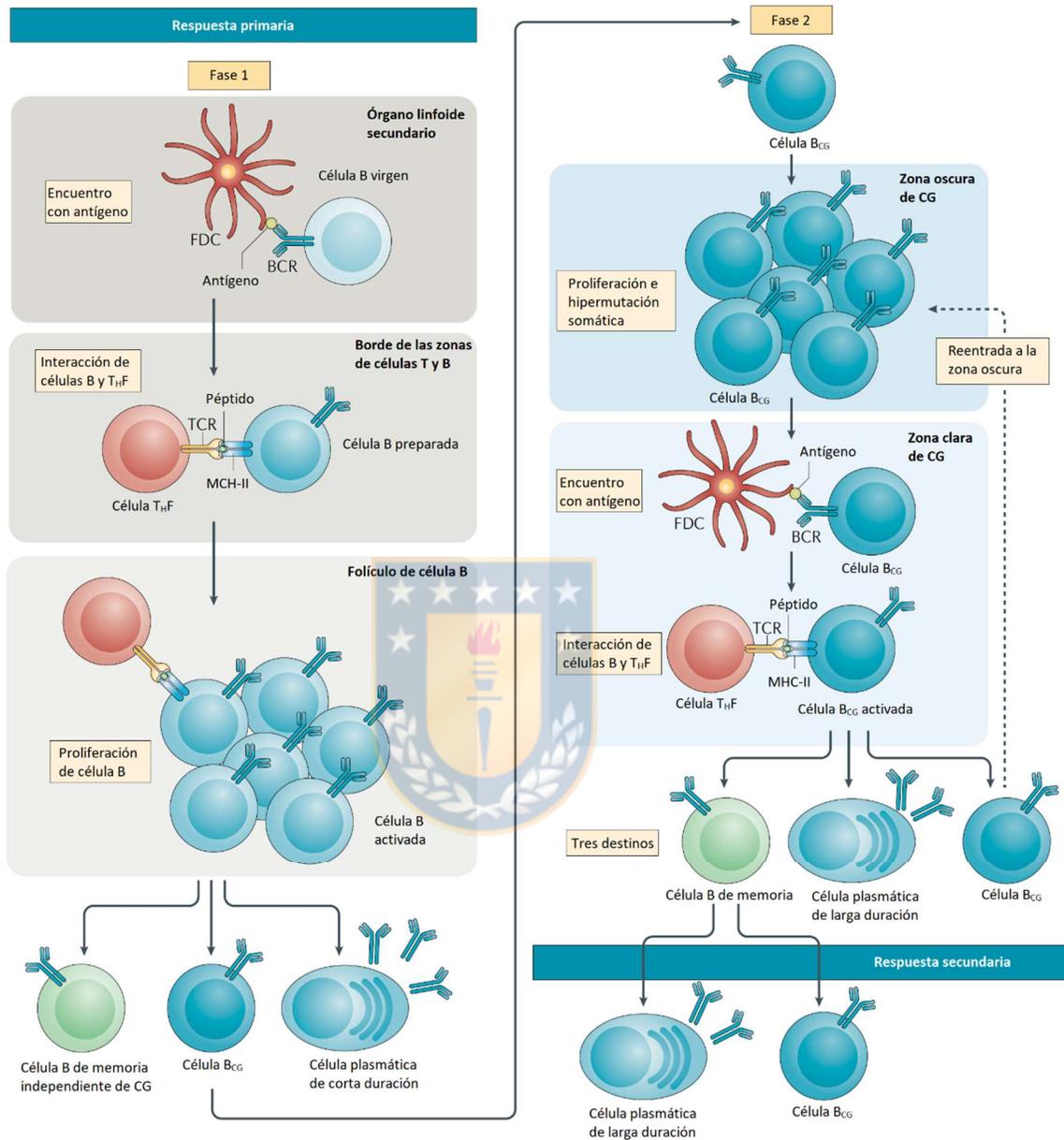


Figura 2. Las dos fases en la adquisición de las células B de memoria.

La fase 1 genera células plasmáticas de corta duración que producen anticuerpos de baja afinidad. Además, produce células B que migran al centro germinal, entrando a la fase 2, donde sufren proliferación e hipermutación somática, siendo seleccionados los que presenten mejor afinidad por el antígeno, para finalmente producir células plasmáticas de larga duración y linfocitos B de memoria.

Esquema traducido de Akkaya et al. 2020.

En algunas células B, el BCR mutado tendrá menor o nula afinidad por el antígeno, mientras que en otras células B_{CG}, el BCR mutado tendrá mayor afinidad por el antígeno al poder capturarlo desde las CD foliculares, permitiendo la selección de los linfocitos con mejor afinidad y llevar a cabo la presentación del péptido a los linfocitos T_HF. La interacción de los linfocitos T_HF con los linfocitos B_{CG} permite la activación de estos últimos y promover su proliferación y diferenciación hacia dos clases de células: células plasmáticas de larga duración y células B de memoria dependientes de centro germinal (Akkaya et al. 2020).

Las células plasmáticas, tanto las de larga como de corta duración, tienen la función de producir anticuerpos. Su diferencia radica en el tipo de anticuerpos que producen y su duración. Las células plasmáticas de corta duración se encargan de producir anticuerpos de baja afinidad y tienen una vida media de 3 a 5 días, mientras que las células plasmáticas de larga duración secretan anticuerpos de alta afinidad y tienen un tiempo de vida que varía desde algunos meses hasta toda la vida (Hoyer and Radbruch 2017).

Los linfocitos B de memoria son células que ya han madurado su afinidad y cambiado los isotipos de cadena pesada, pero no secretan anticuerpos. El propósito de ellas es crear una “memoria inmunológica” que sea capaz de reconocer rápida y eficazmente al antígeno memorizado frente a una reexposición (Kurosaki et al. 2015).

Al comienzo de la respuesta secundaria, las células B de memoria ya han hecho el cambio de clase desde IgM hacia algún otro isotipo, expresando IgG, IgA o IgE en su superficie. Las células B de memoria presentan antígenos de manera más eficiente que las células B vírgenes, permitiendo su diferenciación a células plasmáticas de manera temprana y produciendo anticuerpos específicos contra el agente invasor (Akkaya et al. 2020). En consecuencia, la respuesta secundaria es caracterizada por ser más vigorosa y temprana en la generación de células plasmáticas, produciéndose cantidades abundantes de anticuerpos con gran afinidad contra el antígeno de manera casi inmediata. Además, dentro de sus propiedades se encuentra su gran longevidad, donde vacunaciones e

infecciones son conocidas por generar poblaciones estables de células B de memoria (Palm and Henry 2019), siendo esto la base del funcionamiento de las vacunas.

Para reconocer un agente foráneo de manera específica, el sistema inmune sólo necesita reconocer al epítopo y no al agente completo (Stanfield and Wilson 2014). Los epítopos son las regiones del antígeno reconocidas por los anticuerpos, por las células B a través del BCR y por las células T a través del TCR. Los epítopos de células B se basan en la estructura lineal y tridimensional del antígeno invasor, mientras que los epítopos de células T corresponden a secciones del antígeno ya procesado por las CPA y presentados a través del CMH, por lo tanto, los epítopos de células B y T no son necesariamente iguales (Sanchez-Trincado et al. 2017).

Hay casos donde el antígeno puede no llegar a ser suficientemente inmunogénico como para activar a los linfocitos T_H. En consecuencia, un antígeno de baja inmunogenicidad no provoca el cambio de clase de anticuerpos y no se genera memoria (Akkaya et al. 2020).

También debe considerarse que un mismo epítopo puede provocar diferentes reacciones inmunológicas dependiendo del polimorfismo presente en el CMH. El CMH, una estructura que básicamente permite distinguir lo propio de lo extraño, es inmensamente polimórfico. En humanos, este es codificado por un complejo de genes ubicados en el cromosoma seis a los que se les denomina el sistema de “antígenos leucocitarios humanos” (HLA). Cada individuo posee un haplotipo particular de alelos que determinan la configuración del HLA que presenta. Existe una gran variedad de alelos para el CMH-I y el CMH-II. Los alelos más comunes en la humanidad según la *Allele Frequency Net Database* (AFND) se encuentran en los loci A, B, C, DR, DQ y DP (Gonzalez-Galarza et al. 2019).

Cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta inmune se dice que es inmunogénica y es llamada inmunógeno. Existen diferencias operacionales entre un inmunógeno y un antígeno, ya que todos los inmunógenos son antígenos, pero no todos

los antígenos son inmunógenos (Ilinskaya and Dobrovolskaia 2016). Para que antígenos con poca o nula inmunogenicidad provoquen una respuesta inmune, deben ser administrados en conjunto con un adyuvante o con un *carrier* o con ambos a la vez (Kuroda et al. 2013; Micoli et al. 2018).

Un adyuvante es cualquier sustancia que, mezclado con el antígeno, mejora la inmunogenicidad de este. Para mejorar la inmunogenicidad, los adyuvantes pueden convertir a los antígenos en material particulado, facilitando la fagocitosis por las CPA. Además, los adyuvantes contienen PAMP, lo que provoca una fuerte respuesta inmune innata y estimula la producción de citoquinas. Esto promueve la activación de las CPA y el desarrollo de la respuesta inmune (Kuroda et al. 2013).

No todas las moléculas generan una respuesta inmunogénica. Moléculas muy pequeñas por lo general son incapaces de provocar alguna respuesta inmunogénica por sí solas. Este tipo de moléculas, denominadas haptenos, pueden ser acopladas a un *carrier*, volviéndose inmunogénicas, conocido como el efecto hapteno-*carrier* (Micoli et al. 2018). Los *carrier* son moléculas de mayor tamaño que los haptenos, los cuales pueden ser proteínas (Pichichero 2013) u otros nanomateriales, tales como el óxido de grafeno (Cao et al. 2020). Los *carrier* tienen la facultad de acoplar antígenos pobres en inmunogenicidad, a través de unión covalente o de manera conjugada, con el propósito de levantar una respuesta inmune fuerte contra los antígenos acoplados (Henry et al. 2015).

Esto ocurre porque una proteína *carrier* puede llevar múltiples grupos haptenos, lo que permite su unión por medio del BCR y activar linfocitos T a través de los péptidos u otros elementos inmunogénicos del *carrier*, generando una respuesta inmune al hapteno (Gefen et al. 2015).

Para provocar la generación de memoria mediante el uso de *carrier* se debe inducir la maduración de la afinidad y la formación de linfocitos B de memoria. Estos dos fenómenos sólo se producirán si el complejo hapteno-*carrier* activa los linfocitos T_H de modo similar al ejecutado por las vacunas (Akkaya et al. 2020).

3. Inmunidad mucosal.

Considerando que Mtb es un patógeno que ataca las mucosas de las vías aéreas, es necesario generar una respuesta inmune adaptativa con altos niveles de anticuerpos especializados en mucosas, con el fin de provocar una respuesta inmune más efectiva y la generación de memoria (Palm and Henry 2019).

La producción de anticuerpos específicos podría funcionar como anticuerpos neutralizantes en bacterias que aún no ingresan a las células ya que la unión de las bacterias a las superficies mucosas es el primer paso en la patogénesis de la mayoría de las enfermedades infecciosas, por lo que se ha sugerido que la mucosa es el órgano inmune más importante contra la infección por Mtb (O'Garra et al. 2013).

En las mucosas, la inmunidad humoral está mediada principalmente por IgA (Brandtzaeg 2013). Esta inmunoglobulina es la clase predominante de anticuerpo en las secreciones de las mucosas del organismo tales como saliva, lágrimas, calostro, leche y secreciones respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias. En la sangre, se encuentra predominantemente como una molécula monomérica, mientras que en las mucosas se encuentra mayoritariamente formando dímeros, jugando así un papel importantísimo en la respuesta inmune de las mucosas (de Sousa-Pereira and Woof 2019).

En la respuesta inmune contra Mtb, se ha descrito el papel protector y la participación de IgA en el tejido mucoso. Este anticuerpo participaría en la inhibición de la adherencia bacteriana, la neutralización de toxinas y virus, y en la prevención de la absorción de antígenos por las células epiteliales (Brandtzaeg 2013).

Para comenzar la generación de la respuesta inmune mucosal, es necesario que los antígenos lleguen a las zonas de inicio o zonas inductoras (Placas de Peyer y folículos linfoides), en donde se disponen de elementos semejantes a los componentes del sistema inmune sistémico para realizar la captación de los antígenos e iniciar la respuesta inmune (Murphy and Weaver 2017), salvo una diferencia: las células M, las cuales son células

epiteliales especializadas en el transporte de antígenos. En la **figura 3** se describe la acción de las células M como parte del sistema inmune mucosal. Las células M están ubicadas en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), tejido que suele ser subclasificado de acuerdo a la ubicación del tejido linfoide, como por ejemplo GALT: tejido linfoide asociado al intestino; NALT: tejido linfoide asociado a vías nasales; BALM: tejido linfoide asociado a bronquios, entre otros (Mabbott et al. 2013; Dlugonska and Grzybowski 2012).

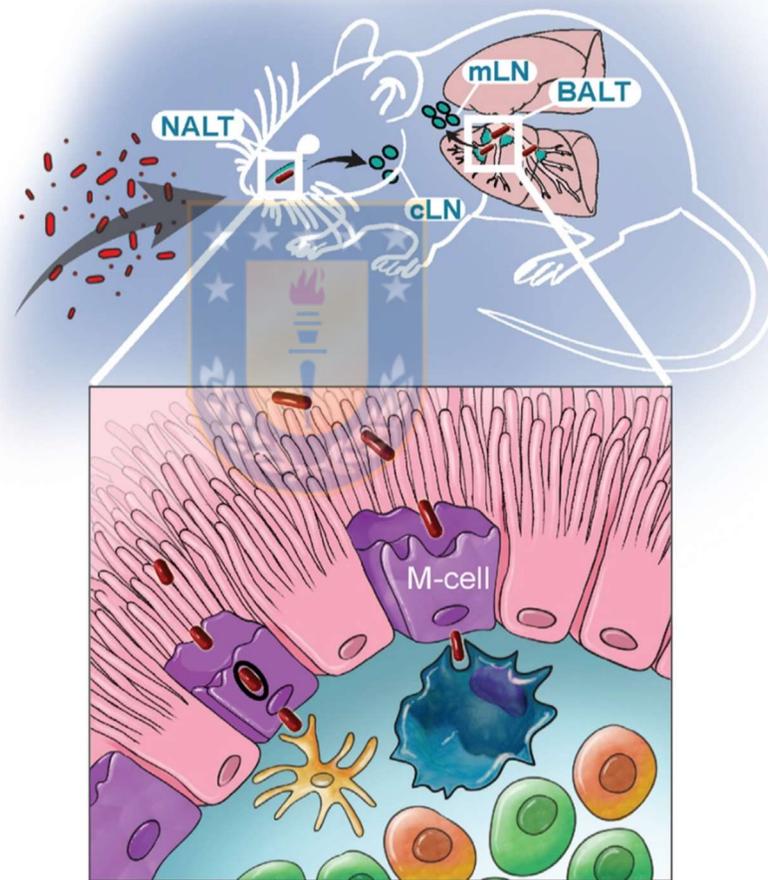


Figura 3. Características morfológicas de células M.

Diagrama de las características morfológicas de las células M. Es notable la carencia de microvellosidades y la presencia de bolsillos que permiten la permanencia de un fagocito y un linfocito.

Nair et al. 2016

Las células M no actúan enzimáticamente sobre los antígenos, sino que son captados y translocados completamente intactos hacia linfocitos T intraepiteliales o pasando por el espacio intercelular en donde se transfiere el antígeno a las células presentadoras (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) presentes en el espacio subepitelial o en la lámina propia (Nair et al. 2016).

La producción de IgA secretora contra un antígeno depende tanto de las células M como de las células dendríticas subyacentes, y por consecuencia, de la activación de los linfocitos T_H y el cambio de clase de los linfocitos B (Mantis et al. 2011). De este modo, es imperioso que el antígeno a inmunizar sea captado por las células M para inducir una respuesta inmune mucosal (Lavelle and Ward 2022). La alta actividad de transcitosis de las células M dentro de la mucosa las convierte en blancos atractivos para la administración de antígenos en la mucosa, donde la acción de un péptido señal podría lograr el objetivo.

Un péptido señal corresponde a una secuencia aminoacídica corta, generalmente entre 5 a 20 aminoácidos que tiene por función decidir sobre el destino, ruta de transporte y la eficiencia de secreción de una proteína (Owji et al. 2018). La caracterización de la función de los péptidos señal ha permitido encontrar péptidos con gran variedad de funciones, encontrándose un péptido con afinidad por las células M. Sae-Hae Kim y colaboradores probaron varios péptidos y encontraron que algunos de ellos eran captados por las células M, además de mejorar la respuesta inmune generada contra el antígeno al cual estaba fusionado este péptido. El péptido denominado Co1, resultó obtener los mejores resultados (Kim et al. 2010) y es actualmente considerado un ligando al receptor del complemento 5a de las células M (Kim et al. 2018).

4. Inmunopatología en tuberculosis.

Para el caso con TB, la respuesta inmunológica se ve diezmada por el modo de ataque del bacilo, de hecho, la capacidad que posee Mtb para sobrevivir dentro de las

células fagocíticas promueven la permanencia del patógeno de manera silente y persistente (Jung et al. 2019).

La enfermedad con Mtb se desarrolla mayormente en fase de latencia, manteniéndose por periodos prolongados de tiempo dentro de los individuos sin síntomas de la enfermedad (Gupta and Srivastava 2012). En una pequeña fracción de la población, el estado de latencia pasa a un estado activo en donde, por factores tanto del microorganismo como del sistema inmune del infectado, la enfermedad se reactiva y los síntomas reaparecen (Delogu et al. 2013).

La infección en humanos con Mtb ocurre cuando el bacilo es inhalado por microgotas en aerosol del aire y logra entrar a los pulmones. Cuando el patógeno es inhalado, Mtb se encuentra con la primera línea de defensa del organismo consistente principalmente de fagocitos. Si las defensas logran eliminar a Mtb rápidamente, entonces la infección es abortada. De no ser así, los fagocitos son infectados y Mtb se reproduce al interior de ellos (de Martino et al. 2019). El desarrollo de la enfermedad consta de tres etapas: una fase replicativa inicial, caracterizada por la multiplicación de Mtb dentro de los macrófagos que los fagocitan. Una vez que el sistema inmune responde comienza la segunda etapa: etapa de latencia (TB latente), donde la replicación bacteriana es controlada en la mayoría de los casos (90 – 95%) y desaparecen los síntomas de la enfermedad, periodo en el cual disminuye la maquinaria metabólica del bacilo, estableciéndose un equilibrio dinámico entre Mtb y el sistema inmune del infectado. Finalmente, puede llegar la etapa de reactivación, transformándose la TB latente en una TB activa, la cual es ocasionada por factores promotores de la resucitación (Gupta and Srivastava 2012) en conjunto con el debilitamiento del sistema inmune, donde la replicación de la bacteria se reestablece a niveles normales, generándose los síntomas y daño en el tejido (Delogu et al. 2013).

Mtb es internalizado por fagocitosis en macrófagos no activados. Una vez dentro del macrófago, el patógeno reside en fagosomas tempranos y se inicia la fusión con los

lisosomas para su eliminación (Weiss and Schaible 2015). En la mayoría de los casos se consigue la destrucción de Mtb, pero si la bacteria logra sobrevivir esta primera línea defensiva, éste se reproduce al interior de los macrófagos y la infección se expande (Urdahl et al. 2011).

El éxito de Mtb está principalmente basado en su capacidad para evitar la actividad microbicida de los macrófagos. Para sobrevivir al interior de los macrófagos no activados, Mtb reduce la expresión del CMH-II de los macrófagos, previniendo el reconocimiento de ellos por los linfocitos T CD4+ (Saini et al. 2016). También se ha demostrado que Mtb previene la apoptosis de su huésped (Liu et al. 2015) e inhibe la fusión del fagosoma con los lisosomas como una de sus estrategias principales de evasión del sistema inmune (Deng et al. 2017). Al inhibir la fusión fagosoma-lisosoma, se evade la exposición al pH ácido y a las especies reactivas del nitrógeno. Una vez en el fagosoma, Mtb secreta proteínas que comprometen la estabilidad de las membranas y se translocan al citosol del macrófago (Houben et al. 2012).

Además, para evitar a los macrófagos activados, Mtb enmascara sus PAMP a través de la producción del glicolípido fenólico *phthiocerol dimycocerosate*, un componente de la pared celular que propicia el reconocimiento por macrófagos no activados por encima de los macrófagos microbicidas (Cambier et al. 2014).

Los macrófagos activados por INF- γ pueden contrarrestar la inhibición de la fusión, formando fagolisosomas que expresan especies reactivas al nitrógeno y permitiendo la destrucción del patógeno. Por el contrario, los macrófagos no activados carecen de esa propiedad y se transforman rápidamente en el nicho de Mtb, residiendo al interior de los fagosomas inmaduros (Bussi and Gutierrez 2019) y propiciando la formación del granuloma, una estructura formada por la agregación de células del sistema inmune producto de la inhabilidad para eliminar al patógeno con el propósito de contener y evitar la expansión del mismo (Williams and Fatima 2022).

En la **figura 4** se representa el granuloma tuberculoso. Este está constituido mayormente por macrófagos infectados con Mtb, los cuales conviven con neutrófilos y células dendríticas, rodeados por linfocitos T y B principalmente, concentrándose un área necrótica en el interior (Kaufmann et al. 2014).

Mtb es un microorganismo aerobio facultativo, logrando sobrevivir con o sin la presencia de oxígeno. Esto le permite a Mtb mantenerse vivo dentro del ambiente hipóxico del granuloma (Belton et al. 2016), siendo esta característica relevante para la persistencia de la infección. En respuesta al estrés ambiental, Mtb disminuye la permeabilidad de la pared celular y la engrosa, reduce su metabolismo y sobrevive en un estado parecido al de dormancia al mantener niveles bajos de replicación bacteriana, garantizando la permanencia dentro de macrófagos y células dendríticas por un tiempo mayor. De este modo, Mtb queda protegido de los mecanismos efectores extracelulares del sistema inmune en condiciones para permanecer en el estado de latencia (Kaufmann et al. 2014).

El macrófago es el principal protagonista en la formación del granuloma. A pesar de que en el granuloma se pueden encontrar múltiples actores del sistema inmune, los macrófagos son en general los más abundantes, los cuales sufren transformaciones necesarias para la formación estructural del granuloma (Pagan and Ramakrishnan 2018).

Los macrófagos del granuloma pueden progresar a una transformación epitelioides, donde adoptan una apariencia distintiva y aplanada caracterizada por tinción citoplasmática difusa, núcleos alargados y la utilización de moléculas de adhesión entre macrófagos como cadherinas (Wanat et al. 2014). Mientras el granuloma se torna más epitelial a medida que pasa el tiempo, macrófagos activados infectados no epitelioides son encontrados en la periferia del granuloma, debido a que existe un constante reclutamiento de ellos (Cronan et al. 2016).

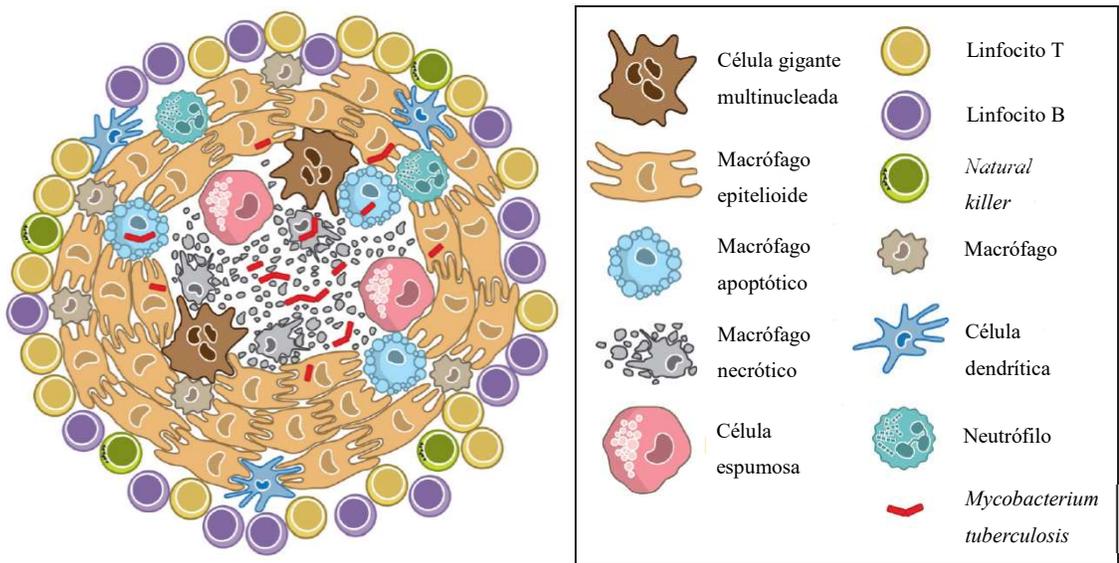


Figura 4. Granuloma tuberculoso y sus componentes celulares.

Granuloma activo de *Mtb* con necrosis central. Múltiples poblaciones de leucocitos están presentes. Macrófagos epitelioides rodean el área necrótica. Linfocitos T, B y NK se agrupan en la periferia.

Esquema traducido de Pagan and Ramakrishnan 2018

Paradójicamente, la transformación epiteliode de los macrófagos para aislar a *Mtb* en realidad beneficia a la bacteria. Una de las características que posee *Mtb* es que explota la formación del granuloma, acelerando su expansión de manera que manipula la respuesta inmune para transformar el reclutamiento de leucocitos y la muerte celular a su favor, conservando un ambiente necrótico en su interior beneficioso para su existencia en el espacio extracelular, favoreciendo la diseminación de la bacteria (Pagan and Ramakrishnan 2014).

Dentro del granuloma, la función de cada tipo celular está medianamente definida y se pueden distinguir principalmente los siguientes tipos celulares, aparte de los macrófagos: linfocitos NK, linfocitos T, linfocitos B, células espumosas, células gigantes multinucleadas y neutrófilos (Pagan and Ramakrishnan 2018).

Los linfocitos T CD8⁺ comparten funciones citotóxicas con las células NK como células efectoras capaces de destruir células infectadas y a su huésped intracelular a través de la secreción de gránulos citoplasmáticos que contienen perforinas, granzimas y granzimas. Sin embargo, los linfocitos T CD8⁺ además pueden reconocer péptidos antigénicos a través del TCR, los cuales están generalmente cargados en el CMH-I (Kaufmann 2013).

Las células NK se encargan de controlar el crecimiento bacteriano indirectamente a través de la activación de macrófagos y directamente vía mecanismos citotóxicos, destruyendo macrófagos y linfocitos infectados. Las células NK producen INF- γ , el cual puede inhibir el crecimiento intracelular de Mtb, mejorando la fusión del fagosoma y el lisosoma en los macrófagos (Allen et al. 2015).

A diferencia de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, en las células NK no hay un dominio particular para mediar el reconocimiento de agentes foráneos. Las células NK expresan una batería de receptores innatos para registrar el ambiente y responder a las alteraciones causadas por la infección, tales como el estrés y las transformaciones de células infectadas (Rosenberg and Huang 2018).

La formación de células espumosas es una manifestación adversa de la respuesta adaptativa del infectado, producto de condiciones inflamatorias crónicas. Este tipo de células contribuyen con respuestas inmunes perjudiciales produciendo mediadores proinflamatorios y acumulando material lipídico, liberando su contenido celular luego de su muerte, lo que provoca daño tisular a largo plazo. Están ubicadas cercanas al centro del granuloma y generalmente rodeadas de material necrótico, en donde su muerte contribuye a la formación del contenido caseoso. Aunque la contribución de las células espumosas a la progresión de la enfermedad está documentada, la formación de este tipo de células aun es un misterio (Guerrini et al. 2018).

Las células gigantes multinucleadas son un tipo de células asociadas principalmente a la estructura del granuloma. Estas se forman por la fusión de macrófagos

activados en respuesta a sustancias indigestibles. Su principal función es, al igual que los macrófagos, la fagocitosis y degradación de material extraño. No obstante, el propósito de este tipo celular permanece incierto, ya que, al comparar sus capacidades fagocíticas con la de los macrófagos, ésta no es significativamente diferente (Wang et al. 2020).

Los neutrófilos cumplen la función de reconocer y fagocitar al patógeno como parte del sistema inmune innato. De manera directa, los neutrófilos liberan enzimas lisosomales, α -defensinas y especies reactivas del oxígeno para lisar al agente invasor; de manera indirecta, los neutrófilos secretan citoquinas quimiotácticas para la llegada de otras células del sistema inmune (Capucetti et al. 2020). Sin embargo, se ha demostrado que Mtb interfiere en la apoptosis de los neutrófilos, evitándola y promoviendo la necrosis de ellos, lo que a largo plazo provoca daño de tejido y se torna contraproducente. Así, los neutrófilos parten siendo una respuesta crucial durante las primeras fases de la infección de TB, pero terminan siendo perjudiciales a largo plazo (Hilda et al. 2019).

La principal función de los linfocitos B es madurar la respuesta inmune adaptativa a través de la generación de anticuerpos especializados. Se ha reportado que anticuerpos IgA se producen en mayor cantidad que IgG en la infección con Mtb, bloqueando la infección en células epiteliales del pulmón (Zimmermann et al. 2016). Se ha encontrado también que las células B tienen funciones efectoras en otras células del sistema inmune. Estas se encargan de presentar antígenos a células T_H con el fin de modificar y dirigir el tipo de respuesta celular. Además, tienen funciones en la regulación del reclutamiento de neutrófilos al centro de infección (Chai et al. 2020).

La respuesta del sistema inmune adaptativo compromete principalmente a los linfocitos $T CD4^+$, jugando un rol crítico en el desenlace de la infección por Mtb. Los linfocitos T específicos contra Mtb son detectables frecuentemente después de tres semanas luego de la infección, lo que coincide con la detención de la replicación bacteriana, indicando el rol significativo del sistema inmune adaptativo dependiente de linfocitos T (Pagan and Ramakrishnan 2018).

Dos fenotipos de linfocitos T_H son esenciales para el control de Mtb: T_{H1} y T_{H17} . La respuesta inmune T_{H1} está caracterizada por la liberación de $INF-\gamma$, citoquina encargada de activar las actividades microbicidas de los macrófagos. La diferenciación T_{H17} es llevada a cabo por IL-23 y caracterizada por la liberación de IL-17, la cual es crítica para el reclutamiento temprano de neutrófilos en el sitio de la infección. Se ha demostrado el requerimiento de IL-17 en la protección contra cepas virulentas de Mtb en ratones. Ratones deficientes de esta citoquina poseen altas cargas bacterianas y menos granulomas organizados (Gopal et al. 2014).

En el proceso de control de la infección por Mtb, elevados niveles del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) son usualmente encontrados. $TNF-\alpha$ trabaja en sinergia con $INF-\gamma$, estimulando la producción de especies reactivas al nitrógeno, además estimula la migración de células del sistema inmune al sitio de infección, contribuyendo a la formación del granuloma (Cavalcanti et al. 2012). Estudios revelan que $TNF-\alpha$ es expresado durante toda la fase latente, jugando un rol importante en el control de la infección (O'Garra et al. 2013). El bloqueo de esta citoquina tiene efectos dramáticos en el desenlace de la enfermedad, provocando desde una reactivación de la fase latente hasta el agravamiento de la enfermedad en una TB fulminante (Xie et al. 2014).

5. Proteína de Mtb presente en el estado de latencia.

El estado de latencia está definido como la presencia de cualquier lesión tuberculosa incapaz de producir síntomas que indiquen su presencia (Amberson 1938), siendo esa carencia de síntomas uno de los principales factores que ha permitido su prevalencia. El establecimiento de la TB latente es el resultado de la eliminación parcial de Mtb, donde este adecua su metabolismo para adaptarse a las condiciones adversas que impone el sistema inmune del huésped (Parrish et al. 1998). Los factores de virulencia implicados tanto en el estado de latencia como en la adaptación de Mtb al ambiente pulmonar son los que promueven la supervivencia del organismo, de manera que la

identificación de los genes asociados a los factores de virulencia es esencial para generar un objetivo que comprenda al patógeno en ese estado.

Dentro de los principales factores de virulencia de Mtb se encuentran un grupo de pequeñas proteínas de choque térmico o del inglés *small heat shock protein* (sHSP), proteínas producidas en respuesta a un leve choque de calor u otras causantes de estrés. Este tipo de proteínas poseen un dominio alfa-cristalino universalmente conservado, dominio que en Mtb corresponde al de la proteína *16-kDa alpha-crystallin* (Acr), también conocida como sHSP16.3 o *heat shock protein X* (HspX). Esta proteína es de vital importancia para la sobrevivencia de Mtb en períodos largos en estado de latencia, motivo por el cual la proteína Acr es un objetivo promisorio para el desarrollo de vacunas, así como también como un blanco terapéutico (Jee et al. 2018).

De los cerca de 4000 genes que posee Mtb, el gen de Mtb con mayor aumento en la transcripción en el estado de latencia es el gen *hspX*, también conocido como Rv2031c (Mushtaq et al. 2015), el cual codifica para la proteína Acr. Esta proteína es un antígeno reconocido en la mayoría de los pacientes con TB activa a través de exámenes de baciloscopia y se encuentra en niveles elevados durante la fase estacionaria (DesJardín et al. 2001) y media exponencial de cultivos de Mtb (Yuan et al. 1996).

Aun cuando la proteína Acr corresponde a la familia de sHSP, ésta no es una proteína inducida por calor. No obstante, otros factores causantes de estrés si la activan. Evidencias experimentales indican que esta proteína se necesita para el crecimiento de la bacteria en cultivo de macrófagos y que se induce en condiciones de hipoxia (Yuan et al. 1998). Esta proteína se ha estudiado como un biomarcador para TB latente (Sk and Sw 2011) debido a su alta expresión en el estado de latencia, ya que se ha propuesto que una de las funciones principales de la proteína Acr es mantener al patógeno en niveles bajos de replicación justo después de la infección, característica que garantiza mayor tiempo de permanencia intracelular (Demissie et al. 2006). De hecho, estudios de *knockout* de genes indican que la proteína Acr es necesaria para el crecimiento normal de Mtb durante la

infección, ya que la eliminación del gen *hspX* resultó en un incremento en el crecimiento bacteriano, mientras que su sobreexpresión resultó en una disminución del crecimiento durante la infección (Hu et al. 2006).

La proteína Acr ha demostrado ser un instrumento de engrosamiento de la pared celular, ayudando a la bacteria a sobrevivir al ambiente hostil durante el proceso de infección (Cunningham and Spreadbury 1998). Además, se ha observado el efecto del gen codificante de Acr en ratones, encontrándose que la eliminación de este gen promueve la autofagia de los macrófagos (Yang et al. 2018), demostrándose su efecto como un factor importante de virulencia, supervivencia y crecimiento.

En la **tabla 2** se enlistan varios estudios preventivos que se han realizado utilizando la proteína Acr con diferentes estrategias de inmunización. Nangpal y colaboradores lograron generar protección contra TB en cobayos utilizando la proteína Acr en el virus vacuna modificado de Ankara (*modified vaccinia Ankara*, MVA), donde su formulación se usó como un potenciador de la vacuna BCG (Nangpal et al. 2017). También se ha logrado utilizar la proteína Acr fusionada al antígeno Ag85b de TB en una formulación que utiliza replicones como un vector vacunal, en donde se ha logrado protección frente al reto de TB en modelo murino a través de inmunizaciones nasales y también parenterales (Dalmia et al. 2015).

	Antígeno	Adyuvante, vector o cepa	Metodología
(Chen et al. 2009)	Ag85B y Acr	Adyuvante de sales de aluminio y motivos CpG	Antígenos administrados de manera independiente son probados en ratones con Aluminio y/o motivos CpG.
(Mir et al. 2009)	Rv3407, Ag85A y Acr	Vector de expresión eucariótico pCMV.tPA	Vacuna de ADN, el vector codifica una proteína de fusión de los tres antígenos.
(Shi et al. 2010)	Ag85B y Acr	Cepa de <i>Mycobacterium bovis</i> recombinante	Una cepa de la vacuna BCG es modificada para sobreexpresar las proteínas Ag85B y Acr.
(Jeon et al. 2011)	Ag85A y Acr	Adyuvante de monofosforil lípido A (MPA) y dimetil-dioctadecil amonio (DDA)	Ambos antígenos son inoculados por separado y en conjunto con ambos adyuvantes a la vez en ratones.
(Li et al. 2011)	Ag85B, Acr, Mtb8.4 y péptido Mpt64	Adyuvante de DDA y fracciones de ácidos nucleicos en polisacáridos del bacilo Calmette-Guérin (BCG-PSN)	Se crean dos proteínas de fusión: Ag85B-Mpt64-Acr y Ag85b-Mpt64-Mtb8.4, las cuales son mezcladas con ambos adyuvantes para inocular en ratones.
(Niu et al. 2011)	Acr y Mtb10.4	Adyuvante de DDA y el factor de cuerda de Mtb: dimicolato de trehalosa (TDM)	Proteína de fusión creada entre el antígeno Acr y Mtb10.4 y mezclada con DDA y TDM.
(Yuan et al. 2012)	Ag85B, Acr y ESAT-6	Vector de expresión eucariótico pcDNA3.1(-)	Vacuna de ADN, el vector codifica una proteína de fusión de los tres antígenos.
(Moradi et al. 2016)	Acr, PPE44 y EsxV	Vector de expresión eucariótico pcDNA3.1(+)	Vacuna de ADN, el vector codifica una proteína de fusión de los tres antígenos.

Tabla 2. Candidatos vacunales preventivos contra TB que utilizan la proteína Acr en fase preclínica.

VIRUS COMO HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS.

1. Utilización de virus en nanomedicina.

Desde el descubrimiento de los virus en 1882, el entendimiento de sus propiedades a través del tiempo ha permitido su uso en el campo de la biotecnología. Los virus, por definición, son agentes infecciosos acelulares que deben entrar en una célula viva para poder replicarse, siendo considerados parásitos intracelulares obligados. La síntesis de las proteínas y ácidos nucleicos virales son realizados con la maquinaria sintética de la célula huésped, con el fin de ensamblar nuevas partículas virales que luego serán liberadas (Payne 2017).

En el ciclo replicativo de los virus, cada etapa requiere interacciones específicas entre las proteínas virales y las proteínas del huésped. Un mismo virus puede llegar a infectar una amplia variedad de tipos celulares y organismos si es que se cumple con algunos requisitos: las proteínas con las cuales interactúan los virus son compartidas entre los huéspedes, las células huésped soportan la replicación viral, el sistema inmune debe ser evadido (Douam et al. 2015). Virus con tropismos por un amplio rango celular y la capacidad para ingresar su material genético en los huéspedes posiciona a los virus como verdaderos vehículos biológicos con la habilidad de transferir información genética a diferentes especies tanto de procariontes como a eucariontes (Drezen et al. 2017).

La diversidad en forma y tamaño de los virus, así como sus características para infectar ciertos tipos de huéspedes ha provisto a los investigadores de un amplio espectro de posibilidades donde poder elegir un sistema apropiado para una determinada aplicación. Dentro de los virus más comúnmente utilizados con fines biotecnológicos se encuentran los adenovirus, los retrovirus y lentivirus (Goswami et al. 2019). La utilización de estos virus siempre ha causado preocupación por los factores de virulencia que se deben eliminar para poder utilizarlos como herramientas biológicas de manera segura (Milone and O'Doherty 2018; Small and Ertl 2011), razón que ha llevado a los investigadores a

buscar opciones más seguras, tales como los virus adenoasociados, *virus-like particles* y bacteriófagos.

Dentro de todos los virus, los bacteriófagos son los que poseen el mayor rango de aplicaciones. La existencia de virus con capacidades de infectar bacterias fue descrita por primera vez por Frederick Twort en 1915, y por Félix d' Herelle en 1917 (Roux 2011). Desde entonces, se ha avanzado mucho en el entendimiento de las capacidades que poseen estos tipos de virus para ser utilizados como herramientas biotecnológicas.

Por su capacidad para replicarse exclusivamente en el interior de las bacterias, estos virus se nombraron bacteriófagos. Proveniente del latín como palabra compuesta *baktrón* = “bacteria”, más *phagos* = “que come”; la palabra significa textualmente “que come bacterias”. Las observaciones tempranas de Félix d' Herelle sugirieron un potencial clínico en aplicaciones como agentes antibacterianos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, pero fallas en la terapia con fagos en casos clínicos y preocupaciones teóricas llevaron al desuso de los fagos (Merril et al. 2003), además, el descubrimiento en paralelo de los antibióticos contribuyó al desinterés por el uso de bacteriófagos como tratamiento en la época (Sunderland et al. 2017). Los bacteriófagos continuaron siendo utilizados en el campo de la biología molecular para entender las interacciones virus-huésped, lo que permitió el entendimiento de procesos genéticos tales como la transcripción, traducción, recombinación y regulación de la expresión génica (Henry and Debarbieux 2012).

Su uso actual abarca grandes campos en la nanomedicina, entendiéndose por esta al uso de la nanotecnología en el campo de la medicina (Mao 2013). Como se puede ver en la **figura 5**, los usos de los bacteriófagos en nanomedicina son variados y se agruparon según su propósito.

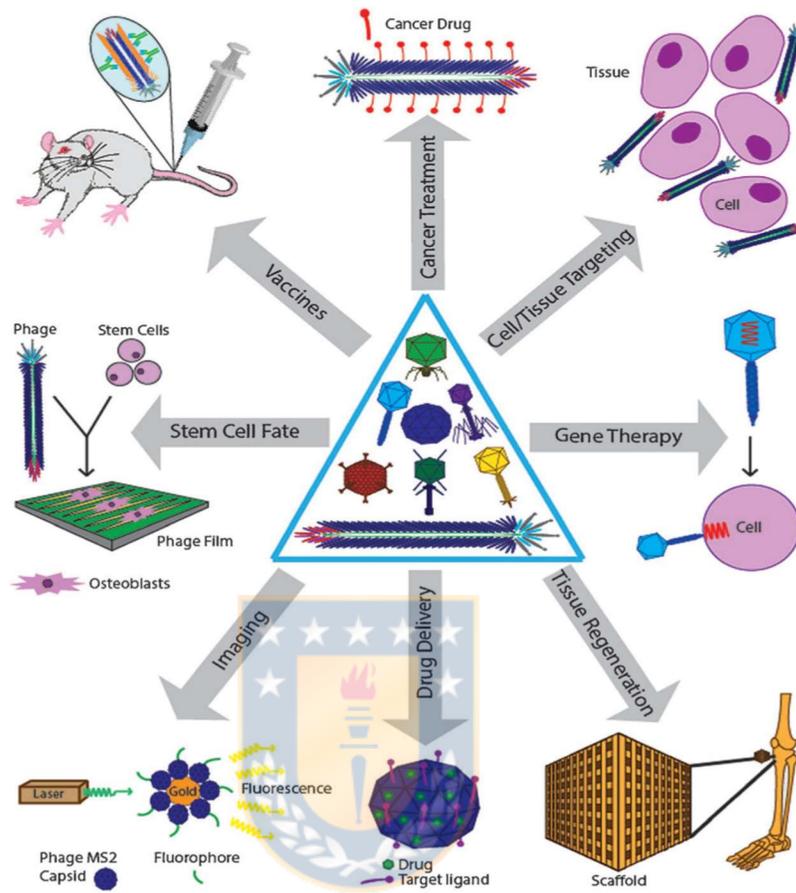


Figura 5. Resumen de aplicaciones de los bacteriófagos en nanomedicina.

Direccionando a tejidos/células blanco: Utilizar *biopanning* en bibliotecas de fagos ha producido gran variabilidad de péptidos para direccionar a células y tejidos específicos. **Terapia génica:** Vectores de fagos son mejorados incorporando elementos de virus adenoasociados, permitiendo terapia génica en eucariontes. **Regeneración de tejidos:** Fagos incorporados en andamios de hidrogel 2D y 3D, en donde los péptidos presentados por los fagos dirigen el destino de las células madre hacia la regeneración de tejidos. **Imagen:** Transporte agentes adjuntados o encapsulados estructuralmente al fago para mostrar imagen en una localización específica. **Destino de células madre:** El autoensamblaje de fagos en andamios y la presentación de péptidos en sus estructuras permiten determinar el destino de las células madre. **Entrega de drogas y tratamiento de cáncer:** Drogas conjugadas en la superficie de los fagos o encapsuladas, donde el fago en sí sirve como un *carrier* a blancos específicos. **Vacunas:** Fagos genéticamente modificados pueden presentar péptidos que, de manera segura, utilizan antígenos que generan inmunidad.

Sunderland et al. 2017

Síntesis dirigida por fagos de nanomateriales y ensamblaje para aplicaciones biomédicas, en donde los fagos son utilizados como un ladrillo de construcción que puede ser organizado como nanomateriales, además se pueden modificar genéticamente para presentar péptidos en su superficie que proveen afinidad con otros motivos peptídicos, sirviendo incluso como un material autoensamblable (Mao et al. 2012). Fagos dirigidos a blancos específicos como nanopartículas de precisión para la medicina, en donde el uso de librerías de fagos y métodos de selección permite que los fagos puedan ser hechos a medida para tener afinidad con determinados blancos a través de técnicas como el *biopanning*, siendo de gran utilidad para blancos tales como células, tumores e incluso estructuras inorgánicas (Xu et al. 2020). Fagos como *nanocarriers* para entrega de drogas/genes dirigidos a grupos funcionales, donde los fagos son excelentes para entregar cargas debido a que pueden tener drogas conjugadas a ello, actuando como vehículos (Wang et al. 2014b).

También se ocupan fagos como nanomedicinas para tratamiento de cáncer, donde los fagos interactúan con células cancerígenas a través de péptidos dirigidos, inhibiendo el crecimiento cancerígeno (Kia et al. 2013). Nanoestructuras basadas en fagos para la inducción de regeneración de tejido, refiriéndose a la habilidad de crear matrices bien definidas que se autoensamblan a través de los péptidos presentados en la superficie de los fagos, otorgando a las células madres adyacentes la inducción para su diferenciación y logrando así regeneración de tejido (Wang et al. 2014a). Fagos como nanosondas para diagnósticos precisos de enfermedades, basados en la habilidad de los fagos para dirigirse a blancos y llevar agentes de imagen, actuando como una sonda que se dirige a células enfermas, mejorando los métodos de detección de enfermedades (Min et al. 2013). Vacunación basada en fagos, en donde los fagos transportan antígenos, actuando como vehículos o *nanocarriers* (Sunderland et al. 2017).

2. Bacteriófagos como vehículos o *carriers* vacunales.

Actualmente, los métodos de entrega de antígenos con fines vacunales permiten mejorar la estabilidad de los componentes vacunales y la inmunogenicidad con el propósito de promover una protección inmune efectiva. Comúnmente, estas estrategias contemplan el uso de polisacáridos acoplados a proteínas de mayor tamaño, actuando de *carrier* (Pichichero 2013), pero también se emplean complejos péptido-proteína y proteína-proteína (DePorter and McNaughton 2014). Se necesitan nuevas estrategias de entrega de antígenos que permitan mejorar la eficacia y especificidad de los componentes inmunogénicos. El incremento del uso de subunidades recombinantes y vacunas sintéticas han impulsado el desarrollo de los *carriers*, donde el uso de bacteriófagos se propone como una herramienta natural, segura y multipropósito (Sartorius et al. 2019).

Un *carrier* vacunal ideal debería **presentar antígenos específicos al sistema inmune**, de manera que **estimule la respuesta inmune** eficazmente para generar **protección** contra una enfermedad específica, permitiendo la entrega de los componentes de la vacuna **a sitios específicos de interés** (Yang et al. 2015), además el sistema debería ser **seguro** y su **producción a gran escala** también debería ser considerada (Jafari and Abediankenari 2015).

Existe una gran variedad de fagos descritos en la actualidad. Estos tienen distintos genomas, formas y comportamientos y han sido clasificados por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) de acuerdo con sus ácidos nucleicos (Walker et al. 2021). No existe una agrupación específica para bacteriófagos, ya que estos pertenecen a distintos grupos en donde su material genético puede estar compuesto de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), doble o simple hebra; circular, lineal o segmentado. Su morfología es variada y se clasifican como envueltos o no envueltos, según la forma de la cápside (ovoide, esférica, filamentosa, forma de botella, pleomórfico, varilla, isométricos), con cola (retráctil o no) o sin cola (Simmonds et al. 2017; Chibani et al. 2019).

Los bacteriófagos reúnen muchas de las características necesarias para comportarse como un excelente *carrier* vacunal. Dentro de la gran cantidad de familias de fagos, los fagos filamentosos destacan por sus características para el desarrollo de vacunas (Aghebati-Maleki et al. 2016).

Los bacteriófagos filamentosos más utilizados en nanomedicina son los agrupados como fagos Ff, pertenecientes a la familia *Inoviridae* según ICTV al 2021 (Walker et al. 2021) y entre los cuales encontramos al fago f1, fd y M13. En la **figura 6** se representa la estructura de un fago filamentosos. Estas son partículas virales flexibles tubulares de 1 μm de longitud y 6 nm de diámetro en promedio. La proteína pVIII es la proteína mayoritaria de la cápside, encontrándose alrededor de 2700 copias de ésta en el fago M13 y 4000 en el fago fd (Smith and Petrenko 1997). Este tipo de fagos poseen un proceso replicativo no lítico en el cual los fagos son producidos y secretados al medio extracelular de su bacteria huésped sin lisarla. Esta replicación es dependiente de bacterias que expresen el pili sexual, puesto que los fagos filamentosos reconocen el pili bacteriano a través de la proteína viral pIII para inyectar el material genético en el huésped (Ledsgaard et al. 2018).

Las proteínas virales son manufacturadas por la maquinaria sintética del huésped y acumuladas en la membrana interna bacteriana, esperando por el ensamblaje del fago. Los virus del grupo Ff son un grupo de bacteriófagos filamentosos casi idénticos, codifican en su material genético para once proteínas, de las cuales cinco corresponden a proteínas estructurales (pIII, pVI, pIX, pVII y pVIII), mientras que las otras seis están involucradas con los procesos de infección y replicación, las cuales son llamadas proteínas no estructurales (Rakonjac et al. 2017).

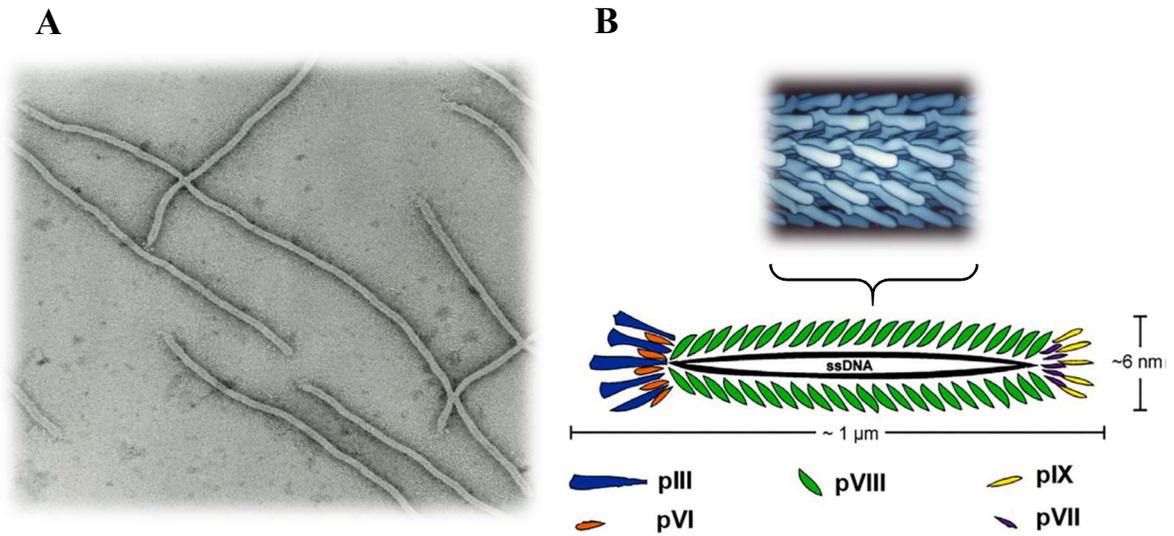


Figura 6. Estructura de un bacteriófago filamentoso Ff.

(A) Imagen de microscopía electrónica de un bacteriófago filamentoso. (B) Composición de los fagos filamentosos y disposición del dominio de superficie de la proteína de cubierta principal, modelado como densidad electrónica de proteínas. Cada partícula viral está formada por un ADN monocatenario (ADNmc) protegido por proteínas de la cápside viral. La proteína mayoritaria de la cápside es la pVIII. En un extremo se encuentra las proteínas pIX y pVII, mientras que en el otro extremo se encuentran las proteínas pIII y pVI.

Xu et al. 2020

Fotografías por Lee Makowski y Gregory Kishchenko.

3. Expresión de péptidos en la superficie de fagos filamentosos.

Una de las primeras técnicas desarrolladas para estudiar las interacciones proteína-ligando fue la Tecnología de Presentación sobre Fagos Filamentosos, también llamada *phage display* (Smith 1985). La naturaleza de *phage display* es la inserción genética de secuencias exógenas de péptidos en los genes de las proteínas virales de la cápside, de manera que se sintetizan las proteínas recombinantes y las presentan en su superficie como proteínas fusionadas (Rakonjac et al. 2011). El término “proteína de fusión” hace referencia a esta descripción.

La expresión de una proteína recombinante se debe realizar en alguna de las cinco proteínas virales estructurales. La elección de las proteínas virales para realizar la intervención genética depende del propósito del péptido a expresar.

Aunque todas las proteínas de la cápside han sido exitosamente biodiseñadas para presentar péptidos (Løset et al. 2011; DePorter and McNaughton 2014; Govarts et al. 2010; Ghosh et al. 2012), las proteínas virales más utilizadas son la proteína pIII y pVIII. La proteína pIII puede soportar péptidos y proteínas de mayor longitud con un potencial de hasta cinco copias por partícula viral. Por otro lado, la proteína pVIII puede tolerar sólo péptidos cortos, pero con gran cantidad de copias (más de mil copias) en una sola partícula viral (Xu et al. 2020).

En la **figura 7** se exponen tres distintas estrategias para la expresión de proteínas en fagos filamentosos, las cuales se han categorizado como sistema fago, fagémido e híbrido (Smith and Petrenko 1997). En el sistema fago o sistema *n*, los genes codificantes de la proteína recombinante son directamente insertados en el genoma del bacteriófago y el resultado es la expresión de proteínas de fusión con cada copia de las proteínas de la cápside viral escogida. Los problemas con esta estrategia surgen cuando las proteínas de fusión a expresar son de mayor tamaño, ya que el proceso de empaquetamiento viral se ve impedido por la extensión de las proteínas. Como regla general, en la proteína pVIII el tamaño máximo del péptido presentado puede variar entre seis a diez aminoácidos (Makowski 1994), mientras que en la proteína pIII, proteínas de un tamaño mayor a 50 aminoácidos no pueden ser presentadas en las cinco copias de la proteína viral (Kehoe and Kay 2005). Para resolver la limitación espacial se desarrollaron los sistemas híbrido y fagémido, los cuales disminuyen el número de copias de proteínas presentadas en la superficie a cambio de un límite mayor en el tamaño de las proteínas a presentar.

En el sistema híbrido o *nn*, el genoma viral carga con los genes del bacteriófago salvaje y con los de las proteínas recombinantes. El resultado es la expresión parcial de las proteínas de fusión en conjunto con las proteínas del fago salvaje, permitiendo el

ensamble de proteínas recombinantes de mayor tamaño al disminuir la interferencia con las proteínas adyacentes (Sokullu et al. 2019).

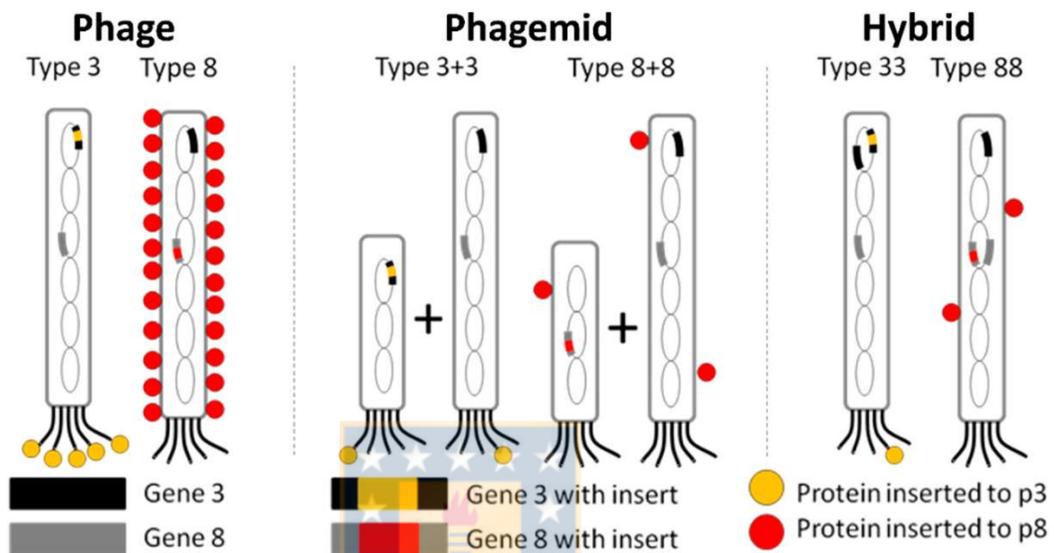


Figura 7. Tipos de sistemas de *phage display*.

En el esquema, el fago M13 representa los productos virales obtenidos con cada sistema de *phage display*. Círculos rojos y amarillos representan proteínas recombinantes expresadas como proteínas fusionadas con la cápside viral de las proteínas pVIII y pIII respectivamente. Las elipses al centro de cada virión representan ADN de cadena simple. Las cajas representan los genes que codifican para proteínas: caja negra para proteína pIII, caja gris para proteína pVIII, caja negra-amarilla para ADN foráneo insertado en gen de la proteína pIII, caja gris-roja para ADN foráneo insertado en gen de la proteína pVIII.

Sokullu et al. 2019

En el sistema fagémido o sistema $n+n$, se utilizan dos elementos: un fagémido y un bacteriófago auxiliador. El fagémido es un plásmido circular de ADN que contiene un origen de replicación para doble hebra de la célula bacteriana huésped, la secuencia de la proteína de fusión y adicionalmente contiene el origen de replicación del bacteriófago auxiliador, pero carece de los genes que codifican para las proteínas estructurales del fago. El fagémido puede llevar codificación para resistencia a antibióticos, lo que permite una selección durante una transformación bacteriana (Qi et al. 2012).

El fago auxiliador es un bacteriófago filamentoso que contiene todos los genes codificantes de las proteínas necesarias para el ensamblaje de la forma infectiva del fago, diferenciándose en el origen de replicación viral, el cual es deficiente y por ende su tasa de replicación es baja. La deficiencia se basa en la modificación del origen de replicación del fago salvaje. Por ejemplo, el fago filamentoso M13 se ha modificado para generar el fago auxiliador M13KO7, el cual lleva insertado un origen de replicación de baja eficiencia del plásmido p15A en el origen de replicación viral (Vieira and Messing 1987).

El fagémido de una bacteria sin infectar se replica como un plásmido más de ADN doble hebra debido a que los fagémidos poseen un origen de replicación bacteriano. Las proteínas de fusión codificadas en el fagémido se sintetizan, pero el origen de replicación viral del fagémido no genera un bacteriófago, porque el fagémido no posee el resto del genoma que codifica para las proteínas estructurales y de ensamblaje (Lund et al. 2010).

Tal como se expone en la **figura 8**, el ciclo infectivo de los fagos Ff parte con la unión de la proteína pIII al pili sexual en la superficie de *E. coli*, permitiendo la translocación del ADN viral de hebra simple (ADN_{mc}) en la bacteria y rápidamente se convierte a ADN de hebra doble (ADN_{bc}) gracias a la maquinaria celular del huésped. En esta forma de cadena doble, denominada forma replicativa (FR), se transcriben las proteínas virales del fago. Cuando la proteína pII es sintetizada y se encuentra a una concentración alta, esta se une covalentemente al origen de replicación viral por la cadena (+), cortándola en el proceso por el extremo 5', comenzando la multiplicación de la FR a través de la replicación denominada: círculo rodante. El extremo 3' generado es tomado por la ADN polimerasa y elongado utilizando la cadena (-) como templado, generando así la hebra complementaria. En el proceso, la proteína pII es desplazada a través de la cadena (+) hasta encontrarse con la secuencia de término en el origen de replicación, donde los extremos 5' y 3' se unen nuevamente y generan el ADN_{mc} en su estado inicial, listo para ser convertido a su FR (Rakonjac et al. 2017).

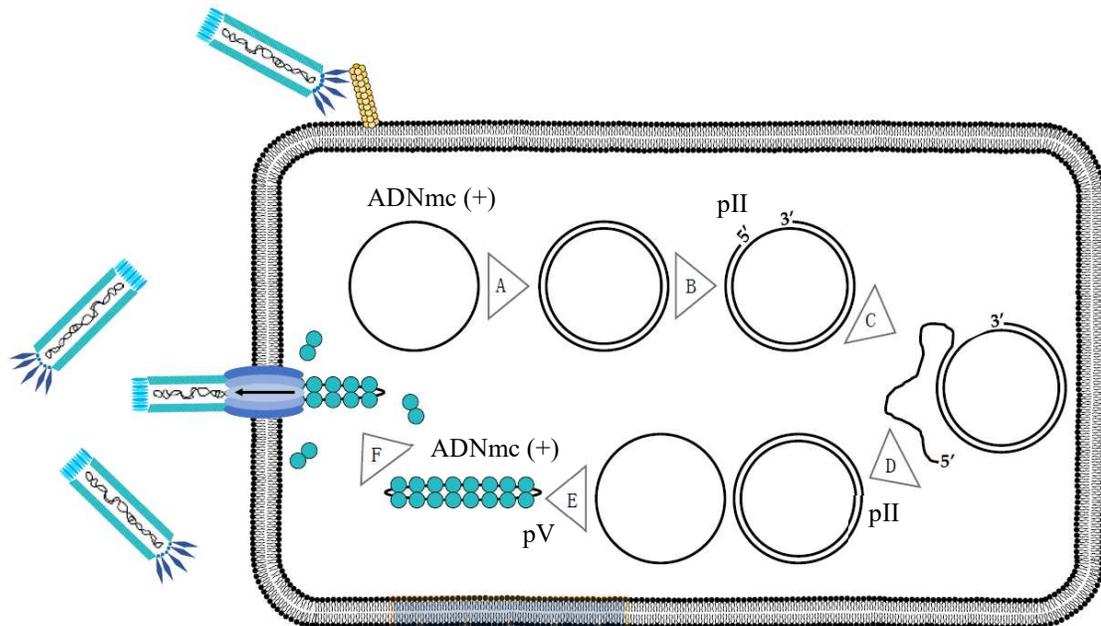


Figura 8. Ciclo infeccioso de los bacteriófagos del grupo Ff.

(A) Luego de la infección, el ADNmc (+) translocado es transformado en su FR y se sintetizan las proteínas virales. (B) Después de su apropiada acumulación, la proteína pII corta la hebra (+) de la FR y se une covalentemente a ella por su extremo 5'. (C) El genoma del extremo 3' es replicado, usando la hebra (-) como templado, mientras la proteína pII es físicamente desplazada a través de la hebra (+) por el proceso de elongación. (D) La replicación continúa hasta acumular suficiente concentración de la proteína pV, (E) La proteína pV secuestra el ADNmc (+) y se ensamblan las proteínas estructurales del fago en el periplasma. (F) Se genera un poro por el cual el bacteriófago se transloca al exterior.

Esquema traducido de Ledsgaard et al. 2018

El ciclo se repite hasta que la proteína pV se encuentre en suficiente concentración como para unirse al ADNmc y se inicie el proceso de empaquetamiento, reclutando al resto de proteínas estructurales que revestirán al ADN viral para formar el fago. La creación de un poro en la membrana celular que permitirá translocación del fago al exterior (Ledsgaard et al. 2018; Rakonjac et al. 2017).

Cuando el fago auxiliador infecta una bacteria que contiene un fagémido, se realiza el mismo proceso infectivo de todos los bacteriófagos Ff, salvo que el origen de replicación viral está presente tanto en el fagémido como en el fago auxiliador. Debido al defecto en el origen del fago auxiliador, el ADNmc del fago auxiliador es producido en mucho menores cantidades que el ADNmc del fagémido. En consecuencia, se generan partículas virales que contienen el ADN del fago auxiliador en pocas cantidades y partículas que contienen el ADN del fagémido en mayores cantidades (Qi et al. 2012).

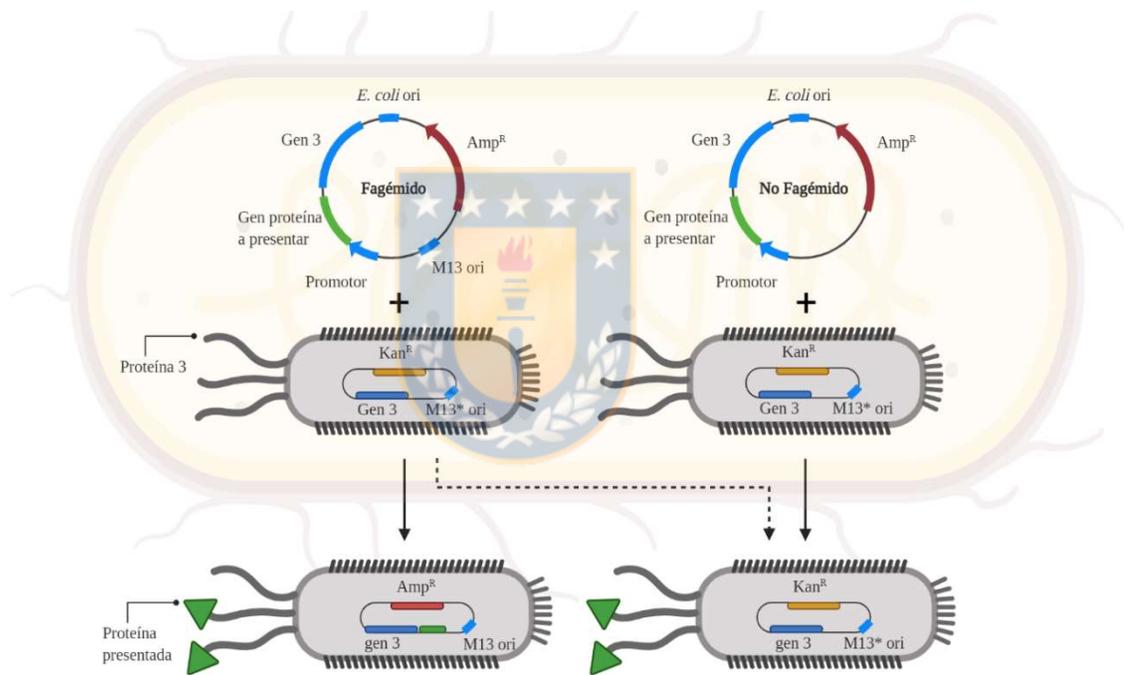


Figura 9. Genotipos y fenotipos esperados en el sistema $n+n$ fagémido y no-fagémido.

Dentro de una *E. coli* F^+ , el fago auxiliador M13KO7 infecta y provee las proteínas estructurales para la formación del virus mientras que los plásmidos contienen información para una proteína recombinante fusionada a una proteína viral, en este caso, la pIII. El fagémido lleva un origen de replicación para el fago M13 (*M13 ori*) mientras que las construcciones no-fagémidas no llevan origen de replicación viral. El fago M13KO7 lleva un origen de replicación defectuoso (*M13* ori*). Ambos sistemas producen bacteriófagos que expresan la proteína recombinante, pero el genotipo es diferente. El sistema no-fagémido produce fagos que mantienen el genotipo del fago M13, mientras que el sistema fagémido produce fagos con ambos genotipos, pero la producción de fagos con el genotipo del fagémido es mucho mayor.

Una variación al sistema de expresión $n+n$ es representada en la **figura 9**. Este sistema es utilizado para producir bacteriófagos filamentosos que posean el genoma sólo del fago auxiliador, pero que su fenotipo exprese las proteínas recombinantes deseadas. Al fagémido se le elimina el origen de replicación viral, transformándose básicamente en un plásmido. Las proteínas recombinantes son sintetizadas previamente por la maquinaria bacteriana, al igual que ocurriría si fuera un fagémido, pero al momento de la infección, el ADNmc sin el origen de replicación viral no es sintetizado. El resultado es el empaquetamiento de las proteínas recombinantes codificadas por el plásmido en conjunto con las proteínas del fago auxiliador alrededor del genoma del fago auxiliador.

4. Ciclo de vida de bacteriófagos filamentosos.

El comportamiento de los fagos filamentosos está evidenciado por su ciclo de vida. Los fagos filamentosos tienen la habilidad para replicarse en el huésped bacteriano sin destruirlo. Esto se debe a que los fagos filamentosos exhiben ciclos de vida templados y no-templados, capaces de entrar a un estado de replicación constante sin destruir a su huésped. En virología, un virus templado se refiere a la capacidad que tienen los virus de presentar un ciclo de vida lisogénico, en donde el genoma del virus se integra al cromosoma del huésped bacteriano (Davies et al. 2016); mientras que un virus no templado no integra su genoma al del huésped. Ya sean templados o no, los fagos filamentosos no lisan a su célula huésped, incluso al tratarse de fagos filamentosos lisogénicos, de manera que utilizan a las bacterias como verdaderas fábricas de virus de manera crónica (Rampersad and Tennant 2018).

Como todos los fagos del grupo Ff, la liberación del bacteriófago M13 de su huésped ocurre sin provocar la lisis bacteriana. Además, el bacteriófago M13 no posee un estado lisogénico, por lo tanto, éste es considerado un virus no temperado. El fago M13 presenta una replicación círculo rodante, pero ésta no es exclusiva y tiene muchas similitudes con la replicación del bacteriófago λ , un fago lítico no filamentosos. La diferencia radica en el método de salida de la célula, que permite al fago M13 no destruir

a su huésped, el cual genera un poro a través de la membrana por donde se transloca hacia el exterior (Ledsgaard et al. 2018), mientras que el bacteriófago λ lisa la membrana celular para poder ser liberado (Golding 2016). El tipo de replicación del fago M13 no determina una clasificación adecuada.

En la **figura 10** se resumen los tipos de ciclo de vida de los fagos, donde se describe una clasificación diferente que engloba a todos los bacteriófagos, eliminando la dualidad lítica o lisogénica no aplicable a bacteriófagos filamentosos (Hobbs and Abedon 2016).

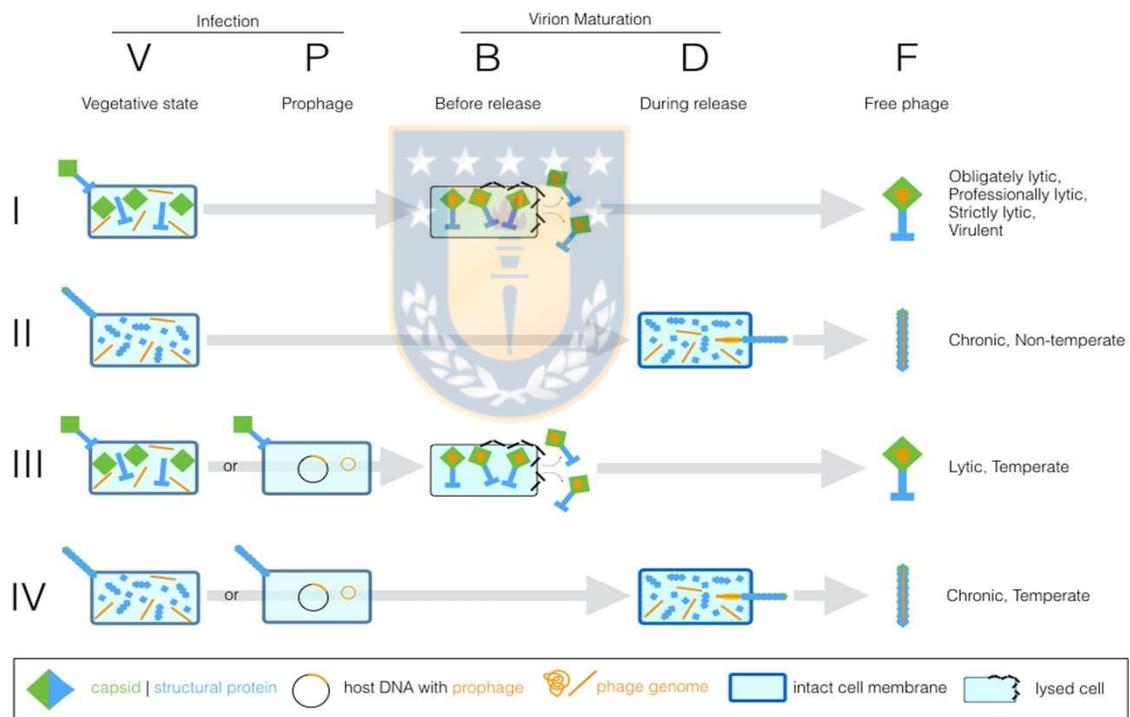


Figura 10. Tipos de ciclos de vida de bacteriófagos.

(I) Los bacteriófagos pueden realizar un ciclo de vida no templado estrictamente lítico, donde el huésped bacteriano es lisado al momento de liberación del fago, **(II)** un ciclo no templado donde el huésped no es lisado al momento de la liberación, **(III)** un bacteriófago templado que mantiene un ciclo lisogénico y pasa a un ciclo de vida lítico, **(IV)** un ciclo de vida templado que pasa a un ciclo productivo no lítico.

Hobbs and Abedon 2016

Considerando el ciclo de vida crónico no temperado del fago M13, éste se convierte en un buen candidato para su producción a gran escala en términos de rendimiento por células huésped, permitiendo la posibilidad de producciones continuas que no se podrían lograr con fagos líticos.

5. Estimulación eficaz del sistema inmune por bacteriófagos.

Los fagos pueden estimular fuertes respuestas inmunes humorales y celulares (Wang et al. 2006), y son altamente inmunogénicos sin la ayuda de adyuvantes (Costa et al. 2015). Como un antígeno exógeno, la naturaleza particulada de la cubierta de los bacteriófagos filamentosos induce directamente la activación de linfocitos B a través de su detección por el BCR, mientras que el genoma viral de carácter monocatenario contiene motivos CpG que generan un efecto adyuvante al ser detectados por TLR-9 (Sartorius et al. 2015).

La CD como célula presentadora de antígenos juega un rol esencial en la inducción de respuestas inmunes específicas contra un antígeno. La activación de los linfocitos T ocurre por el CMH-I y CMH-II, ambos presentes en la CD, donde cada clase de CMH realiza la activación hacia un tipo específico de linfocitos T. El CMH-I activa linfocitos T CD8⁺, el cual presenta antígenos obtenidos intracelularmente. Estos antígenos son previamente degradados por el proteasoma y transportados a través del retículo endoplasmático para luego ser presentados. En cambio, el CMH-II activa linfocitos T CD4⁺ y presenta antígenos obtenidos extracelularmente al ser fagocitados y degradados por lisosomas. Considerando lo anterior, una vacuna debe generar ambas respuestas para ser efectiva: una respuesta humoral, desarrollada a partir de la activación de linfocitos T CD4⁺; y una respuesta celular, desarrollada a partir de la activación de linfocitos T CD8⁺ (Fehres et al. 2014).

Siendo la presentación de antígenos esencial para lograr una respuesta inmune eficiente, la internalización de los antígenos por las CPA es clave. En general, partículas de 20 a 200 nm son internalizadas eficientemente por los CPA. En contraste, antígenos

menores a 10 nm son tomados ineficientemente y partículas grandes mayores a 20 μm no logran pasar eficientemente los capilares linfáticos (Bachmann and Jennings 2010).

En la **figura 11** se representan los mecanismos de procesamiento y presentación de los fagos filamentosos, los cuales se han estudiado y se ha demostrado que existe presentación cruzada de las partículas antigénicas de los fagos filamentosos. Durante una infección viral, la presentación de los péptidos extraños es realizada por el CMH-I. Esos péptidos son reconocidos por los TCR de los linfocitos T CD8^+ , permitiendo su activación. La presentación cruzada permite la presentación de péptidos derivados de fuentes extracelulares de proteínas, tales como microorganismos o células moribundas, pero con las moléculas del CMH-I, además de las moléculas del CMH-II (Blander 2018; Hossain and Wall 2019). De esta manera se activan linfocitos T CD8^+ y CD4^+ .

Se ha investigado el procesamiento y presentación de fagos filamentosos. Usando células B inmortalizadas a través del sistema Epstein-Barr virus, proteínas de un fago filamentosos fueron marcadas fluorescentemente para seguir su recorrido con un microscopio confocal. Se observó que las proteínas virales fueron internalizadas por los linfocitos B y degradadas en los compartimientos lisosomales, en donde los péptidos fueron derivados, listos para ser presentados por el CMH-I y CMH-II (Gaubin et al. 2003). Por lo tanto, los fagos filamentosos pueden estimular respuestas inmunes adecuadas para generar protección contra enfermedades específicas. En otras palabras, mejoran la inmunogenicidad de la proteína para ser presentada, funcionando como un sistema exaltador de la respuesta inmune (Aghebati-Maleki et al. 2016).

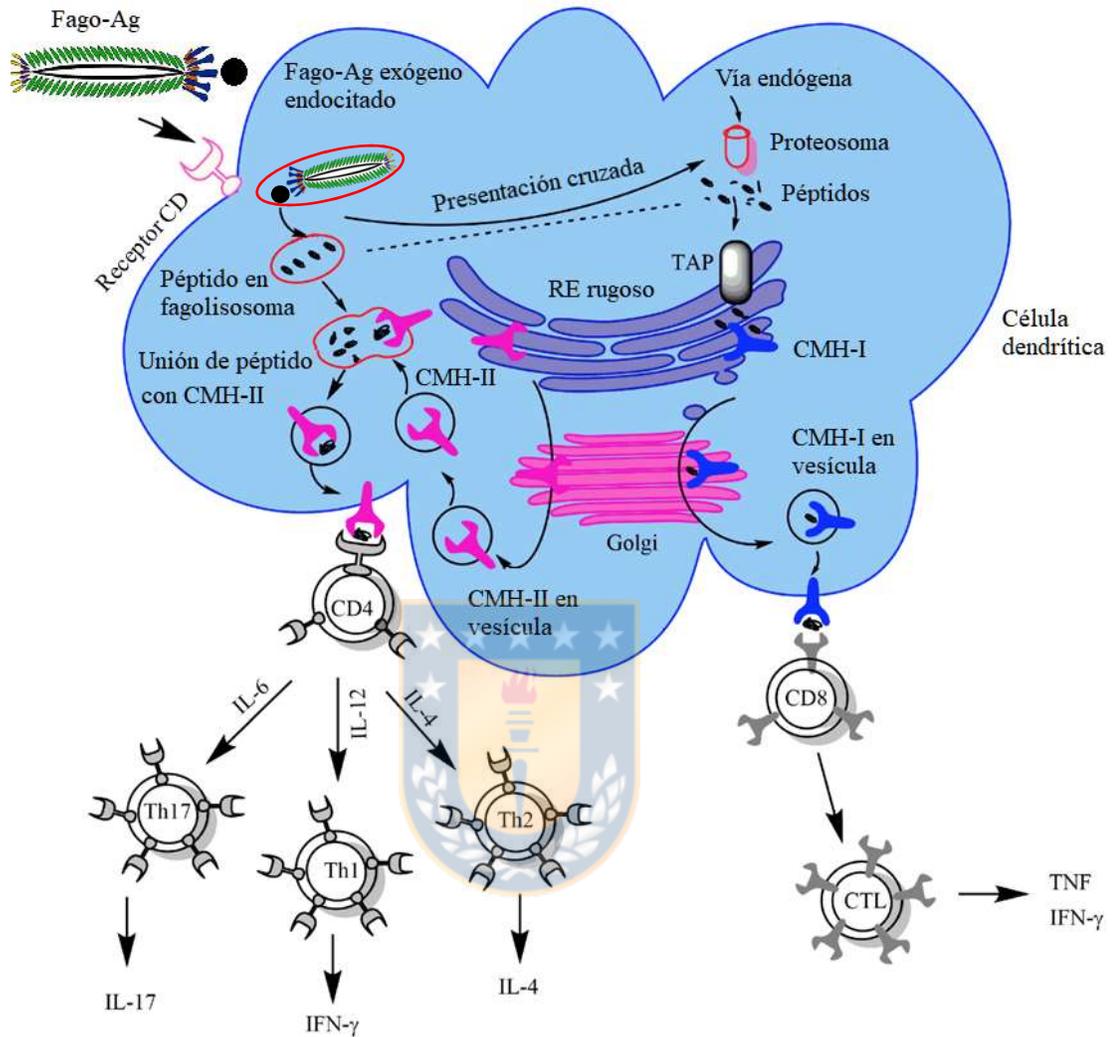


Figura 11. Procesamiento de antígenos en CD con bacteriófagos filamentosos.

La fagocitosis del bacteriófago y su antígeno presentado genera la degradación de sus proteínas hacia los complejos mayores de histocompatibilidad I y II a través de presentación cruzada.

Esquema modificado de Hossain and Wall 2019

6. Seguridad y transcritosis de bacteriófagos.

El cuerpo humano es un gran reservorio de virus bacteriófagos, los cuales se comportan de manera inerte e incapaces de generar una patogénesis en células eucariontes (Salmond and Fineran 2015). Los fagos no tienen tropismos por células de mamíferos, ya

que no pueden infectar células eucariotas del mismo modo que infectan huéspedes bacterianos. Esto es debido principalmente a diferencias fundamentales en los receptores de superficie y maquinaria intracelular de células eucariontes y procariontes (Barr 2017). De hecho, la microbiota humana está ampliamente habitada por fagos (Reyes et al. 2010) y no existen patologías asociadas a estos, razón por la cual se ha permitido su utilización como “terapia de fagos” en humanos (Van Belleghem et al. 2018).

Por otro lado, los fagos tienen la capacidad innata de atravesar tejidos y barreras relativamente impermeables (Putra and Lyrawati 2020). Durante una inoculación en ratones, el proceso de translocación ocurre rápidamente luego de la administración (Dabrowska et al. 2005). Si bien, la ruta de administración y el título inicial de fagos influyen enormemente en el patrón de distribución del virus en el cuerpo, los fagos han demostrado una habilidad asombrosa para penetrar rápidamente el endotelio vascular, llegando incluso a penetrar la barrera hematoencefálica (Frenkel and Solomon 2002), un blanco que históricamente ha presentado grandes dificultades para la entrega de drogas al sistema nervioso central.

Bacteriófagos administrados de manera intranasal se han encontrado en el bulbo olfatorio y en la región del hipocampo sin efectos tóxicos, lo que ha promovido el desarrollo de investigaciones de uso terapéutico de bacteriófagos filamentosos contra la enfermedad del Alzheimer (Solomon 2008) y contra la Encefalomielitis Autoinmune Experimental, como un modelo animal de roedores y base para enfermedades desmielinizantes en humanos (Rakover et al. 2010).

En ratones, la mayoría de los bacteriófagos permanecen en circulación y se eliminan lentamente de la sangre con una vida media de 4,5 horas. Después de quince minutos los fagos ya se encuentran en el hígado, y después de una hora pueden encontrarse prácticamente en todos los órganos por el proceso de transcitosis (Zou et al. 2004).

Se ha encontrado que los fagos poseen diferentes mecanismos de transcitosis a través de líneas celulares endoteliales y epiteliales para llegar finalmente a las células del

sistema inmune. Las vías de transcitosis descritas se clasifican en tres: captación libre, donde el fago es endocitado y transportado selectivamente (Barr 2017); caballo de Troya, donde un fago y su bacteria huésped entran o son endocitados en conjunto (Tian et al. 2015); y fuga, donde alguna inflamación o injuria ha resultado en daño a la función de la barrera epitelial, permitiendo el tránsito pasivo de los fagos a través del epitelio (Huh et al. 2019; Claesson-Welsh 2015).

Las células del sistema inmune innato detectan material exógeno proveniente de bacterias, así como de bacteriófagos por medio de los PRR a través del reconocimiento de los PAMP (Roh and Sohn 2018). En el caso de las bacterias, la interacción con sus PAMP y el sistema inmune está bien estudiado. Por el contrario, las interacciones de los fagos son menos comprendidas.

El desenlace de una respuesta inmune por parte de los fagos primero debe contemplar su reconocimiento por parte del sistema inmune innato. Los fagos pueden ser reconocidos por dos vías: reconocimiento extracelular y reconocimiento endocítico. Por un lado, un potencial reconocimiento extracelular podría ocurrir a través de la unión de los fagos a motivos de superficie e integrinas u otros receptores aun desconocidos (Carroll-Portillo and Lin 2019). Por otro lado, el reconocimiento endocítico comienza con la endocitosis de un fago libre, uno opsonizado o una bacteria infectada con fagos, los cuales son dirigidos hacia los lisosomas, donde finalmente la degradación del contenido lisosomal indica que los epítomos de los fagos han sido expuestos a los PRR del compartimento endosomal (Hodyra-Stefaniak et al. 2015).

El efecto de la señalización inmune de los bacteriófagos es una incógnita que se investiga actualmente. Se ha encontrado que existen instancias donde la presencia de los fagos resulta en un efecto benéfico para las células eucariotas en la situación de una infección bacteriana (Xiong et al. 2014), pero también se ha encontrado lo contrario (Secor et al. 2015). Experimentos en múltiples especies de mamíferos (ratones, cerdos, cabras, ovejas y monos) han demostrado que preparaciones basadas en bacteriófagos no causan

efectos adversos, incluso cuando las dosis son elevadas y con administraciones repetidas (Villa-Mancera et al. 2008).

Los bacteriófagos se encuentran en prácticamente cualquier lugar y estamos constantemente expuestos a ellos (Clokier et al. 2011). Se podría argumentar que la exposición constante a bacteriófagos sin perjuicio a humanos es evidencia de su seguridad, pero en el contexto de las pruebas clínicas hay consideraciones que deberían ser tomadas en cuenta.

La primera de ellas tiene relación a la esterilidad y pureza de la preparación bacteriófaga. Es imperativo que el producto carezca de toxinas y restos bacterianos para cumplir con las Normas de Correcta Fabricación o algún equivalente que asegure un estándar de calidad, ya que durante el proceso empaquetamiento viral es probable que se arrastren partículas bacterianas. Se han descrito parámetros de calidad recomendados para productos derivados de bacteriófagos desde un punto de vista de la manufactura (Parracho et al. 2012). Segundo, tiene que ver con el potencial de un efecto bactericida, puesto que los bacteriófagos se replican en huéspedes bacterianos, y el cuerpo humano está ampliamente poblado por ellos. Sin embargo, esto último es un efecto acotado solamente a los fagos con un ciclo de vida lítico, grupo al cual los fagos filamentosos no pertenecen (Furfaro et al. 2018).

Los ensayos clínicos sobre el uso de fagos en humanos corresponden mayormente al área de terapia de fagos, en donde se han utilizado variadas vías de inoculación, incluyendo principalmente la vía tópica, oral e intravenosa de manera efectiva y segura (Speck and Smithyman 2016). A la fecha, existen 49 estudios clínicos registrados (<https://clinicaltrials.gov/>) en donde se utilizan bacteriófagos.

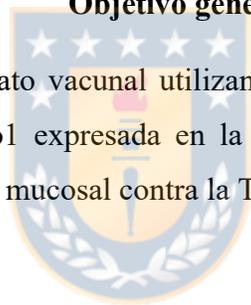
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS.

El bacteriófago filamentoso M13, expresando el péptido Co1 y la proteína Acr de *Mycobacterium tuberculosis* actúa como *carrier* inmunogénico para la generación de una respuesta inmune mucosal.

Objetivo general.

Desarrollar un candidato vacunal utilizando la proteína Acr de *Mycobacterium tuberculosis* y el péptido Co1 expresada en la superficie del bacteriófago M13 para generar una respuesta inmune mucosal contra la TB.



Objetivos específicos.

- i. Generar un candidato vacunal basado en el antígeno Acr de *Mycobacterium tuberculosis* y el péptido Co1, expresados ambos en la superficie del bacteriófago filamentoso M13.
- ii. Establecer las condiciones de cultivo a menor y mayor escala del candidato vacunal.
- iii. Estudiar la respuesta inmune sistémica y mucosal en modelo murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Reactivos y fungibles.

- Agarosa (Lonza, EUA).
- Bromuro de etidio (Merck, Alemania).
- Membrana de nitrocelulosa 0,2 μm *Amersham™ Protan™* (Merck, Alemania).
- Membrana de fluoruro de polivinilideno 0,65 μm *Durapore®* (Merck, Alemania).
- Microplaca plana de 96 pocillos de alta unión (Corning, EUA).
- Placa de Petri de 90 mm de diámetro (Nest, China).
- Jeringa con aguja 27G (Nipro, Indonesia).
- Capilares 75 mm / 75 μL (Hirschmann, Alemania).
- Ampicilina (US Biological, EUA).
- Kanamicina (Merck, Alemania).
- Azul de bromofenol (Merck, Alemania).
- Azul de Coomassie G-250 (Merck, Alemania).
- Tween-20 (Sigma, EUA).
- Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (Merck, Alemania).
- Polietilenglicol 8000 (Merck, EUA).
- Ácido sulfúrico (Merck, Alemania).
- Tris (Sigma-Aldrich, Alemania).
- MgCl_2 (Merck, Alemania).
- KCl (Merck, Alemania).
- Ácido acético glacial (Merck, Alemania).
- Ácido etilendiaminotetraacético (Merck, Alemania).

- Glicerol (Merck, Alemania).
- $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Alemania).
- Na_2HPO_4 (Merck, Alemania).
- Dodecilsulfato sódico (Merck, Alemania).
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Thermo Fisher Scientific, EUA).
- KH_2PO_4 (Merck, Alemania).
- β -mercaptoetanol (Sigma, EUA).
- Glicina (PanReac AppliChem, España y Alemania).
- Metanol (Merck, Alemania).
- Isopropanol (Merck, Alemania).
- Desoxinucleósidos trifosfato (Omega Bio-tek, Georgia).
- Acrilamida (Merck, Alemania).
- Bisacrilamida (Sigma, EUA).

2. Proteínas.

- ADN polimerasa Taq (NEB, EUA).
- Anticuerpo monoclonal anti-Acr: TBG65 (Laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la Universidad de Concepción, Chile).
- Anticuerpo monoclonal anti-M13-pIII (NEB, EUA).
- Anticuerpo policlonal anti-Fc-IgG conjugado al fluoróforo Alexa Fluor[®] 680 (Jackson ImmunoResearch, EUA).
- Anticuerpo policlonal anti-Fc-IgG conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, Alemania).
- Anticuerpo monoclonal anti-M13-pVIII conjugado a peroxidasa de rábano (GE Life Sciences, EUA).
- Anticuerpo policlonal anti-Fc-IgA conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, Alemania).
- DNasa I (Fluka, Suiza).

- Lisozima liofilizada (Thermo Fisher Scientific, EUA).
- Albúmina de suero bovino (Thermo Fisher Scientific, EUA).
- Patrón de peso molecular *1 kb DNA Ladder* (NEB, EUA).
- Patrón de peso molecular *Accuruler RGB Plus Prestained Protein Ladder* (Maestrogen, Taiwán).

3. Bacterias, virus y animales.

3.a. Bacterias.

- *Escherichia coli* TG1: [*F' traD36 proAB lacIqZ ΔM15*] *supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK- mK-)*, (Lucigen, EUA).
- *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL: *B F ompT hsdS (rB- mB-) dcm+ Tet^R gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cm^R]*2, (Agilent Technologies, EUA).

3.b. Virus.

- Bacteriófago M13KO7 (NEB, EUA).

3.c. Animales.

- *Mus musculus* cepa C57BL/6 (ISP, Chile).

4. Soluciones.

- Solución tampón PCR concentrada 10X (100 mM tris, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂).
- Solución tampón fosfato salino (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄).
- Solución de limpieza PBS-Tween (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 0.05% v/v Tween-20).
- Solución tampón tris salino (137 mM NaCl, 25 mM tris, pH = 7.6).
- Solución de limpieza TBS-Tween (137 mM NaCl, 0.1% v/v Tween-20, 25 mM tris, pH = 7.6).
- Solución polietilenglicol (20% p/v PEG-8000, 2.5 M NaCl).

- Solución tampón tris-acetato-EDTA (40 mM tris, 20 mM ácido acético, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético).
- Solución reguladora tris-glicina-SDS (25 mM tris, 192 mM glicina, 0.1% p/v dodecilsulfato sódico).
- Solución reguladora de transferencia (25 mM tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, 0.04% p/v dodecilsulfato sódico).
- Solución sustrato TMB *Pierce*TM (Thermo Fisher Scientific, EUA).
- Solución peróxido *Pierce*TM (Thermo Fisher Scientific, EUA).
- Tampón de carga de ADN 6X *Gel Loading Dye, Purple 6X* (NEB, EUA).
- Tampón de carga de proteínas tris-glicina 6X (30% v/v glicerol, 0.03% p/v azul de bromofenol, 10% p/v dodecilsulfato sódico, 350 mM tris, 0.6% v/v β-mercaptoetanol).
- Solución de tinción (2.5 g/L azul de Coomassie G-250, 25% v/v isopropanol, 10% v/v ácido acético glacial).
- Solución de destinción (20% v/v metanol, 10% v/v ácido acético glacial).
- Solución de lisis celular, solución tampón de equilibrio (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH = 8).
- Soluciones de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, (150 mM, 250 mM, 350 mM y 500 mM) imidazol, pH = 8).
- Solución acrilamida/bisacrilamida (30% p/v acrilamida, 0.8% p/v bisacrilamida).
- Solución basada en ácido bicinonínico *Pierce*TM *BCA Protein Assay Reagent A* (Thermo Fisher Scientific, EUA).
- Solución basada en Cu⁺² *Pierce*TM *BCA Protein Assay Reagent B* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

5. Agares y medios de cultivo.

- Medio de caldo de lisogenia (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl).

- Medio de caldo 2xYT (16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl).
- Medio de caldo *NZ amine*[®] (1 g/L MgSO₄, 5 g/L NaCl, 10 g/L triptona).
- Agar de caldo de lisogenia (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar).

6. Equipos.

- Termociclador *T100*[™] *Thermal Cycler* (Bio-Rad, EUA).
- Sistema de electroforesis en gel horizontal *Sub-Cell GT Horizontal Electrophoresis System* (Bio-Rad, EUA).
- Fuente de poder modelo *Power Pac HC* (Bio-Rad, EUA).
- Sistema de electroforesis en gel vertical *Mini-PROTEAN*[®] *Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (Bio-Rad, EUA).
- Fuente de poder *Electrophoresis Power Supply 300V EV202* (BVBA, Bélgica).
- Centrífuga *Sorvall RC6 plus* (Thermo Fisher Scientific, EUA).
- Centrífuga *Sorvall Legend Micro 21* (Thermo Fisher Scientific, EUA).
- Sistema de Imagen *UVISAVE HD2* (UVITEC, Reino Unido).
- Transiluminador *UVIPURE BXT-F26.MX* (UVITEC, Reino Unido).
- Equipo de transferencia semiseco *Trans-Blot*[®] *SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad, EUA).
- Equipo detector de fluorescencia *ODYSSEY*[®] *CLx* (LI-COR Biosciences, EUA).
- Espectrofotómetro *Synergy HTX multi-mode reader* (BioTek Instruments, EUA).
- Incubadora-agitador orbital *WIS-20* (Witeg Labortechnik, Alemania).
- Incubadora *SWIG-50* (Witeg Labortechnik, Alemania).
- Gabinete de flujo laminar *ESCO AHC-4D1* (Esco Scientific, Singapur).
- Equipo sonicador *Sonicator Ultrasonic Processor Q700* (Qsonica, EUA).
- Sistema cromatográfico *AKTA*[™] *start* (GE Life Sciences, EUA).
- Sistema fermentador *Winpact One FS-06-220* (Major Science, EUA).

MÉTODOS

1. Generación de bacterias *Escherichia coli* recombinantes.

A continuación, se describen las técnicas empleadas en la generación de las bacterias *E. coli* TG1 transformadas con los vectores pUC57-Acr-Co1, pMAC-Acr y pMAC.

1.a. Vectores pMAC, pMAC-Acr y pUC57-Acr-Co1.

El vector fagémido pMAC-Acr es sintetizado a partir del vector pMAC, un plásmido previamente generado en el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la Universidad de Concepción, el cual está basado en el vector comercial de clonación pBluescript KS (-) y que se ha modificado para llevar codificada la proteína pIII del bacteriófago filamentosos M13. El casete de expresión de la proteína Acr fue obtenido desde el vector pET-Acr (Reyes et al. 2013), otro vector propiedad del mismo laboratorio y facilitado para la amplificación de la secuencia codificante de la proteína Acr.

El casete de expresión de la proteína Acr en conjunto con el péptido señal hacia las células M: el péptido Co1, se diseñó y sintetizó en el vector pUC57, un vector de clonación de uso comercial dando como resultado la generación del vector no-fagémido pUC57-Acr-Co1. A diferencia del vector fagémido pMAC, el vector pUC57 no lleva un origen de replicación para el bacteriófago M13KO7.

1.b. Amplificación.

Se realizó el proceso de reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) utilizando partidores sentido y antisentido que flanquean al sector codificante de la proteína Acr con la proteína pIII. Estos se prepararon en H₂O destilada para conseguir una solución de trabajo a concentración 50 pmol/μL por cada cebador.

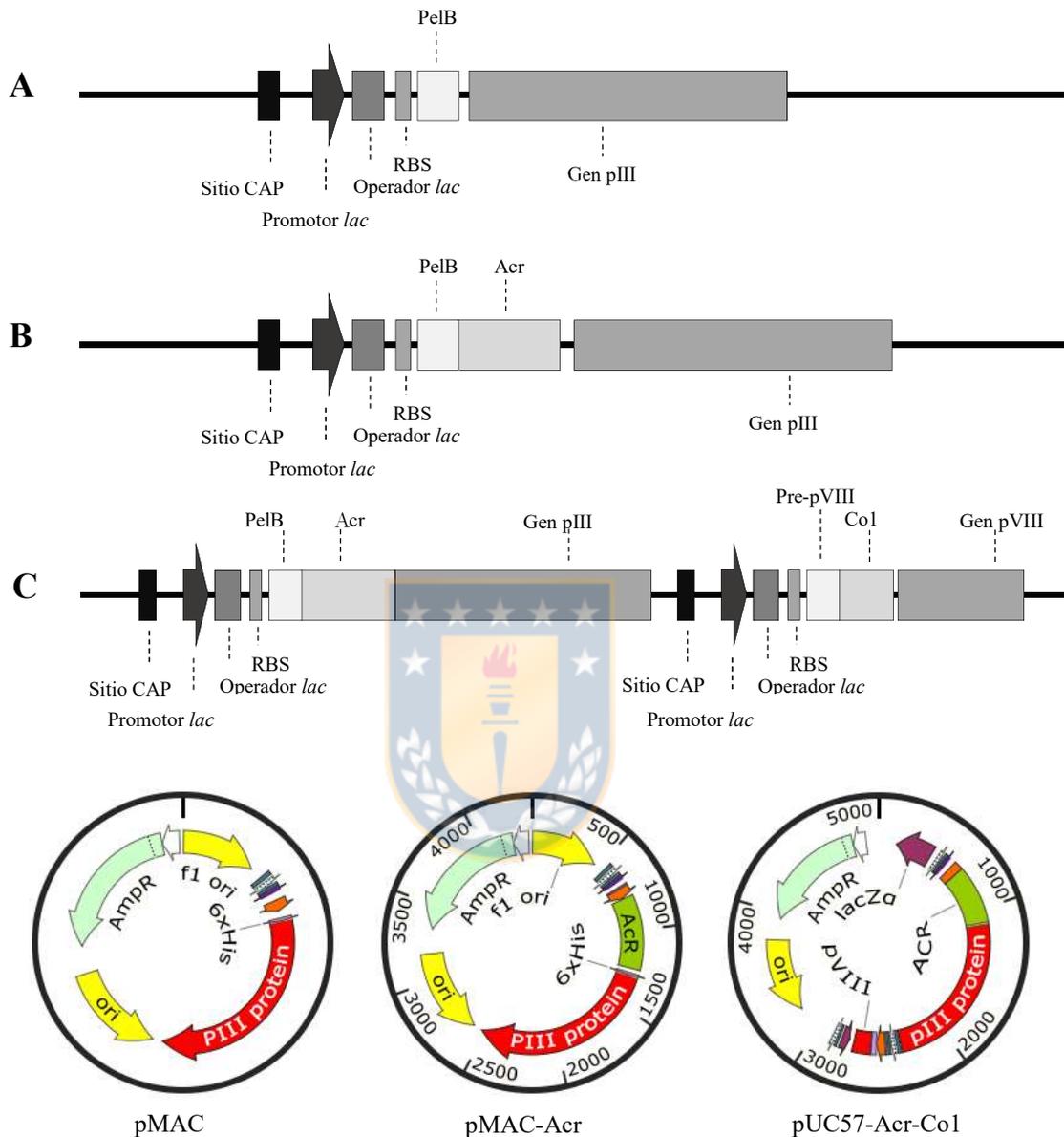


Figura 12. Diseño de casete y vectores de expresión.

Promotor *lac*: Promotor para el operón *lac*. **Operador *lac*:** El represor *lac* se une al operador para inhibir la transcripción en *E. coli*. La inhibición es eliminada en presencia de lactosa. **PelB:** Secuencia del péptido señal: pectato liasa B. **Acr:** Gen de la proteína Acr de *Mtb*. **Gen pIII:** Gen de la proteína pIII. **Sitio CAP:** Sitio de unión a proteína activadora por catabolitos. **RBS:** Sitio de unión a ribosoma. **Pre-pVIII:** Secuencia del péptido señal de la proteína pVIII. **CoI:** Gen del péptido CoI. **Gen pVIII:** Gen de la proteína pVIII. El casete (A) pertenece al vector pMAC, el casete (B) pertenece al vector pMAC-Acr y el casete (C) pertenece al vector pUC57-Acr-CoI.

Se creó una solución mezcla de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) a concentración 10 mM que contienen cada una de las bases nitrogenadas. La enzima ADN polimerasa Taq (Taq-Pol) con concentración 5 U/ μ L, se utilizó para amplificar el fragmento acotado por los partidores. Se utilizó la solución tampón PCR concentrada 10X proporcionada por el fabricante para la enzima Taq-Pol.

La preparación del tubo de reacción comprende la utilización de los reactivos a las siguientes concentraciones finales: solución tampón PCR a 1X, cada partidor a 10 μ M, ADN a 5 ng/ μ L, la enzima Taq-Pol a 0,1 U/ μ L, solución mezcla de dNTP a 200 μ M.

Los parámetros para el desarrollo de la técnica de PCR se establecieron en la interfaz del termociclador. Antes de comenzar el ciclo, el tubo de reacción se mantuvo diez minutos a 95°C, luego, considerando la temperatura de conjugación de los partidores (*primer melting temperatura*, T_m) de los partidores, cada ciclo se determinó de la siguiente manera: el proceso de desnaturalización en 30 segundos a 96°C; el de alineamiento, 30 segundos a 48°C; el de elongación, 30 segundos a 72°C. El ciclo se repitió 34 veces. Finalmente se dejó a 72°C durante diez minutos.

1.c. Electroforesis en gel de agarosa.

La medición del tamaño relativo del ADN se realizó a través de la migración de éste por un gel de agarosa 0,8% p/v y bromuro de etidio 0,02% v/v en solución tampón tris-acetato-EDTA (TAE), al ser expuesto a un campo eléctrico de 100 V durante 30 minutos, utilizando TAE al interior de la cámara electroforética en un sistema de electroforesis en gel horizontal. Se utilizó el tampón de carga de ADN *Gel Loading Dye, Purple 6X* y se disolvió en H₂O al 1X, adicionando las muestras de ADN para un volumen final de mezcla de 10 μ L por muestra. Se utilizó 3 μ L (500 ng/ μ L) de patrón de peso molecular (PPM) *1 kb DNA Ladder*. La visualización de la migración de las bandas de ADN se realizó a través del Sistema de Imagen UVISAVE HD2, el cual incorpora el transiluminador UVIPURE BXT-F26.MX, emitiendo luz ultravioleta (UV) a 312 nm de longitud de onda.

1.d. Transformación bacteriana de *Escherichia coli*.

Bacterias *E. coli* provenientes de colonia aislada se inocularon en un vial de 5mL con medio caldo de lisogenia (LB) y dejadas en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,6. Utilizando 1 mL del cultivo a $DO_{600} = 0,6$ se centrifugó a 2500 g durante cinco minutos y el sedimento fue resuspendido con 200 μ L de $CaCl_2$ a 100 mM. Se centrifugó nuevamente a 2500 g durante cinco minutos y se resuspendió el sedimento con 50 μ L. Se utilizó 5 ng de plásmido para adicionarlos a 50 μ L de bacterias, dejando reposar la mezcla en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C durante un minuto y se dejó reposando en hielo por cinco minutos. Un proceso de recuperación fue necesario, en donde se agregó 1 mL de medio LB, manteniendo la mezcla a 37°C sin agitación.

La cepa bacteriana TG1 de *E. coli* se utilizó para generar tres transformantes: la primera con el vector pMAC, la segunda con el vector pMAC-Acr y la tercera con el vector pUC57-Acr-Co1. La bacteria *E. coli* TG1 posee el factor de fertilidad (F^+) necesario para sintetizar el pili de la conjugación bacteriana. Se usó también la cepa bacteriana BL21 de *E. coli* para generar una cepa transformante con el vector pET-Acr.

Tanto las transformaciones de *E. coli* TG1 como las de BL21 se cultivaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro con agar LB y ampicilina 100 μ g/mL. Se dejaron a 37°C durante doce horas. El crecimiento de colonias indica la transformación correcta de la bacteria, puesto que *E. coli* TG1 ni BL21 nativa poseen resistencia a ampicilina.

2. Producción y purificación de la proteína Acr.

Se describe la metodología empleada en la síntesis y purificación de la proteína Acr de manera independiente a los bacteriófagos, con el propósito de utilizarla como un reactivo para otros ensayos necesarios en este trabajo.

Se utilizaron bacterias BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET-Acr para sintetizar la proteína Acr. En la **figura 13** se observa el vector pET-Acr, el cual se diseñó

para producir la proteína Acr sin el uso de bacteriófagos. Las proteínas bacterianas producidas fueron extraídas por lisis bacteriana a través de ondas ultrasónicas y la fracción soluble (FS) se purificó por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC) a través de la afinidad entre la cola de histidina presente en la proteína Acr y el Ni^{+2} acoplado a la columna, generándose una fracción no unida (FNU) y fracciones de elución (FE). El exceso de imidazol utilizado para las eluciones fue removido por cromatografía de exclusión molecular.

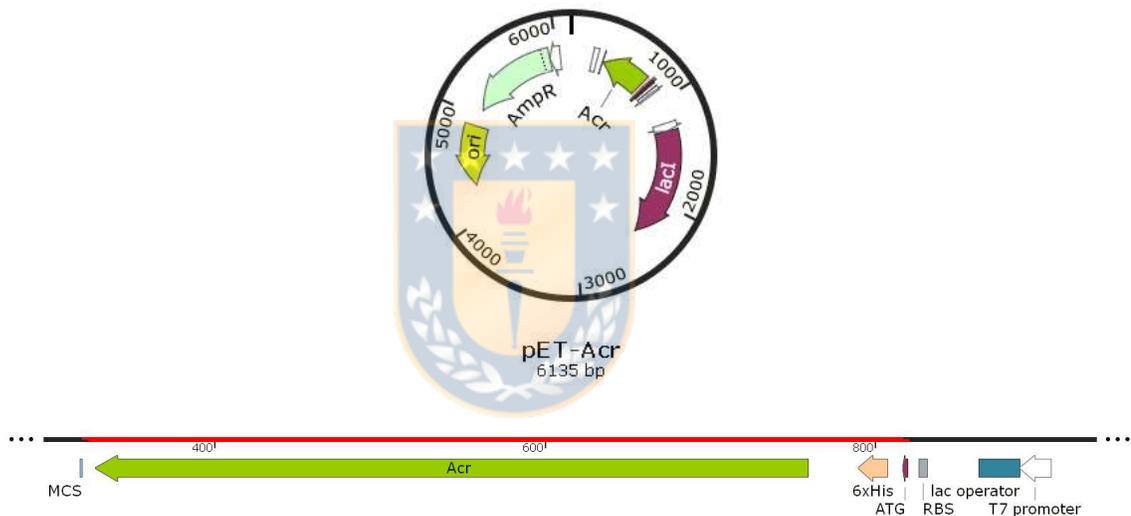


Figura 13. Vector de expresión pET-Acr.

El vector pET-Acr lleva codificada la proteína Acr unida a una cola de histidina. El sistema es regulado por el promotor T7 y el operador *lac* para ser inducible por IPTG. La construcción es transformada en bacterias BL21 (DE3) que poseen un gen de resistencia a ampicilina.

2.a. Producción de la proteína Acr.

Para la producción recombinante de la proteína Acr se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pET-Acr. En 5 mL de medio LB suplementado

con ampicilina a 100 µg/mL se inoculó una colonia de *E coli* BL21 transformada y se dejó en agitación durante 12 horas a 37°C. El cultivo fue escalado a un matraz de 2 L con 500 mL de cultivo en las mismas condiciones anteriores y se esperó hasta obtener DO₆₀₀ de 0,6 para inducir con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,4 mM.

La inducción de la expresión de la proteína Acr se mantuvo durante cinco horas a 37°C con agitación para luego centrifugar a 17000 g, 4°C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se procesó para provocar la ruptura celular.

El procedimiento para generar la destrucción de las bacterias consistió en resuspender el sedimento celular en solución de lisis celular. Se adicionaron 5 mL de solución de lisis celular por gramo de peso húmedo en conjunto con lisozima a 1 mg/mL de concentración final y se incubó durante 30 minutos en hielo. Luego se sonicó a una amplitud del 100% y con pulsos de 10 segundos entre descansos de 30 segundos.

Una vez lograda la ruptura se agregó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 0,5 mM y DNasa I a 5 µg/mL, dejando incubar durante quince minutos en hielo. La muestra se centrifugó a 17000 g durante 25 minutos a 4°C. El sobrenadante es separado y el precipitado es resuspendido en solución de lisis celular en un volumen semejante al del sobrenadante. El sobrenadante y la resuspensión son almacenados a -20°C para análisis posteriores.

2.b. Purificación de la proteína Acr.

Para la purificación de la proteína Acr se realizó una IMAC empleando el equipo *ÄKTA™ start* y usando el programa *PrimeView 5.0* basado en *UNICORN 5.01*. Se utilizó la matriz *HighTrap™ IMAC HC* suministrada con la resina *IMAC Sepharose High Performance* a 40 mg/mL. Todas las soluciones utilizadas en el *ÄKTA™ start*, incluidas la muestra y el agua destilada, son previamente filtradas por una membrana de fluoruro de polivinilideno (*polyvinylidene difluoride*, PVDF) *Durapore®* de 0,65 µm.

La matriz fue previamente lavada con 45 mL de agua destilada para luego ser cargada con NiSO₄ a 200 mM, ambos a un caudal y presión constantes de 1,3 mL/min y 0,05 MPa respectivamente, desplazando un volumen de 30 mL de NiSO₄. El exceso de NiSO₄ se lavó con 45 mL de agua destilada bajo las mismas condiciones. La muestra se diluyó a la mitad en solución tampón de equilibrio y se comenzó la carga de la muestra al sistema a un caudal de 0,8 mL/min. Las fracciones de muestra no unidas a la matriz son recolectadas. Una vez finalizado el volumen de muestra, se cargó solución de equilibrio a 1,3 mL/min hasta que los valores de absorbancia de luz UV alcanzan una estabilidad asintótica al volumen desplazado.

Para eluir las proteínas atrapadas en la columna, se utilizaron soluciones de elución en concentración ascendente de imidazol (80 mM, 150 mM, 250 mM, 350 mM y 500 mM), conservando constantes el resto de sus compuestos. Se recolectaron las fracciones de proteínas extraídas por cada solución. Se utilizó un caudal constante de 1,3 mL/min. Finalmente se lavó la columna con agua destilada bajo mismas condiciones. Los tubos de recolección de la elución fueron previamente preparados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para que quede a concentración final de 1 mM.

2.c. Extracción de imidazol de la solución de la proteína Acr.

Para extraer el imidazol de la solución se realizó una cromatografía de exclusión molecular, empleando el mismo sistema *AKTA™ start* utilizado en la purificación de la proteína Acr, pero se cambió la matriz. En este caso, se utilizó la matriz *HiTrap™ Desalting*, equipada con la resina *Sephadex G-25 Superfine*.

Todas las soluciones utilizadas fueron previamente filtradas por una membrana de PVDF *Durapore®* de 0,65 µm. El equipo se preparó con una desinfección de 40 mL de etanol 1 M, seguido de un lavado de 40 mL de agua destilada. Luego se equilibró la columna con solución tampón fosfato salino (*phosphate-buffered saline*, PBS) pH = 7,5 hasta lograr estabilidad en la medición de absorbancia y conductividad. Todo se realizó a un caudal de 1,5 mL/min.

A continuación, se cargó la muestra al sistema a un caudal de 4 mL/min hasta su agotamiento y posteriormente se cargó solución PBS al mismo caudal hasta estabilizar los parámetros. La recolección de la elusión se realizó de acuerdo con los datos de absorbancia y conductividad otorgados en la interfaz gráfica. Finalmente se lava el sistema con agua destilada a 1,5 mL/min.

3. Producción de bacteriófagos recombinantes.

En esta sección, se describe el procedimiento para la creación del bacteriófago M13KO7 *16-kDa alpha-crystallin Co1* (ϕ -Acr-Co1), del bacteriófago M13KO7 *16-kDa alpha-crystallin* (ϕ -Acr) y del bacteriófago M13KO7 *pMAC* (ϕ -pMAC), describiéndose las técnicas empleadas para la replicación bacteriana de *E. coli* TG1 e infección con el bacteriófago auxiliador M13KO7 (ϕ -M13KO7), sirviendo finalmente las bacterias como huéspedes para la producción crónica de los bacteriófagos recombinantes. Además, se describe la metodología utilizada en el estudio de la variación de las condiciones de crecimiento bacteriano en biorreactor para hacer más eficiente la producción de bacteriófagos.

3.a. Producción de bacteriófagos recombinantes en matraz.

Para la producción de bacteriófagos, primero se utilizó una colonia aislada de un cultivo de *E. coli* TG1 transformadas con pMAC, pMAC-Acr o pUC57-Acr-Co1, y se inoculó en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina 100 μ g/mL, manteniéndola doce horas en agitación a 37°C. Se preparó 50 mL de caldo 2xYT con ampicilina 100 μ g/mL en un matraz de 500 mL, asegurando una aireación de nueve veces el volumen del medio. Luego, se inoculó el cultivo bacteriano en caldo 2xYT en una relación 1/100 y se esperó hasta que se obtuvo una DO₆₀₀ de 0,6. Una vez alcanzada la DO deseada, se adicionó $2,5 \cdot 10^{11}$ unidades formadoras de colonias (ufc) del bacteriófago auxiliador M13KO7 y se incubó durante 30 minutos a 37°C sin agitación.

Después de la infección, se descartaron los bacteriófagos incapaces de infectar mantenidos en el sobrenadante, para ello se realizó una sedimentación de las células bacterianas por centrifugación a 1500 g durante diez minutos y el sobrenadante se descartó. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 40 mL de medio 2xYT, suplementado con ampicilina 100 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL e IPTG 1 mM y se mantuvieron a 30°C en agitación durante 20 horas.

El título de bacteriófagos es expresado en unidades formadoras de colonias por microlitros (ufc/µL) basado en la capacidad de infectar bacterias *E. coli* TG1 por parte del bacteriófago M13KO7 y formar colonias. La cantidad de bacteriófago auxiliador a agregar viene determinada por la **ecuación 1**, en donde se asume que: en un volumen de 1 mL de medio con DO₆₀₀ = 1 existen 10⁸ células (n° célula), para infectar una célula se necesitan 100 bacteriófagos (Φ_{célula}), y que el volumen del medio 2xYT (V_m) es de 50 mL.

$$(1) \quad \Phi_{iniciales} = n^{\circ}_{célula} \left[\frac{célula}{mL} \right] \cdot V_m [mL] \cdot \Phi_{célula} \left[\frac{ufc}{célula} \right]$$

$$\Phi_{iniciales} = 5 \cdot 10^7 \frac{célula}{mL} \cdot 50mL \cdot 100 \frac{ufc}{célula} = 2,5 \cdot 10^{11} ufc$$

3.b. Producción de bacteriófagos recombinantes en biorreactor.

La producción de bacteriófagos se escaló a volúmenes mayores utilizando un sistema fermentador discontinuo. El control de la fermentación en el biorreactor permitió la mantención constante de las variables aireación (7 L/min), pH (7,4) y temperatura (30°C). Se utilizó un vaso de 5 L para contener 1 L de medio de cultivo. Dos medios de cultivo se emplearon en el crecimiento bacteriano de *E. coli* TG1: *NZ amine*[®] y 2xYT.

E. coli TG1 previamente transformadas con el vector pUC57-Acr-Co1 e infectadas con el φ-M13KO7 se utilizaron para comenzar el crecimiento bacteriano, utilizando un preinóculo correspondiente al 10% del volumen del medio de cultivo y depositándolo en el biorreactor. Considerando las características del equipo, se ajustó la agitación a 600

min^{-1} y se mantuvo funcionando el biorreactor hasta que el cultivo bacteriano alcanzó una DO_{600} de 0,6. Una que se alcanzó la DO deseada, se indujo con IPTG 1 mM y se cambió la agitación a 800 min^{-1} . El sistema se mantuvo funcionando durante 16 horas.

La obtención de muestras para medición de DO se realizó a través de la apertura de una válvula que permite la extracción de cultivo.

3.c. Precipitación de bacteriófagos por polietilenglicol.

La producción de bacteriófagos recombinantes se centrifugó a 6000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se recuperó. Se adicionó solución polietilenglicol (PEG) y se mezcló por inversión con el sobrenadante en relación 1:4 para luego dejarlo en hielo durante una hora. Los bacteriófagos se centrifugaron a 11000 g durante 30 minutos y se eliminó el sobrenadante cuidadosamente sin desprender los bacteriófagos. Los fagos se resuspendieron en 1 mL de solución PBS.

3.d. Titulación de bacteriófagos.

La titulación de las muestras bacterianas infectadas por bacteriófagos se sembró en placas de agar LB e IPTG 1 mM con kanamicina $50 \mu\text{g/mL}$. En una placa de cultivo de 96 pocillos se dispusieron $90 \mu\text{L}$ de caldo 2xYT por pocillos y luego se agregaron $10 \mu\text{L}$ de bacteriófagos al primer pocillo para luego transferir $10 \mu\text{L}$ al pocillo siguiente mediante diluciones seriadas en base diez hasta llegar a la dilución deseada. Se adicionaron $90 \mu\text{L}$ de bacterias *E. coli* TG1 a $\text{DO}_{600} = 0,6$ a cada pocillo y se dejó incubando durante 30 minutos a 37°C sin agitación para lograr la infección. $5 \mu\text{L}$ de cada disolución se cultivaron en las placas con 5 mL de medio agar LB y dejados a 30°C durante doce horas. El título (T) de bacteriófagos viene dado por la **ecuación 2**, dónde X corresponde al número de colonias de la última dilución con crecimiento, Fd al factor de dilución final donde se observan colonias, V_p al volumen en la placa de cultivo, V_d al volumen de la dilución y V_t al volumen total.

$$(2) \quad T = \frac{X[ufc] \cdot F_d}{V_p[\mu L]} \cdot \frac{V_t}{V_d}$$

4. Detección de proteínas.

En esta sección se describe la metodología empleada para la verificación de la correcta producción de los bacteriófagos recombinantes y de la proteína Acr.

4.a. Electroforesis por gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

Para la migración de la proteína Acr y las proteínas mayores a 20 kDa presentes en el ϕ -Acr-Co1, ϕ -Acr y ϕ -M13KO7, se realizó una electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), empleando geles de 1 mm de grosor al 12%. Para preparar los geles se utilizó H₂O destilada, solución acrilamida/bisacrilamida (30% p/v acrilamida, 0.8% p/v bisacrilamida), solución Tris-HCl para gel concentrador, solución Tris-HCl para gel resolutorio, 10% p/v persulfato de amonio (PSA), 10% p/v dodecilsulfato sódico (SDS); N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina (TEMED). La composición de los geles está especificada en el anexo 1.

Se utilizó el sistema de electroforesis en gel vertical *Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell* acoplado a la fuente de poder *Electrophoresis Power Supply 300V EV202*. La separación electroforética se realizó en medio reductor con β -mercaptoetanol, el cual fue añadido al tampón de carga de proteínas tris-glicina 6X. Previa separación electroforética, a las muestras se les agregó tampón de carga a 1X final y se calentaron a 100°C en placa térmica durante cinco minutos. Se cargó 20 μ L de cada muestra en carriles independientes y se utilizó 3 μ L (0,1 ~ 0,4 μ g/ μ L de cada proteína) de *PPM Accuruler RGB Plus Prestained Protein Ladder*. Se utilizó la solución reguladora tris-glicina-SDS durante la separación a 120 V, 800 mA y 300 W durante diez minutos para el gel concentrador y a 150 V, 2000 mA y 300 W durante 1 hora y 50 minutos para el gel separador.

4.b. Tinción de geles.

La visualización de bandas proteicas para geles de poliacrilamida se realizó con solución de tinción, manteniendo el gel en agitación durante 60 minutos. Posteriormente, el gel se lavó sucesivamente con solución de destinción hasta observar bandas de proteínas definidas.

4.c. Transferencia semiseca de proteínas por campo eléctrico.

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μm Amersham™ Protan™ a través de un campo eléctrico dispuesto por el equipo de transferencia semiseco *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* a 5,5 mA/cm² de membrana y con un máximo de 25 V durante 20 minutos. La configuración de la disposición del sándwich es horizontal, donde el gel de poliacrilamida se instaló sobre la membrana de nitrocelulosa, luego se cubrieron ambos extremos con papel filtro y se humedeció el sistema con solución reguladora de transferencia.

4.d. Detección de proteínas por Western blot.

Para la comprobación de la expresión de las proteínas recombinantes transferidas en la membrana de nitrocelulosa se realizó un bloqueo en los sitios inespecíficos de la membrana con proteínas de la leche en solución al 5% p/v en tampón tris salino (*tris-buffered saline*, TBS) dos horas en agitación a temperatura ambiente o durante doce horas en agitación a 4°C. Finalizado el tiempo de bloqueo, se lavó tres veces con solución de limpieza TBS-Tween y se realizó una incubación con el anticuerpo primario durante dos horas en agitación a temperatura ambiente. Luego se lavó tres veces con TBS-Tween y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante una hora en agitación a temperatura ambiente.

La detección primaria de la proteína de TB Acr se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-Acr: TBG65 (Falero-Diaz et al. 2000), mientras que la detección primaria de la proteína de cápside viral pIII se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-M13-pIII,

ambos anticuerpos en dilución 1:5000 en leche 3% p/v con TBS. La detección secundaria se realizó con el anticuerpo policlonal anti-Fc-IgG conjugado al fluoróforo *Alexa Fluor*[®] 680 en dilución 1:5000 en leche a concentración 3% p/v en TBS.

La visualización del anticuerpo conjugado al fluoróforo se realizó utilizando el equipo detector de fluorescencia *ODYSSEY*[®] *CLx*, el cual es controlado por el programa *Image Studio Software*, versión 3.1.4.

4.e. ELISA sándwich para detección de fagos recombinantes.

La evaluación de la producción de bacteriófagos recombinantes que expresan la proteína de TB Acr se llevó a cabo a través de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) sándwich. Una microplaca plana de 96 pocillos tratada para alta adherencia se utilizó para recubrir con 100 μ L de anticuerpo monoclonal TBG65 a concentración final de 5 μ g/mL en PBS y se incubó durante doce horas a 4°C. Transcurrido el tiempo, se retiró el recubrimiento y se lavó cada pocillo dos veces con 100 μ L de solución de limpieza PBS-Tween durante tres minutos por lavado. Se bloqueó con leche descremada 5% en PBS, utilizando 300 μ L por pocillo e incubando por dos horas a 37°C. Luego, se lavó tres veces con PBS-Tween y se adicionaron 100 μ L de diluciones seriadas de cada una de las condiciones de cultivo del ϕ -Acr-Co1 hasta alcanzar una dilución 1/10240, las cuales se incubaron durante dos horas a 37°C. Posteriormente se lavó con solución de limpieza PBS-Tween tres veces. La presencia de bacteriófagos se determinó a través del anticuerpo secundario monoclonal anti-M13-pVIII conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP). Se ocupó 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) como sustrato para la enzima HRP. Se mezclaron iguales volúmenes de las soluciones sustrato TMB *Pierce*[™] y peróxido *Pierce*[™] y se agregaron 100 μ L de reactivo por pocillo. Se esperó durante quince minutos y luego la reacción se detuvo con 100 μ L de ácido sulfúrico 2 M. La DO a 450 nm (DO₄₅₀) fue detectada por el espectrofotómetro *Synergy HTX multi-mode reader* a través del software *Gen5*, versión 3.02.2.

4.f. Cuantificación de proteínas por método BCA.

El método se basa en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} con las proteínas presentes en el medio y la formación de un complejo entre el Cu^{+1} y el ácido bicinconínico (BCA), el cual genera un compuesto púrpura que puede ser detectado por el espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó a través del *Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™*, utilizando una curva de estandarización basada en albúmina de suero bovino de 5, 25, 50, 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e interpolando los valores de DO a 562 nm (DO_{562}) obtenidos de la muestra de la proteína Acr en la curva de estandarización.

5. Inmunización con bacteriófagos filamentosos en modelo murino.

En este apartado se menciona el modelo animal utilizado y el esquema de inmunización con bacteriófagos filamentosos recombinantes y controles correspondientes, donde su respuesta de anticuerpos se midió con ensayos de inmunodetección.

5.a. Modelo animal.

La determinación de la respuesta inmune se basó en los resultados entregados por el modelo animal *Mus musculus*. Para ello se emplearon ratones macho y hembra de la cepa C57BL/6 de ~14 semanas de vida obtenidos desde el Instituto de Salud Pública de Chile. El manejo animal se ejecutó por personal técnico veterinario especializado y se siguieron todos los protocolos experimentales y de manejo animal exigidos y aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Durante la realización de los experimentos, los ratones se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

5.b. Esquema de inmunización.

El experimento se dividió en dos según el método de aplicación de los compuestos: administración oral y subcutánea. Se utilizó un total de 40 ratones, los cuales se distribuyeron equitativamente según el método de administración. Los ratones se subdividieron en cuatro grupos de acuerdo con el compuesto inoculado, utilizando cinco ratones por grupo. El grupo 1 se inoculó con el ϕ -Acr-Co1, el grupo 2 con el ϕ -Acr, el grupo 3 con el ϕ -pMAC y el grupo 4 con PBS. Cada inoculación con bacteriófagos se realizó con 10^{11} ufc de bacteriófagos disueltos en PBS. Los viales empleados para el grupo 4 sólo contenían PBS.

La **ecuación 3** describe el cálculo del tamaño muestral (n), el cual se basó en una población finita de 40 ratones (N), considerando probabilidades de ocurrencia (p) y no ocurrencia (q) de eventos iguales, un nivel de significancia (α) del 5% asociado a un parámetro estadístico dependiente del nivel de significancia (Z_{α}^2) y un margen de error de estimación (e) máxima de 0,4.

$$(3) \quad n = \frac{N \cdot Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q}{e^2 \cdot (N - 1) + Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q} = 5,34 \approx 5$$

No es recomendable reducir más el tamaño de muestra por el aumento excesivo en el error tipo II, pudiendo aceptar una hipótesis nula que en realidad es falsa.

Según los esquemas de la **figura 14**, en la vía de administración oral cada ratón se inoculó una vez por semana, durante seis semanas. Mientras que, en la vía de administración subcutánea, cada ratón se inoculó en la semana 0 y la semana +14. A todos los ratones se le extrajo sangre y saliva al inicio antes de inocular y al final al momento del sacrificio. Todos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical en su última semana de extracción y se extrajo el pulmón para realizar un lavado broncoalveolar (LBA).

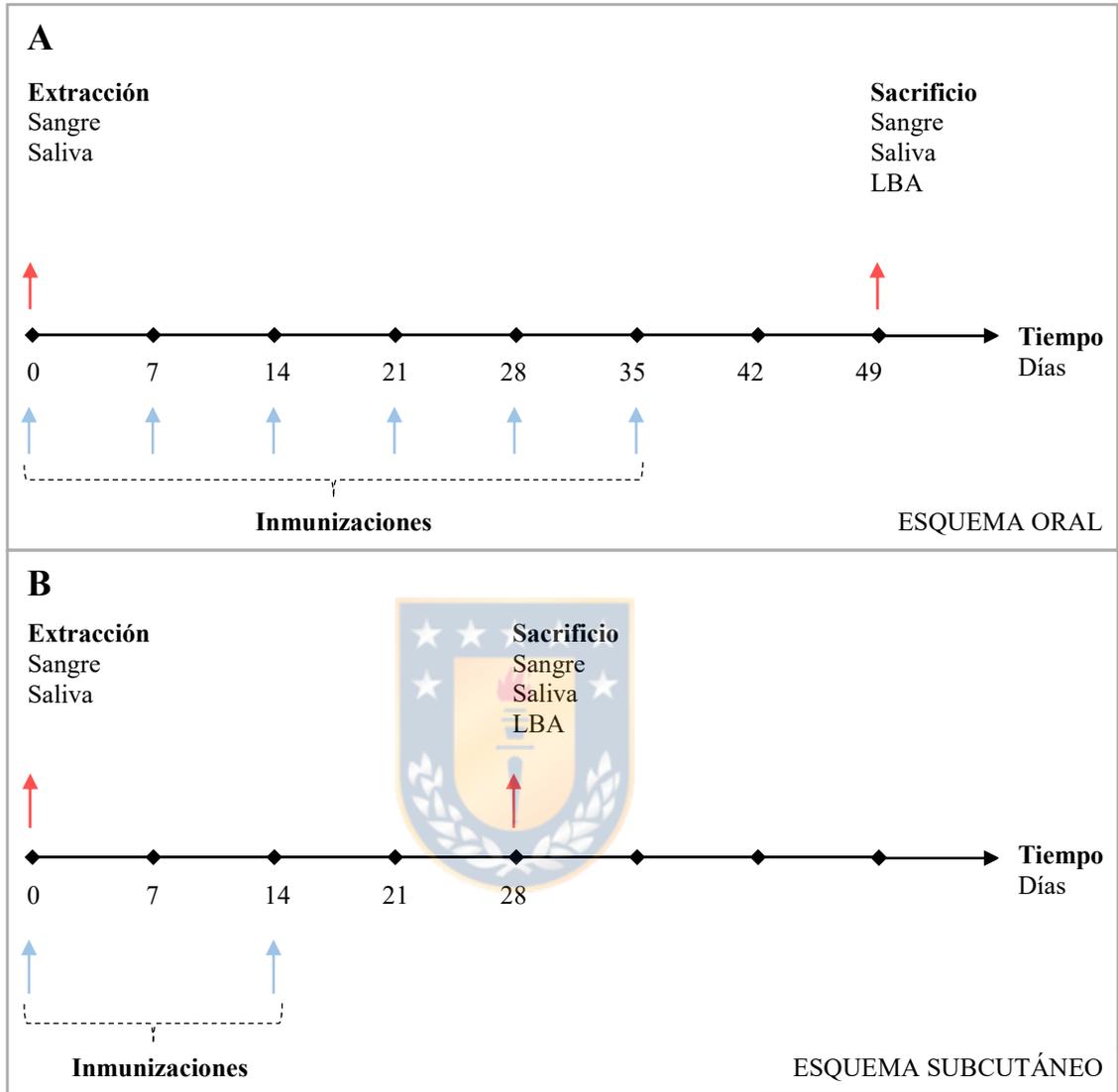


Figura 14. Esquemas de inmunización.

Se utilizaron cuatro grupos animales, donde un grupo animal lo conforman cinco ratones. Cada grupo animal fue inmunizado con uno de los siguientes compuestos: ϕ -pMAC, ϕ -Acr, ϕ -Acr-Co1 y PBS, donde las formulaciones con bacteriófagos contienen 10^{11} ufc. La formulación PBS no contiene bacteriófagos. Las inmunizaciones se realizaron bajo dos esquemas: **(A)** oral y **(B)** subcutáneo.

5.c. Inoculaciones y extracción de muestra.

Los procedimientos de inoculación y extracción de muestra de los ratones fueron realizados por personal capacitado y descritos a continuación:

5.c.1. Inoculación subcutánea.

Se mantuvo el ratón sobre la rejilla superior de la jaula, permitiéndole agarrarse a ella con las patas delanteras. Luego se levantó la piel de la espalda con los dedos índice y pulgar donde se insertó una aguja 27G en la base de la zona de piel que estamos sujetando, manteniendo la aguja paralela al cuerpo del ratón para evitar inocular en capas inferiores a la piel. Se inyectó la muestra a velocidad moderada y posteriormente se retiró la aguja, presionando la piel en la zona de la inyección para evitar que el fluido salga por el punto de la piel perforada.

5.c.2. Inoculación oral.

El ratón fue sostenido firmemente por la piel del cuello y con la cola retenida. Se dispuso de manera vertical, asegurándose de no dificultar la respiración. Es importante que el cuello esté posicionado en línea con la espina. El material líquido fue adicionado lentamente en la boca del ratón, procurando que el animal disponga de tiempo suficiente para tragar cada gota. Al finalizar de ingresar el material, el animal se mantuvo 20 segundos adicionales para asegurarse de que todo haya sido consumido.

5.c.3. Inoculación intraperitoneal.

Se procedió con el ratón correctamente inmobilizado para evitar cualquier movimiento durante el procedimiento y se inclinó caudalmente, trazando una línea imaginaria que cruza su abdomen transversalmente justo sobre sus rodillas. Una aguja 27G se insertó sobre esta línea imaginaria al lado derecho del animal, de esta manera se disminuyó el riesgo de inyectar en el ciego o la vejiga urinaria. La aguja alcanzó una profundidad aproximada de medio centímetro, inyectándose con una inclinación media de 30° con respecto a la superficie del abdomen.

5.c.4. Toma de muestra de sangre.

El ratón se sujetó estirándole la piel del cuello hacia atrás y asegurándose de no dificultar la respiración. Se insertó un capilar en el ángulo externo del ojo y se giró suavemente hasta que la sangre fluyó por el mismo. La muestra de sangre se recogió en un tubo cónico y se retiró el capilar. La zona de inserción se oprimió levemente con una gasa o papel absorbente para detener la hemorragia. Los animales se mantuvieron en observación para detectar la aparición de posibles complicaciones.

5.c.5. Toma de muestra de saliva.

El ratón fue sostenido firmemente por la piel del cuello y con la cola retenida, asegurándose de no dificultar la respiración. Luego, se inoculó pilocarpina al 1% intraperitonealmente, considerando 10 μ L por gramo de ratón. Se esperó un máximo de dos minutos hasta que el compuesto comenzó a hacer efecto, evidenciado por salivación extrema. Se sujetó nuevamente al animal y se extrajo saliva hasta que el flujo comenzó a disminuir. Cuando los animales fueron devueltos a su jaula, se aseguró el flujo de agua.

5.d. Obtención de suero desde sangre de ratón.

La obtención de suero desde la sangre de los ratones se realizó manteniendo las muestras de sangre a 37°C durante 30 minutos para luego centrifugarlas a 1500 g durante 20 minutos. El sobrenadante fue recolectado y almacenado a -20°C cuidadosamente para no remover el sedimento, el cual fue descartado.

5.e. Lavado broncoalveolar.

Para la obtención de muestra desde los pulmones se realizó un LBA. Este consistió en la exposición de la tráquea del ratón sacrificado para realizar tres lavados con PBS. En cada lavado se utilizaron 200 μ L de PBS, los cuales fueron recolectados en un tubo de microcentrífuga. La muestra se centrifugó a 100 g durante 10 minutos y se recolectó el sobrenadante.

5.f. Detección de anticuerpos en suero y saliva por ELISA indirecto.

Para la evaluación de la producción de anticuerpos específicos a la proteína de TB Acr se realizó un ELISA indirecto para la detección de IgG e IgA. Una microplaca plana de 96 pocillos tratada para alta adherencia se utilizó para recubrir con 100 μ L de la proteína de TB Acr a 5 μ g/mL en PBS y se incubó durante doce horas a 4°C.

Transcurrido el tiempo, se retiró el recubrimiento y se lavó cada pocillo dos veces con 250 μ L de solución de limpieza PBS-Tween durante tres minutos por lavado. Se continuó con el bloqueo con leche descremada 5% en PBS, utilizando 300 μ L por pocillo e incubando por dos horas a 37°C. Se lavó tres veces con solución de limpieza PBS-Tween y se procedió a agregar los sueros de ratón. 100 μ L de cada suero de ratón se incubaron durante dos horas a 37°C y posteriormente se lavó con solución de limpieza PBS-Tween dos veces. Para determinar la presencia de anticuerpos en los sueros, se utilizó el anticuerpo policlonal anti-Fc-IgG y el anticuerpo policlonal anti-Fc-IgA, ambos conjugados a la enzima HRP. Para revelar se utilizó TMB como sustrato para la enzima HRP. Se mezclaron iguales volúmenes de las soluciones sustrato TMB *Pierce*TM y peróxido *Pierce*TM y se agregaron 100 μ L de reactivo por pocillo. Se esperó por quince minutos y luego la reacción se detuvo con 100 μ L de ácido sulfúrico 2 M. La detección de la fluorescencia se realizó por el espectrofotómetro *Synergy HTX multi-mode reader* a 450 nm a través del software *Gen5*, versión 3.02.2.

6. Análisis y procesamiento de datos.

Esta última sección señala los métodos de análisis estadístico utilizado y el análisis fotográfico de resultados.

6.a. Análisis estadístico.

Para verificar normalidad, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Para analizar si existen diferencias significativas en los diferentes grupos de estudio, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de uno y dos factores. Un análisis *post hoc* se realizó con la prueba

a posteriori de Tukey HSD para determinar diferencias significativas entre las medias de los grupos. Los valores de probabilidad (p) fueron calculados considerando un α del 5% ($p < 0,05$).

6.b. Análisis de pixeles.

Se utilizó el programa ImageJ versión 1.53k para realizar el análisis de densidad y área de pixeles fotográficos.

Los análisis de pixeles de las digitalizaciones omiten el ruido generado por manchas que no corresponden a bandas de proteínas en las membranas de nitrocelulosa.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación corresponden a la continuación de la tesis de pregrado de bioingeniería titulada “**Bacteriófagos filamentosos como *carrier* para una vacuna contra *Mycobacterium tuberculosis***”, utilizando los resultados previos como antecedentes y base de la metodología aplicada para los nuevos resultados obtenidos.

En este trabajo de investigación se desarrolló una formulación vacunal basada en el antígeno Acr de Mtb y el péptido sintético Co1, ambos presentados en la superficie del bacteriófago filamentosos M13. Este fago fue generado con el vector pUC57-Acr-Co1, un vector no-fagémido sintetizado para expresar el antígeno Acr en la proteína pIII y al péptido Co1 en la proteína pVIII. El vector es expresado en la bacteria *E. coli* TG1 e infectado por el fago auxiliador M13KO7, generando el ϕ -Acr-Co1.

También se produjo el ϕ -Acr y el ϕ -pMAC. El ϕ -pMAC se generó utilizando el vector fagémido pMAC, el cual no sintetiza proteínas recombinantes. Mientras que el ϕ -Acr se generó anteriormente en el trabajo de pregrado utilizando el vector fagémido pMAC-Acr, el cual sintetiza al antígeno Acr en la proteína viral pIII.

Adicionalmente se puso a prueba el sistema de producción del ϕ -Acr-Co1 bajo dos medios de cultivo: 2xYT y *NZ amine*[®], los cuales fueron probados en un sistema fermentador bajo condiciones controladas.

Todas las formulaciones vacunales fueron inmunizadas en ratones C57BL/6 y se evaluó la capacidad de los candidatos vacunales de generar una respuesta inmune humoral mucosal contra el antígeno Acr.

RESULTADOS

1. Generación de candidatos vacunales.

En el proceso de generación de los candidatos vacunales se dividió en la utilización de técnicas de biología molecular para la síntesis y clonación de vectores recombinantes en bacterias *E. coli* TG1 para posteriormente producir bacteriófagos M13 recombinantes que expresen las proteínas codificadas.

1.a. Generación de los plásmidos pMAC, pMAC-Acr y pUC57-Acr-Co1.

El vector pMAC y el vector pMAC-Acr son fagémidos, ya que poseen dos orígenes de replicación: uno para *E. coli* y otro para el bacteriófago. El vector pMAC se diseñó para sintetizar la proteína pIII, mientras que el vector pMAC-Acr se diseñó para sintetizar la proteína Acr fusionada a pIII. Por otro lado, el vector pUC57-Acr-Co1 no es un fagémido y se diseñó para expresar la proteína Acr fusionada a pIII y el péptido Co1 fusionado a proteína pVIII. Todos los plásmidos fueron diseñados para ser transformados en *E. coli* TG1 e infectados por el fago auxiliador M13KO7. Los vectores poseen un gen de resistencia a ampicilina y son inducibles por IPTG a través del operón *lac*.

En la **figura 15** se observa una PCR corroborativa para ver la presencia del gen de interés. Los partidores utilizados flanquean una zona de 1906 pares de bases (pb), la cual pudo ser visualizada a través de un gel de agarosa al 0,8%. En el gel se muestra el producto de la amplificación por una PCR convencional del vector pUC57-Acr-Co1, corroborándose la presencia del gen Acr y de la proteína pIII por el material genético detectado ligeramente debajo de los ~2000 pb en todos los clones seleccionados.

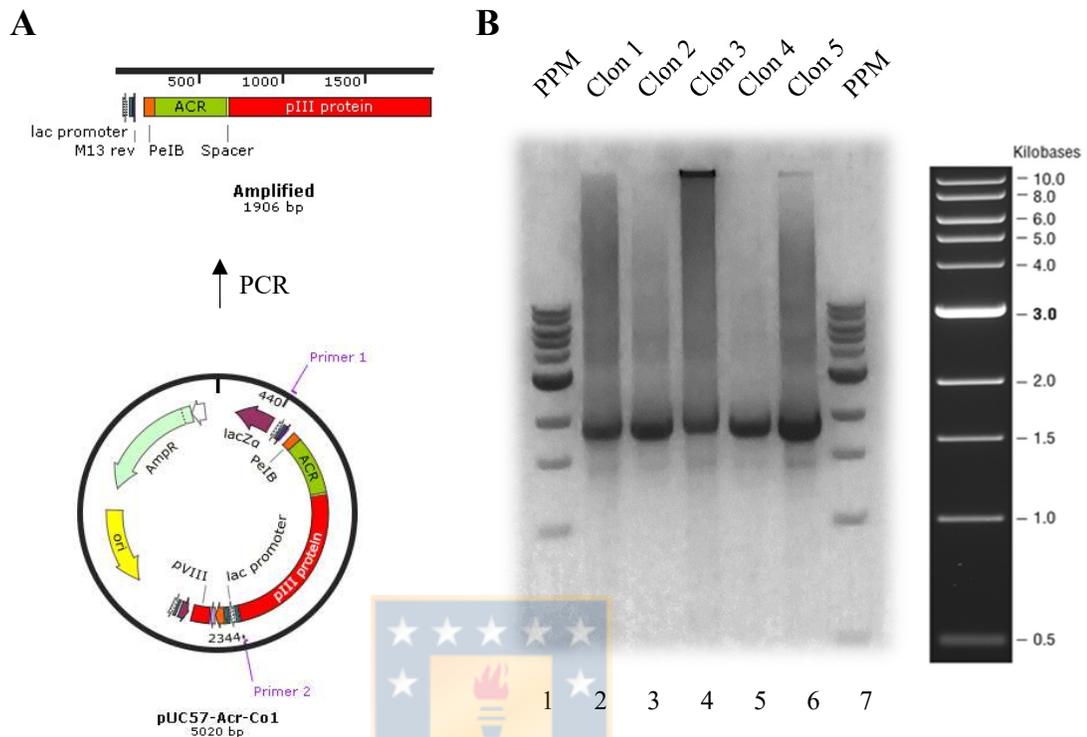


Figura 15. Verificación de la secuencia Acr en el vector pUC57-Acr-Co1.

(A) Diagrama del vector pUC57-Acr-Co1 y del amplicón flanqueado por los partidores. Los partidores se sintetizaron para flanquear la proteína pIII, la proteína Acr y sus promotores. (B) PCR corroborativo en gel de agarosa al 0,8%. Carril 1: PPM 1 kb DNA Ladder; carril 2 al 6: amplicones generados desde los plásmidos extraídos de cinco clones de bacterias TG1 transformadas con el vector pUC57-Acr-Co1; carril 7: PPM 1 kb DNA Ladder. El fragmento flanqueado por los partidores es amplificado desde el vector pMAC-Acr-Co1, visualizando una banda abajo de los ~2000 pb.

1.b. Obtención de bacteriófagos recombinantes.

La producción de los ϕ -Acr-Co1, ϕ -Acr y ϕ -pMAC se logró a partir de bacterias *E. coli* TG1 transformadas con el plásmido pUC57-Acr-Co1, pMAC-Acr y pMAC, respectivamente e infectadas con el bacteriófago auxiliador M13KO7.

El método de producción es homólogo en todos los bacteriófagos. La síntesis de las proteínas de fusión comenzó con la transformación de un cultivo de bacterias *E. coli* TG1 con los vectores. Dependiendo del plásmido transformado, el vector pUC57-Acr-Co1 sintetiza la proteína Acr y el péptido Co1; el vector fagémido pMAC-Acr sintetiza solamente la proteína Acr, mientras que el vector fagémido pMAC no sintetiza proteínas recombinantes.

La correcta transformación de *E. coli* TG1 se verificó por el crecimiento de bacterias en medio LB con ampicilina (resultados no mostrados). Las bacterias transformadas se cambiaron al medio enriquecido 2xYT, donde se esperó hasta que el cultivo bacteriano se encontrase en fase de crecimiento exponencial, el cual fue calculado en una DO₆₀₀ de 0,6.

Posteriormente, se adicionó el bacteriófago auxiliador M13KO7 al cultivo de bacterias *E. coli* TG1, comenzando el proceso de infección y replicación viral. El fago posee resistencia a kanamicina, de manera que sólo las bacterias infectadas sobrevivieron al medio selectivo con kanamicina. El fago filamentososo M13KO7 posee un proceso de replicación no lítico, por lo tanto, las bacterias no son lisadas y el proceso de producción de fagos se mantiene constante.

La expresión de la proteína Acr-pIII en el ϕ -Acr-Co1 y en el ϕ -Acr se corroboró realizando un análisis de detección de la proteína Acr a través de western blot, donde se empleó un clon del ϕ -M13KO7 como control negativo, tres clones del ϕ -Acr y cuatro clones del ϕ -Acr-Co1. Para detectar la proteína Acr se utilizó el anticuerpo monoclonal TBG65, mientras que para detectar la proteína pIII se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-M13-pIII. Ambos anticuerpos fueron detectados por el anticuerpo secundario anti-Fc-IgG conjugado a Alexa Fluor[®] 680. Los resultados se visualizan en la **figura 16**.

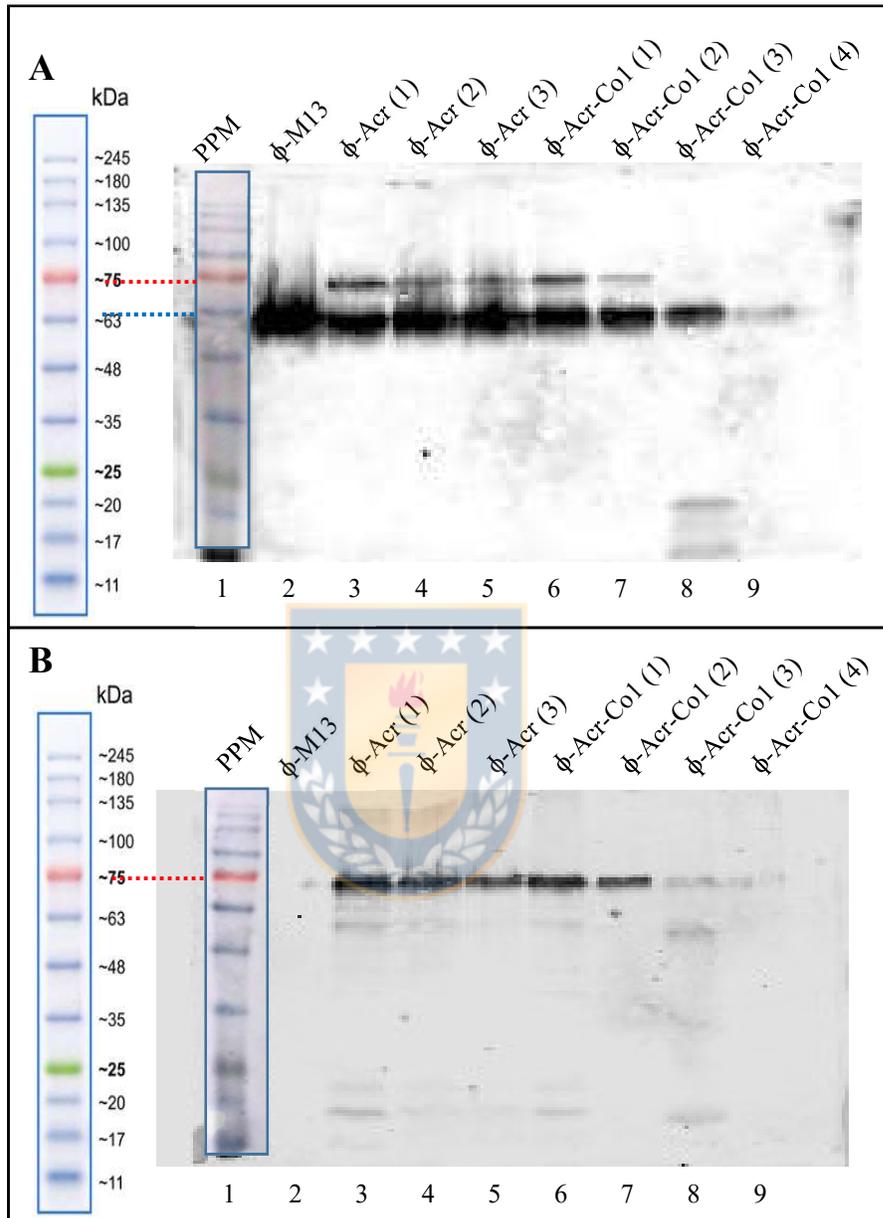


Figura 16. Análisis de expresión bacteriófaga de la proteína Acr y de la proteína viral III.

Western blot revelado a través de la detección de fluorescencia del anticuerpo secundario anti-Fc-IgG conjugado al fluoróforo *Alexa Fluor*[®] 680 usando (A) el anticuerpo primario anti-M13 contra la proteína III del bacteriófago M13 y (B) el anticuerpo primario anti-TBG contra la proteína Acr de Mtb. Carril 1: patrón de peso molecular (PPM), carril 2: fago M13KO7 (ϕ -M13), carril 3 al 5: clon 1, 2 y 3 del fago recombinante Acr (ϕ -Acr), carril 6 al 9: clon 1, 2, 3 y 4 del fago recombinante Acr-Co1 (ϕ -Acr-Co1).

En la **figura 16A**, la inmunodetección corresponde a la proteína viral pIII. En ella se observaron bandas a una altura de ~75 kDa para los clones 1, 2 y 3 del ϕ -Acr y para los clones 1 y 2 del ϕ -Acr-Co1. También se observaron bandas más gruesas a la altura de ~60 kDa en todas las muestras. En la **figura 16B** se utilizó el anticuerpo TBG65, específico para la proteína Acr. Las bandas asociadas a la detección de la proteína Acr están posicionadas a una altura de ~75 kDa, con fuerte fluorescencia en los clones 1 al 3 del ϕ -Acr y en los clones 1 y 2 del ϕ -Acr-Co1. En el control negativo, el ϕ -M13KO7 no presentó bandas observables. El clon 3 y 4 del ϕ -Acr-Co1 presenta bandas casi imperceptibles a la altura de ~75 kDa.

2. Variación de los medios de cultivo bacteriano.

Para comparar los medios de cultivo bacteriano, se utilizaron bacterias *E coli* TG1 transformadas con el vector pUC57-Acr-Co1, el cual genera bacteriófagos ϕ -Acr-Co1 al ser infectado con el ϕ -M13.

2.a. Evaluación del crecimiento bacteriano.

Se midió el crecimiento bacteriano representado por la DO_{600} a través del tiempo en un biorreactor de sistema de cultivo discontinuo, utilizando dos medios de cultivo: 2xYT y *NZ amine*[®]. En la **figura 17**, se observaron crecimientos similares de las bacterias *E. coli* TG1 en los medios de cultivo *NZ amine*[®] y 2xYT. La DO_{600} alcanzada en el medio 2xYT es un 13% más elevada que la alcanzada en el medio *NZ amine*[®] una vez transcurridos entre 19 a 20 horas de crecimiento.

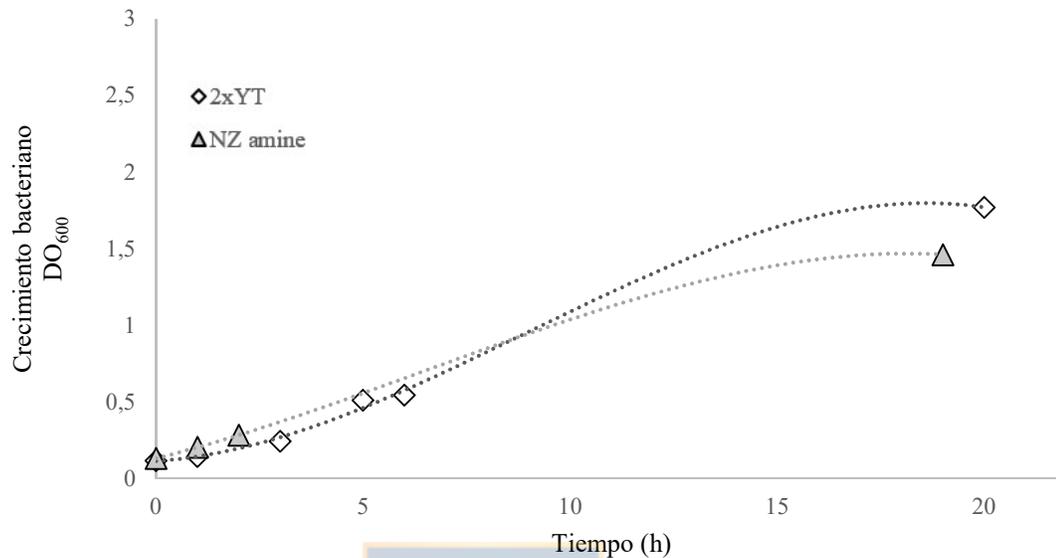


Figura 17. Producción bacteriana en distintos medios de cultivo.

Crecimiento de bacterias *E. coli* TG1 infectadas con ϕ -Acr-Co1, representado en dos medios de cultivo: medio 2xYT por marcas con rombos (\diamond) y medio *NZ amine*[®] por marcas triangulares (\triangle). Líneas punteadas corresponden a tendencias polinómicas de grado 3.

2.b. Evaluación de la expresión de la proteína Acr.

Posteriormente al crecimiento bacteriano, se recolectaron los bacteriófagos producidos en el biorreactor de cada uno de los medios de cultivo y se determinó la expresión de la proteína Acr del ϕ -Acr-Co1 en medio reductor a través de inmunodetección con el anticuerpo TBG65, específico contra la proteína Acr.

En la **figura 18** se visualizan los western blot de los bacteriófagos producidos en el biorreactor según el medio de cultivo: 2xYT y *NZ amine*[®]. A la altura de ~75 kDa se observa una banda correspondiente a la proteína de fusión Acr-pIII en todos los western blot, donde la intensidad y el grosor de las bandas fue mayor al utilizar el medio *NZ amine*[®]. También se observó una banda a la altura de ~32 kDa al utilizar el medio *NZ amine*[®].

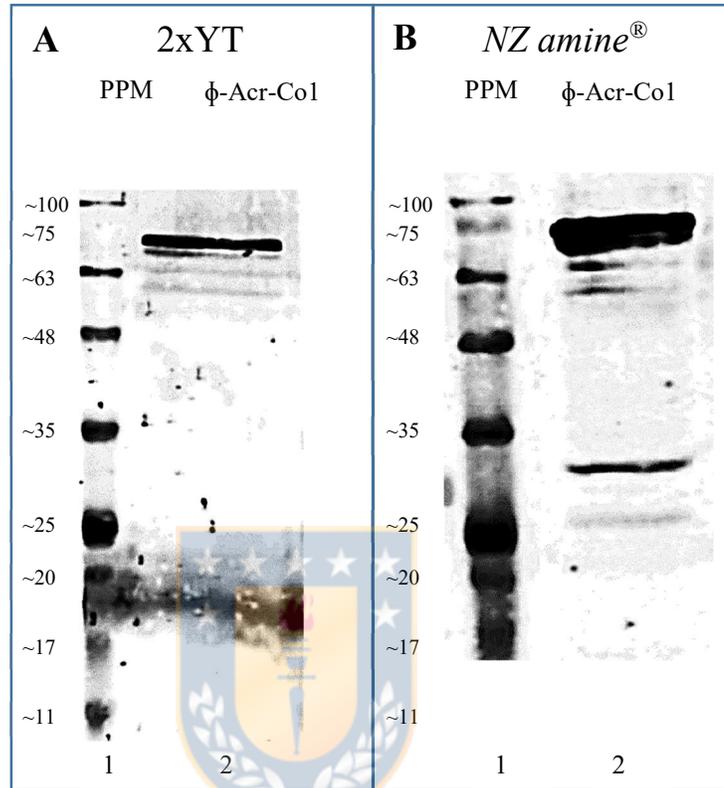


Figura 18. Expresión de la proteína Acr en el bacteriófago M13 en biorreactor.

Western blot revelado a través de la detección de fluorescencia del anticuerpo secundario anti-Fc-IgG conjugado al fluoróforo *Alexa Fluor*[®] 680. Se usó el anticuerpo primario TBG65 para detectar la proteína Acr de Mtb en el ϕ -Acr-Co1 producido a partir de un cultivo de *E. coli* TG1 en biorreactor con **(A)** medio 2xYT y **(B)** medio *NZ amine*[®]. Carriles 1: patrón de peso molecular (PPM), carriles 2: ϕ -Acr-Co1.

El proceso de recuperación de bacteriófagos desde el sobrenadante del cultivo bacteriano requiere de su precipitación con PEG. Para determinar el porcentaje de pérdida en el procedimiento de recuperación se compararon los bacteriófagos totales presentes en el sobrenadante del cultivo bacteriano y los presentes en el precipitado con PEG. En la **figura 19** se puede observar la comparación de bacteriófagos totales presentes en un

cultivo de 50 mL del ϕ -Acr-Co1 en medio 2xYT y en medio *NZ amine*[®] a través de la medición del título viral.

El porcentaje de recuperación viral del ϕ -Acr-Co1 en medio *NZ amine*[®] fue del 80%, mientras que el del ϕ -Acr-Co1 en medio 2xYT fue del 100%. También se puede observar que la producción de bacteriófagos precipitados totales, en el medio *NZ amine*[®] es de $4,8 \cdot 10^{14}$ ufc, mientras que en el medio 2xYT es de $2 \cdot 10^{14}$ ufc.

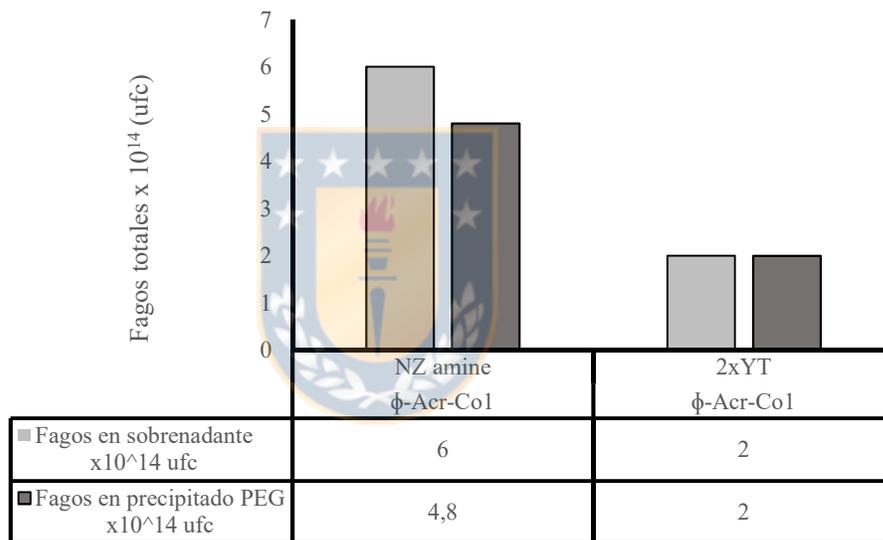


Figura 19. Recuperación de bacteriófagos por precipitación con polietilenglicol.

Bacteriófagos totales medidos desde sobrenadantes de cultivos bacterianos versus bacteriófagos totales recuperados por precipitación con PEG. Dos cultivos de 50 mL con *E. coli* TG1 se realizaron, utilizando el ϕ -Acr-Co1 en medio 2xYT y *NZ amine*[®].

En la **figura 20** se graficó la DO_{450} con relación al inverso del logaritmo de la dilución de virus para ver la detección de la proteína Acr en la superficie del ϕ -Acr-Co1 completo mediante un ELISA sándwich.

Desde el ensayo se observa que la detección de bacteriófagos es mayor cuando crecen en medio *NZ amine*[®] en biorreactor.

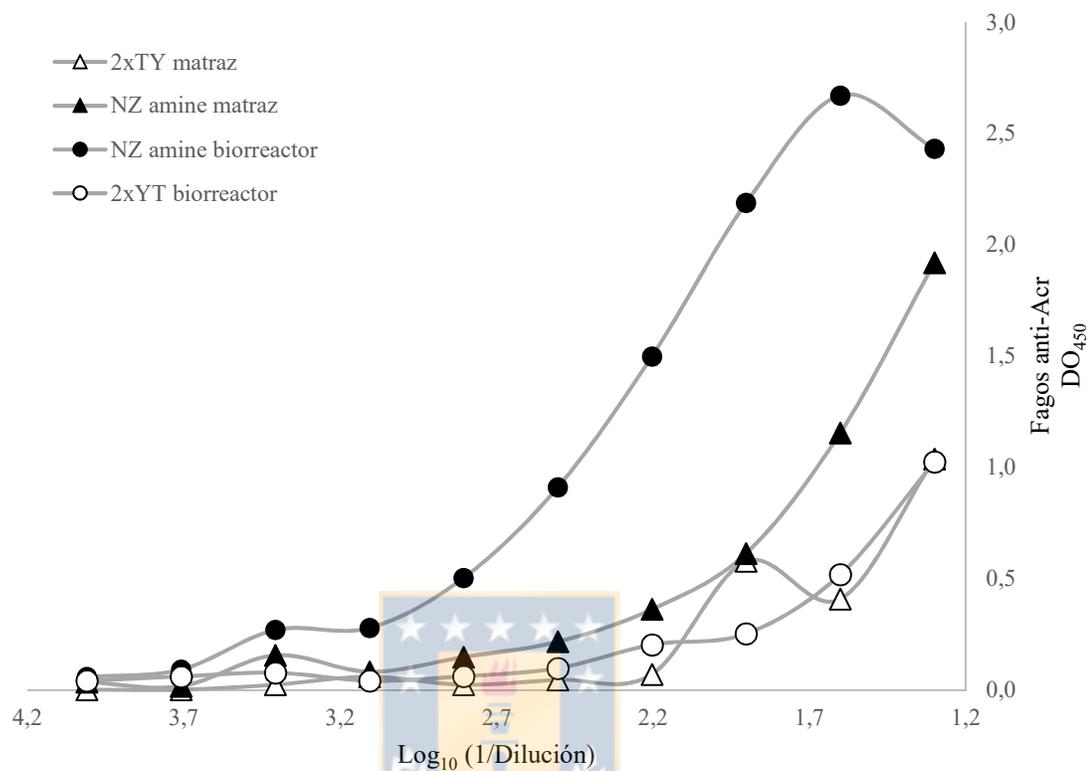


Figura 20. Expresión de la proteína Acr en el ϕ -Acr-Co1.

ELISA sándwich del ϕ -Acr-Co1, utilizando el anticuerpo TBG65 adherido a la superficie y revelado con el anticuerpo anti-M13-pVIII conjugado a HRP. Se grafica la DO_{450} contra el logaritmo del inverso de la dilución del intervalo seleccionado. Se utilizan dos medios de cultivo: en marcas blancas medio 2xYT, en marcas negras medio *NZ amine*[®]. En marcas circulares producción realizada en biorreactor de 1 L, en marcas triangulares producción realizada en matraz de 50 mL.

3. Producción y purificación de la proteína Acr.

La FS obtenida desde el lisado de las bacterias BL21 fue purificada por IMAC, obteniéndose el cromatograma de la **figura 21**. En el gráfico se observó que la FNU está ubicada entre ~70 a ~100 mL del volumen desplazado y que las fracciones de elución se ubicaron a ~42, ~77, ~108, ~148 y ~198 mL de volumen desplazado, las cuales corresponden a concentraciones de 80, 150, 250, 350 y 500 mM de imidazol.

En las fracciones de lavado con 80, 150 y 250 mM de imidazol no se observan cambios significativos en la absorbancia. Solo a partir de la fracción de elución con 350 mM de imidazol se observa un aumento significativo de la absorbancia. En la fracción de elución a 500 mM de imidazol se observa un máximo de absorbancia.

Las FE recolectadas de la IMAC se analizaron a través de la migración de proteínas por SDS-PAGE. En la **figura 22A**, el gel se tiñó con azul de Coomassie pudiéndose observar gran cantidad de bandas en la FS y en la FNU. En la FNU disminuye notablemente la intensidad y grosor de la banda localizada a la altura de ~17 kDa que estaba presente en la FS. En la FE a 350 y 500 mM, ubicada en los carriles 7 y 8 se observa una banda fuertemente teñida a la altura de ~17 kDa.

En la **figura 22B** se observa el análisis de expresión de la proteína Acr a través de su detección con el anticuerpo TBG65. Se observa una banda en todas las fracciones a la altura de ~17 kDa, variando su intensidad y grosor según la fracción visualizada. El análisis de píxeles representa las intensidades y grosores de las bandas visualizadas a ~17 kDa, observando lo siguiente: la mayor intensidad de banda se encuentra focalizada en la FS; la banda ubicada en la FNU es relativamente tres veces menos intensa que la banda de la FS; la banda en la FE a 350 mM es cuatro veces menos intensa que la banda de la FS; las bandas de los carriles 7 y 8 correspondientes a la FE a 500 mM mantienen intensidades similares, pero levemente menores a la intensidad de la banda de la FS. Finalmente, las bandas encontradas en los carriles 4 y 5 son muy tenues, donde el valor gris se encuentra alrededor de once veces más bajo que el máximo alcanzado en la FS.

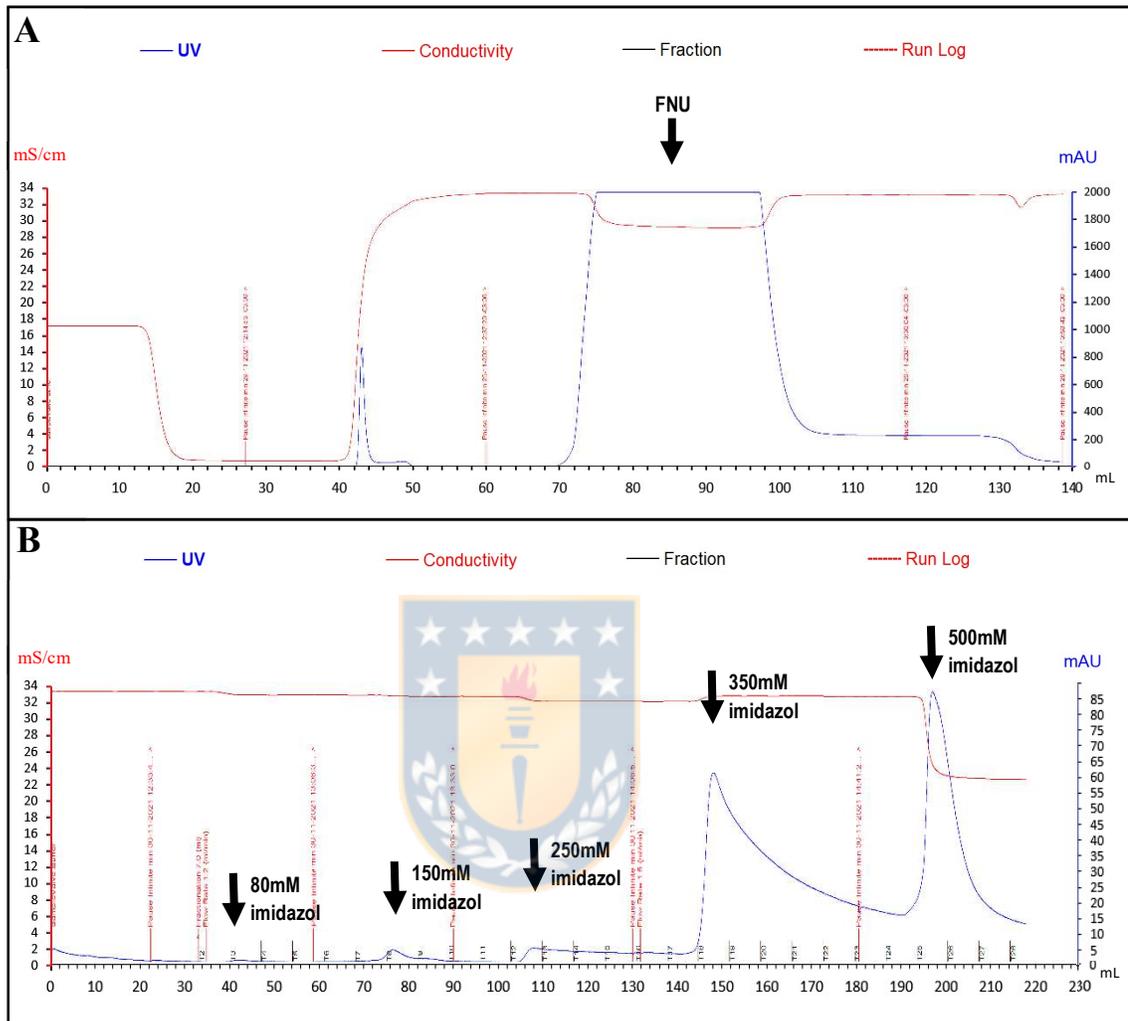


Figura 21. Purificación de la proteína Acr recombinante expresada en *E. coli* BL21.

Cromatograma de afinidad con iones metálicos inmovilizados. Se mide absorbancia a 280 nm (mAu) y conductancia (mS/cm) a través del volumen desplazado (mL) representando el paso de las proteínas a través de los detectores. **(A)** Entre ~70 a ~100 mL de volumen desplazado hay un pico que sobrepasa los límites de detección de absorbancia y un baja en los niveles de conductancia que representan a la fracción no unida (FNU). **(B)** Las fracciones de elución a 80, 150, 250, 350 y 500 mM son colectadas, donde los picos de absorbancia representan el paso de proteínas por el detector.

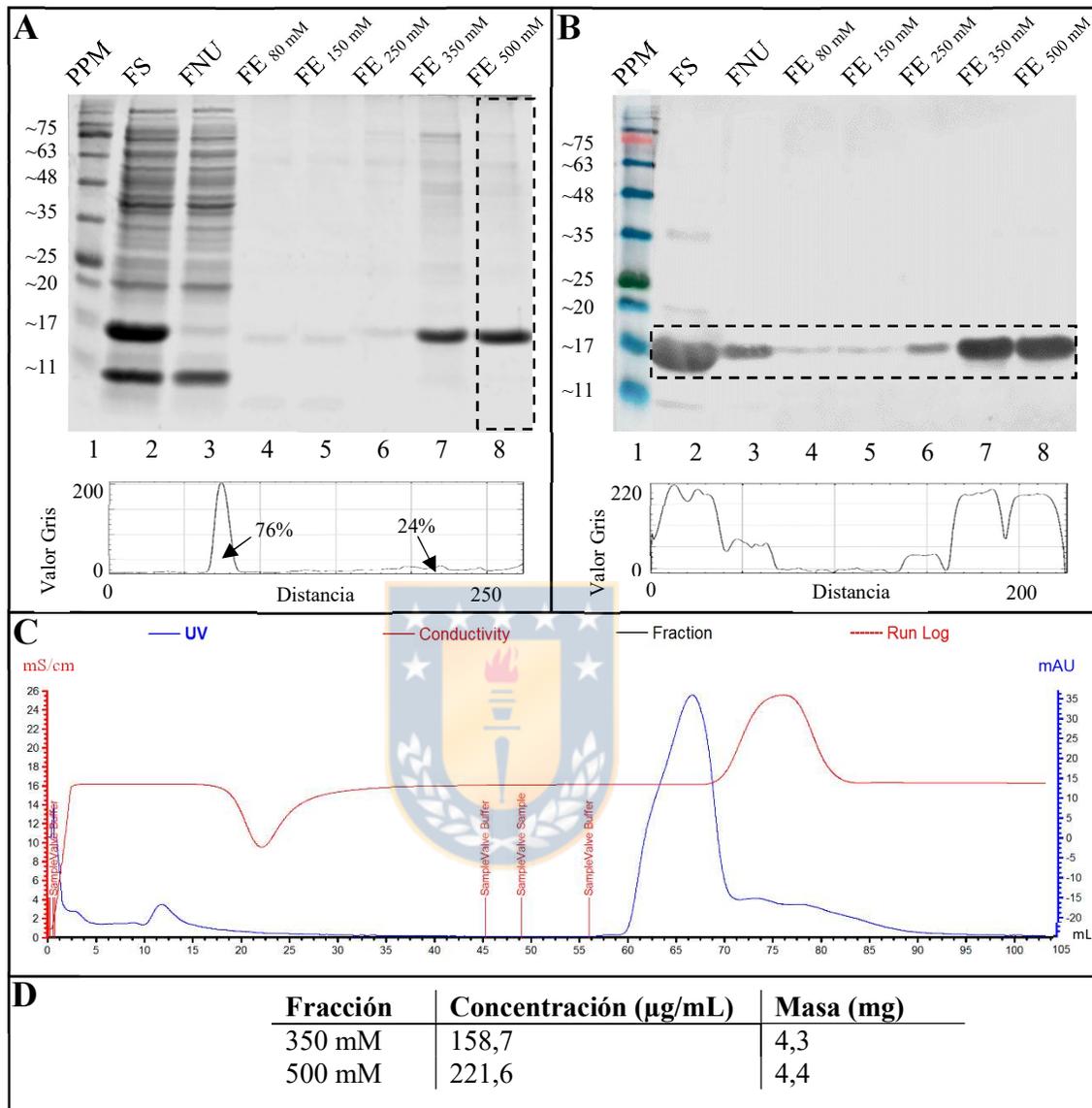


Figura 22. Detección, extracción de imidazol y cuantificación de proteína Acr expresada en *E. coli* BL21.

Las fracciones de elución (FE) son analizadas a través la migración de proteínas por SDS-PAGE al 15%. Carril 1: PPM, carril 2: fracción soluble (FS), carril 3: fracción no unida (FNU), carriles 4 a 8: FE en concentraciones ascendentes de imidazol de 80, 150, 250, 350 y 500 mM respectivamente. **(A)** Gel teñido con azul de Coomassie. Se añade análisis de píxeles para ver pureza del cuadro punteado. **(B)** Inmunodetección contra la proteína Acr de *Mtb*. Se añade análisis de píxeles del cuadro punteado. **(C)** Cromatograma de exclusión molecular. Se mide absorbancia a 280 nm (mAu) y conductividad (mS/cm) a través del volumen desplazado (mL). **(D)** Cuantificación de la proteína Acr por método BCA de las FE en 350 y 500 mM de imidazol.

El contenido de imidazol de la FE a 500 mM se extrajo por cromatografía de exclusión molecular a través de una resina de desalinización obteniéndose los resultados de la **figura 22C**. La curva de color azul indica la absorbancia en el espectro UV a 280 nm y la roja indica la conductividad eléctrica. La absorbancia representa la presencia de la proteína Acr, la cual se empezó a recolectar cuando se había desplazado un volumen de ~60 mL y se terminó de recolectar a los ~68 mL, momento en que la curva de conductividad empezó a crecer, lo cual indica el paso de imidazol por el detector.

La cantidad de proteína Acr presente después de la extracción de imidazol se cuantificó por método BCA, determinando sólo las proteínas de los tubos de elución a partir de las FE a 350 y 500 mM. En la **figura 22D** se observan los resultados, donde se cuantificaron 4,3 mg en la elución a 350 mM y 4,4 mg en la elución a 500 mM de la proteína Acr.

4. Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por bacteriófagos.

Se determinó la respuesta de anticuerpos IgG en suero y la de IgA en LBA y saliva a través de un ELISA indirecto, determinando la cantidad de inmunoglobulinas específicas contra el antígeno Acr a través de la medición de la DO₄₅₀ nm de las muestras en una dilución a la centésima parte. En los gráficos de la **figura 23** se visualiza el desarrollo de anticuerpos IgG e IgA considerando la toma de muestra de ratones antes de ser inoculados (T₀) versus la toma de muestra de ratones inoculados del último día antes del sacrificio de cada uno de los grupos.

Los grupos de ratones se clasificaron según el compuesto inmunizado: grupo 1 con ϕ -Acr-Co1, grupo 2 con ϕ -Acr, grupo 3 con ϕ -pMAC y grupo 4 con PBS. Para recubrir los pocillos se utilizó la proteína Acr procesada a partir de la FE a 500 mM.

Para analizar las variables, los resultados se agruparon por IgA en saliva, IgA en LBA e IgG en suero, donde estos resultados se analizaron de acuerdo con la vía de inoculación y al compuesto inoculado.

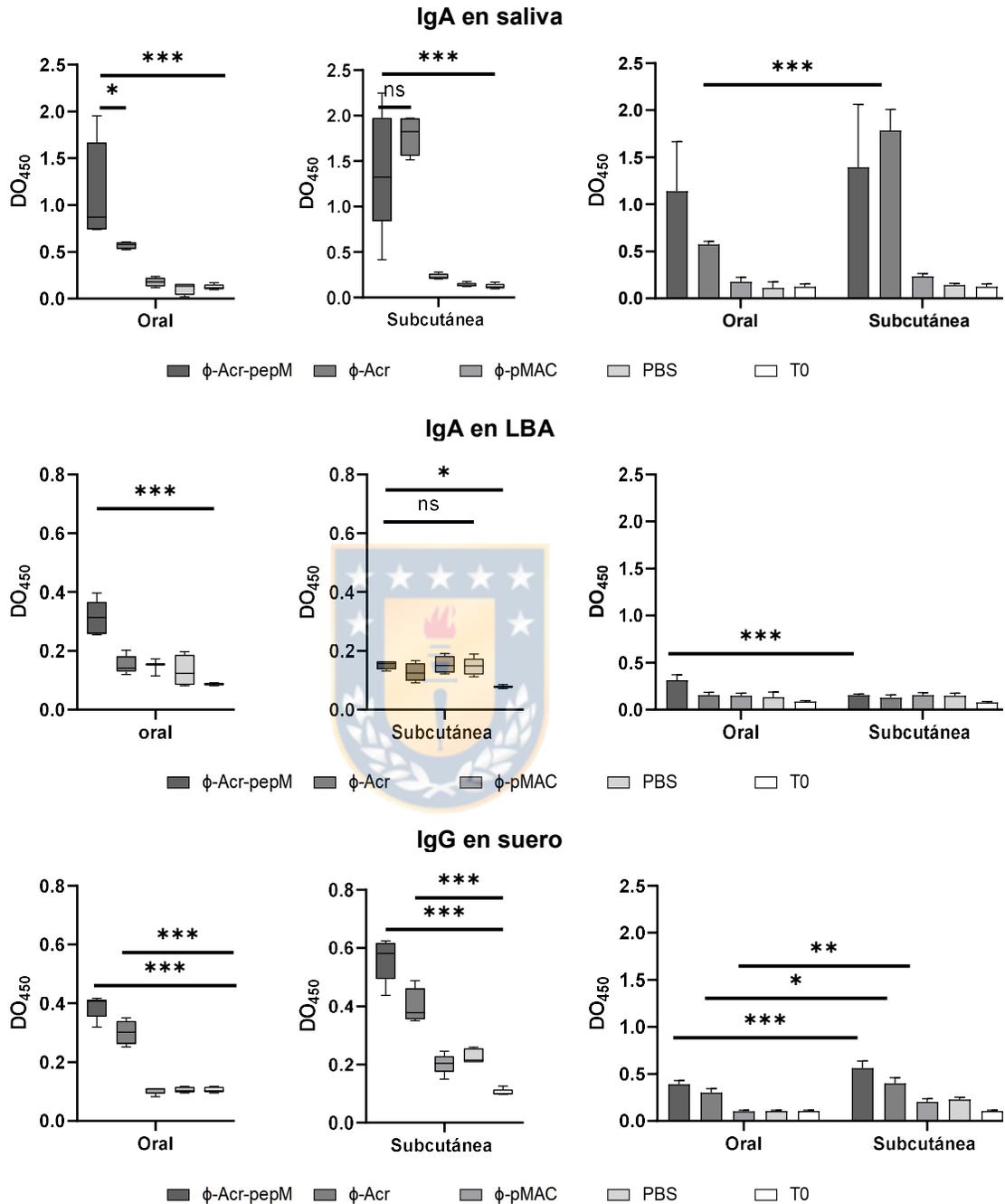


Figura 23. Evaluación respuesta inmune humoral IgA e IgG según vía de inoculación.

ELISA indirecto de sueros y saliva contra la proteína Acr detectada con los anticuerpos policlonales anti-Fc-IgG y anti-Fc-IgA. Se visualiza la distribución de la DO_{450} de cada grupo de estudio según el anticuerpo detectado (IgA o IgG), el origen de la muestra (suero, saliva o LBA) y la vía de inoculación (oral o subcutánea). (*) = α menor ($p < 0,05$), (**) = α medio ($p < 0,01$) y (***) = α alto ($p < 0,001$).

Según los niveles de DO_{450} de IgA en saliva, estos fueron en promedio cuatro veces mayores que los alcanzados en el resto de los gráficos, También se observó que la media de los anticuerpos detectados de los grupos inoculados con el ϕ -Acr-Co1 y con ϕ -Acr fueron significativamente mayores que las medias del resto de los grupos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos por la vía subcutánea, pero si una diferencia significativa menor por la vía oral. El análisis entre vías de administración determinó que la administración subcutánea generó niveles significativamente mayores de anticuerpos que la vía oral.

Los gráficos de IgA desde LBA por la vía subcutánea no mostraron diferencias relevantes entre los grupos de estudio. Por la vía oral si se encontró un aumento significativo en el grupo inoculado con el ϕ -Acr-Co1 respecto al resto de los grupos. La comparación entre vías de inoculación demostró que existe un aumento significativo en los niveles de anticuerpos generados por la vía oral frente a la vía subcutánea.

En relación con la detección de IgG en suero, se encontraron aumentos significativos en los niveles de anticuerpos de los grupos inoculados con el ϕ -Acr-Co1 y con el ϕ -Acr en comparación con todos los otros grupos, donde el efecto generado por la utilización del ϕ -Acr-Co1 es significativamente mayor que el generado por el ϕ -Acr. Al comparar los niveles de DO_{450} entre las vías de inoculación se observa que la inoculación a través de la vía subcutánea es significativamente mayor que la vía oral.

DISCUSIÓN

Es importante destacar que este trabajo no pretende crear las bases de una vacuna de reemplazo para BCG. Es más lógico utilizar la vacuna BCG como una base y el desarrollo del candidato vacunal como un potenciador.

1. Generación de plásmidos.

La construcción de vectores para bacteriófagos se basó en la expresión de las proteínas Acr, pIII, Co1 y pVIII. El vector pUC57-Acr-Co1 tiene los genes de las cuatro proteínas recién mencionadas, el vector pMAC-Acr posee sólo los genes de las proteínas Acr y pIII, mientras que el vector pMAC se utilizó como control negativo porque posee solamente el gen de la proteína pIII.

En la **figura 12** se esquematizan los vectores de expresión de los tres plásmidos para bacteriófagos, los cuales están regulados por el operón *lac* y sus respectivos elementos de control para poder ser inducible por IPTG. Se destaca el sitio de unión a la proteína activadora por catabolitos (CAP), donde la unión de CAP activa la transcripción en presencia de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) de los genes del operón *lac*. CAP forma un dímero con AMPc necesario para la unión de la ARN polimerasa al promotor del operón lactosa (Busby and Ebright 1999).

Se incluyeron los genes para el péptido señal de exportación: pectato liasa B (PelB), y para la señal denominada pre-pVIII, necesarias para la apropiada translocación de la proteína de fusión Acr-pIII y de la proteína Co1-pVIII, respectivamente hacia el periplasma de la bacteria *E. coli* TG1 (Singh et al. 2013; Steiner et al. 2006), señales que luego son removidas por peptidasas y necesarias para dirigir las proteínas a la vía general de translocación dependiente de Sec (García-Gómez and González-Pedrajo 2011). Su propósito es la adquisición de las proteínas recombinantes alojadas en el periplasma *en trans*, refiriéndose por *trans* al efecto de la acción intermolecular ajena al codificado originalmente por el material genético del virus, en este caso, las proteínas sintetizadas

previamente por la bacteria antes de la infección. Entonces, cuando el bacteriófago se empaqueta, las proteínas virales propias del virus y las proteínas recombinantes sintetizadas con anterioridad son acopladas indiscriminadamente. Como consecuencia, el bacteriófago final posee en su cápside proteínas heterogéneas propias del bacteriófago y de proteínas recombinantes.

Para la construcción del vector encargado de la producción de la proteína Acr se utilizó el plásmido pET-Acr. Este plásmido proviene del vector comercial pET-15b, modificado con la inserción de la secuencia Acr en conjunto con una cola de histidina para su purificación. El vector lleva el promotor T7 para la unión de la ARN polimerasa T7, enzima que realiza la transcripción de manera más eficiente (Borkotoky and Murali 2018). Este plásmido se transformó en bacterias BL21 (DE3) porque el gen de la ARN polimerasa T7 está codificado en el ADN cromosomal de la bacteria (Du et al. 2021). Este vector lleva además el operador *lac* y el gen *lacI*, los cuales permiten el funcionamiento del sistema inductivo de la transcripción por IPTG.

La presencia del casete de expresión en el plásmido pUC57-Acr-Co1, fue corroborada a través de una PCR como se muestra en la **figura 15B**. El tamaño visualizado en el gel de agarosa para la secuencia codificante está entre las bandas de 1500 a 2000 pb en todos los clones examinados, estimando una ubicación ~1900 pb, lo que se ajusta al tamaño esperado de la amplificación y se corrobora la presencia del casete de expresión.

2. Generación de bacteriófagos.

La separación de proteínas por SDS-PAGE es un proceso realizado en condiciones desnaturantes, esto significa que las uniones no covalentes, en adición con las uniones disulfuro reducidas por β -mercaptoetanol, se rompen y las proteínas pierden su conformación estructural, permitiendo la separación de proteínas según su masa. Bajo el principio de la técnica, en el ensayo es utilizado el anticuerpo monoclonal anti-M13-pIII para detectar la proteína viral pIII, donde se puede ver en la **figura 16A** que todos los clones del ϕ -Acr y los clones 1 y 2 del ϕ -Acr-Co1 exhiben dos bandas: una a ~60 kDa y

otra a ~75 kDa, mientras que en los clones 3 y 4 del ϕ -Acr-Co1 y en el ϕ -M13KO7 no se observaron bandas a la altura ~75 kDa. Esto quiere decir que los bacteriófagos que poseen ambas bandas expresan la proteína pIII a la altura de ~60 kDa y la proteína pIII fusionada a otra proteína a la altura de ~75 kDa, mientras que los bacteriófagos que sólo detectan una banda a los ~60 kDa expresan solamente la proteína pIII en su estructura.

En la **figura 16B** se utilizó el anticuerpo monoclonal TBG65, específico para la proteína Acr, donde se observó notoriamente una banda con una masa relativa de ~75 kDa en todos los clones ϕ -Acr y en los clones 1 y 2 del ϕ -Acr-Co1, corroborándose la presencia de la proteína Acr en el bacteriófago.

Al coincidir la detección de la proteína Acr y de la proteína pIII a ~75 kDa en los bacteriófagos recombinantes (con excepción de los clones 3 y 4, donde la detección de bandas a esa altura es demasiado tenue con TBG65 y nula con anti-M13-pIII), mientras que en control negativo nunca se detectan bandas a ~75 kDa, se concluye que ambas proteínas son las mismas, demostrando que la expresión de la proteína de fusión Acr-pIII en la superficie del bacteriófago se ha logrado.

Además, según la literatura, la proteína Acr tiene un peso de 16,3 kDa (Jee et al. 2018) y en los resultados de la **figura 16**, de manera indirecta se puede determinar que nuestra proteína es detectada a ~15 kDa. No se encontraron diferencias en la expresión de la proteína Acr ya sea por el plásmido pUC57-Acr-Co1 o por el plásmido pMAC-Acr.

También se puede observar que la banda correspondiente a los ~60 kDa es notoriamente más ancha y marcada que la banda presente a los ~75 kDa, la cual es tenue y angosta. Por lo tanto, se infiere la presencia de una mayor cantidad de proteína pIII en relación con proteína Acr-pIII.

Como antecedente y tal como se describe en la literatura, las proteínas virales pIII y pVI forman un complejo el cual requiere condiciones desnaturantes mucho más agresivas para poderlas separar. El complejo se forma por la proximidad que existe entre las proteínas, ambas ubicadas en el mismo extremo. Como consecuencia, la proteína pIII

de 44,7 kDa y la proteína pVI de 12,4 kDa (Ledsgaard et al. 2018) tienen una masa conjunta de 57,1 kDa, las cuales son determinadas con una masa aproximada de ~60 kDa (Gailus and Rasched 1994). Por lo tanto, las masas determinadas experimentalmente en este trabajo fueron consistentes con las masas esperadas.

3. Variación de los medios de cultivo fago-bacteriano.

En relación con el estudio de la variación de los medios de cultivo se puede apreciar en la **figura 17** que la producción de bacterias en medio 2xYT fue similar que la producción en medio *NZ amine*[®]. Sin embargo, como se puede ver en las **figuras 18 y 19**, la cantidad de proteína Acr producida y los títulos de bacteriófagos generados en el medio 2xYT fueron menores que los producidos en el medio *NZ amine*[®].

La detección de bacteriófagos recombinantes por el ELISA sándwich es representada en la **figura 20**, demostrando que los bacteriófagos producidos son capturados por los anticuerpos anti-Acr anclados a los pocillos de la placa y, por lo tanto, los bacteriófagos expresan la proteína Acr en su superficie. Considerando que la DO₄₅₀ obtenida corresponde a la cantidad de fotones absorbidos detectados en la reacción entre H₂SO₄ y el producto de la enzima HRP sobre H₂O₂ en presencia de TMB (Zhang et al. 2020); y que la enzima HRP está conjugada al anticuerpo secundario presente en el volumen de la muestra, entonces la absorbancia medida es proporcional a la concentración de bacteriófagos presentes (Narayanawamy et al. 2019). Se observó una relación promedio $\frac{NZ\ amine}{2xTY} = 0,9$ con un máximo de 2,2 veces la DO₄₅₀ de fagos producidos en biorreactor, y $\frac{NZ\ amine}{2xTY} = 0,2$ con un máximo de 0,9 veces en los fagos producidos en matraz. En otras palabras, el cultivo en medio *NZ amine*[®] incrementó la producción de fagos en promedio un 90% en biorreactor y un 20% en matraz, deduciéndose que los bacteriófagos que expresan la proteína Acr se producen en mayor proporción en el medio *NZ amine*[®] que en el medio 2xYT.

La explicación al fenómeno debe tener base en la composición del medio, ya que el biorreactor permite mantener todos los otros factores estables. El medio *NZ amine*[®] es un medio que carece de extracto de levadura en comparación con el medio 2xYT, por lo que podría considerarse un medio menos enriquecido. Se ha reportado que la infección de los fagos del grupo Ff ocurre de manera más eficiente cuando se ocupan bacterias en un estado de supresión de nutrientes (Grieco et al. 2009). Además, el medio *NZ amine*[®] contiene MgSO₄, una sal que ha demostrado mejorar el proceso de acoplamiento viral a la bacteria huésped en otros fagos (Dewanggana et al. 2022). En consecuencia, la influencia de ambos factores sustentaría los resultados obtenidos.

4. Producción y purificación de la proteína Acr.

La proteína Acr se modificó para expresar una cola de histidina, la cual tiene afinidad por cationes metálicos divalentes, tales como el Fe⁺², Co⁺², Ni⁺², Cu⁺² y Zn⁺² (Andjelković et al. 2017). Considerando lo anterior, es que la proteína Acr logró ser purificada mediante la técnica IMAC, utilizando el catión Ni⁺².

Basados en el principio de la técnica, la cola de histidina de la proteína Acr se adhirió correctamente a la fase estacionaria a través de los iones de níquel inmovilizados en la columna. Para la elución de la proteína fue necesario agregar imidazol, un agente competitivo con la cola de histidina por los iones de níquel, ya que la histidina posee un grupo funcional imidazol (Kirk 2014). Considerando que los grupos aromáticos triptófano y tirosina son detectados a 280 nm (Schmid 2001), los picos de absorbancia reflejan el paso de las proteínas por el detector, permitiendo la recolección de las FE en los momentos adecuados.

Para evitar la agregación y precipitación de las proteínas purificadas producto de la alta concentración de imidazol utilizada en la elución (Novák and Havlíček 2016) o por la presencia de trazas de Ni⁺² que puedan coeluir con la proteína y agregarse a través de las colas de histidina de la proteína Acr, los tubos de elución fueron preparados con EDTA. EDTA es un agente quelante capaz de unir los iones de níquel presentes en la elución

(Grant et al. 1970). Además, se realizó un paso extra para eliminar el exceso de imidazol en la elución de la proteína Acr inmediatamente después de que ésta fue purificada. Esto se logró mediante una cromatografía de exclusión molecular (Mayolo-DeLoisa et al. 2012).

5. Evaluación de la respuesta inmune humoral.

En los gráficos de la **figura 23**, se midió la presencia de anticuerpos IgG en suero y de IgA en LBA y saliva con resultados variados. Los valores de DO₄₅₀ relacionados a la detección de IgG en suero indican la presencia de este anticuerpo en la sangre de manera significativamente mayor en los grupos de ratones inoculados con el ϕ -Acr-Co1 y con el ϕ -Acr en relación con los otros grupos sin importar la vía de inoculación, demostrando que el candidato vacunal puede generar anticuerpos específicos contra el antígeno Acr con títulos significativamente mayores. En la literatura no existen trabajos que utilicen bacteriófagos filamentosos para presentar la proteína Acr en su superficie, pero si existen trabajos que miden la respuesta inmune humoral en ratones al utilizar el bacteriófago M13 para presentar un antígeno en la proteína pIII, demostrándose un aumento significativo en la cantidad de anticuerpos IgG desarrollados por los ratones (González-Mora et al. 2021; Hashiguchi et al. 2010; Tanaka et al. 2011); o que utilizan la proteína Acr sola y/o con adyuvante en otro sistema de expresión, obteniendo incrementos significativos de anticuerpos IgG en suero de ratones (Lew et al. 2020; Moreno-Mendieta et al. 2014). Por lo tanto, la acción conjunta del bacteriófago M13 y la proteína Acr potenciarían la generación de anticuerpos IgG, correspondiéndose a los resultados encontrados en este trabajo.

En relación con una respuesta inmune mucosal, la generación de anticuerpos IgA específicos detectados en la saliva o en LBA posterior a la inoculación de algún antígeno comparten la misma tendencia (Cao et al. 2011), pero no muestran un comportamiento diferente. En este trabajo, los anticuerpos IgA específicos contra la proteína Acr detectados en saliva son significativamente superiores al resto de los grupos, pero los detectados desde LBA en general no siguen la misma tendencia (a excepción del ϕ -Acr-

Co1 inoculado por vía oral). Considerando que los resultados obtenidos desde LBA tampoco se condicen con los obtenidos por suero es que se baraja la posibilidad de errores en el procedimiento del LBA.

La comparación entre los ϕ -Acr-Co1 y el ϕ -Acr permiten discriminar si el péptido Co1 tiene un efecto significativo en la generación de anticuerpos. En la detección de anticuerpos específicos de IgG contra la proteína Acr se demostró que, independientemente de la vía de administración, la respuesta generada por el ϕ -Acr-Co1 fue significativamente mayor que la generada por el ϕ -Acr. Esto se traduce en un efecto directo del péptido Co1 en la magnitud de la respuesta humoral detectada, diferencia que también se ha observado en trabajos similares donde se utilizó el péptido Co1 como un adyuvante unido covalentemente al antígeno (Wang et al. 2018; Kim et al. 2013).

La diferencia entre anticuerpos IgA generados entre el ϕ -Acr-Co1 y el ϕ -Acr fue significativamente mayor al ser inoculados por la vía oral, pero por la vía subcutánea no demostró diferencias significativas, por lo tanto, el efecto del péptido Co1 demostró tener un menor impacto en la producción de anticuerpos IgA específicos contra la proteína Acr al compararse con la generación de anticuerpos IgG. Este resultado es parcialmente similar al de Zhang y colaboradores, donde compararon el efecto del péptido Co1 en una construcción multiepítipo con y sin el péptido por inoculación oral, obteniendo diferencias significativas en la detección de IgA con la formulación del péptido Co1. Pero los investigadores no probaron con inoculación subcutánea (Zhang et al. 2021).

La explicación podría estar atribuida al recorrido que realizan los bacteriófagos antes de ser captados por las CPA. Al inocular por la vía oral, los bacteriófagos tienen acceso directo al tejido mucosal (Lavelle and Ward 2022), donde el péptido Co1 podría tener un mayor impacto al encontrarse con las células M del intestino. Por el contrario, en la inoculación por la vía subcutánea los bacteriófagos deben hacer un recorrido más amplio para llegar al tejido mucosal y es probable que, de acuerdo con los resultados, una parte de los bacteriófagos hayan sido captados por CD residentes (Levin et al. 2017) u

otras poblaciones dinámicas de CPA derivadas de la piel (Jarvi and Balu-Iyer 2021) antes de llegar a su destino. Sin embargo, los bacteriófagos filamentosos tienen la capacidad innata de realizar transcitosis a través de barreras y tejidos (Putra and Lyrawati 2020; Carroll-Portillo and Lin 2019) y este comportamiento es capaz de explicar la generación de una respuesta inmune mucosal por la vía subcutánea, donde el efecto del péptido Co1 no fue relevante, pero el efecto del bacteriófago si lo fue, obteniendo la generación de anticuerpos IgA específicos contra la proteína Acr.

En general, en la literatura se encontró que los trabajos donde se utilizó el péptido Co1 generaban anticuerpos IgA e IgG al inocular por la vía oral (Zhang et al. 2021; Wang et al. 2018). El péptido Co1 tiene un efecto adyuvante (Kim et al. 2010) que se potencia con el efecto adyuvante de los bacteriófagos (Sartorius et al. 2015), de manera que las respuestas humorales mejoradas provocadas por el ϕ -Acr-Co1 en relación al ϕ -Acr son justificadas. Los anticuerpos IgA proveen la defensa humoral predominante en el tejido mucosal, pero IgG también contribuye a la defensa inmune del huésped (Holmgren and Czerkinsky 2005), suplementando la defensa mucosal contra la expansión de los patógenos a la circulación sistémica al atravesar las membranas mucosales (Wells and Mercenier 2008).

La estructura innata del bacteriófago M13 le confiere capacidades adyuvantes importantes para el desarrollo de una respuesta inmune (Sartorius et al. 2015), pero también es relevante considerar que los lipopolisacáridos (LPS) residuales del proceso de purificación podrían tener un efecto en el desarrollo de la respuesta inmune (Clark et al. 2011). De todos los gráficos de la **figura 23**, sólo en la medición de IgA desde LBA por inoculación subcutánea se observó una diferencia significativa del grupo control prevacunación con el resto de los grupos. Esta diferencia propone la posibilidad de un efecto ligado al bacteriófago y no al antígeno. Se ha reportado que los LPS asociados a las partículas virales pueden participar en la inmunogenicidad de los bacteriófagos a través del reconocimiento de PAMP (Dor-On and Solomon 2015), por lo tanto, LPS residuales podrían haber contribuido a la respuesta inmune encontrada aquí.

Analizando los gráficos comparativos entre vías de inoculación, se pueden observar dos comportamientos: uno donde la vía de inoculación oral es más efectiva y otro donde la inoculación subcutánea es más efectiva. Considerando la posibilidad de errores en el procedimiento de obtención de muestra en el LBA, la decisión recae en los resultados obtenidos a partir de las muestras de suero y saliva, la cual sugiere que la inoculación subcutánea es significativamente mejor que la inoculación oral, incluso cuando se realizaron reiteradas inmunizaciones por esta vía al compararse con las dos inmunizaciones hechas por la vía subcutánea. El efecto del uso de bacteriófagos debería ser el principal influyente en la generación de una respuesta inmune mucosal, la cual permite el tránsito por los tejidos hasta migrar a los centros inductores mucosales (Carroll-Portillo and Lin 2019), ya que se esperaría que las inoculaciones orales tuvieran un mejor desempeño (Lavelle and Ward 2022).

En general, las vacunas de subunidades implementadas a través de la vía oral requieren de cantidades mayores de antígenos para compensar la degradación en el tracto gastrointestinal, la coadministración de adyuvantes y/o un sistema de entrega de antígenos que facilite su captación por parte de las CPA (Zhu et al. 2021). Por otro lado, las vacunas inoculadas de manera subcutánea están dirigidas a una respuesta inmune sistémica, donde la obtención de una respuesta inmune mucosal es menos frecuente y depende mucho del antígeno escogido, el sistema de expresión y del adyuvante (Su et al. 2016). Es importante resaltar que una inoculación subcutánea tiende a no generar una respuesta mucosal (Rioux et al. 2014; Firouzi et al. 2022). Aun así, existen variados reportes que demuestran la generación de una respuesta mucosal a partir de inoculaciones subcutáneas (Hammerschmidt et al. 2011; Yang et al. 2012) siendo este trabajo uno de ellos.

CONCLUSIONES

1. La detección de la proteína Acr en la superficie de los ϕ -Acr-Co1 y ϕ -Acr y las masas estimadas de las proteínas Acr y pIII en comparación de las masas reportadas en la literatura, permiten concluir que la proteína Acr es expresada correctamente en la superficie del bacteriófago filamentosos M13 como una proteína fusionada a pIII.
2. El medio de cultivo *NZ amine*[®] produce una mayor cantidad de bacteriófagos en comparación al medio de cultivo 2xYT. El medio *NZ amine*[®] es un medio menos enriquecido que el medio 2xYT al carecer de extracto de levadura. En compensación, el medio es suplementado con MgSO₄. Por lo tanto, se concluye que el reemplazo de extracto de levadura por MgSO₄ propicia un aumento en el título de bacteriófagos producidos por las bacterias *E. coli* TG1.
3. La proteína Acr logró ser correctamente sintetizada por medio de bacterias *E. coli* BL21 con el plásmido pET-Acr, con una pureza del 76%. Esta pureza demostró evitar interacciones no deseadas entre proteínas contaminantes, ya que los controles negativos en los ELISA indirectos se comportaron de acuerdo con lo esperado.
4. Las formulaciones bacteriófagas ϕ -Acr-Co1 y ϕ -Acr estimularon significativamente la producción de anticuerpos IgG e IgA en ratones, concluyendo que ambos candidatos vacunales pueden inducir una respuesta inmune humoral.
5. Se concluye que el péptido Co1 tiene un efecto potenciador que incrementa significativamente la magnitud de la respuesta IgG generada independientemente de la vía de inoculación, e incrementa los anticuerpos IgA generados a través de la inoculación oral. Pero el péptido Co1 no tendría un efecto sobre los anticuerpos IgA generados por la inoculación subcutánea.

6. La obtención de anticuerpos IgA a partir de la inoculación subcutánea tendría base en la capacidad innata de realizar transcitosis de los bacteriófagos filamentosos y ser captados en los centros inductores mucosales, concluyendo que el bacteriófago M13 tendría un efecto adyuvante, induciendo una respuesta inmune mucosal contra el antígeno Acr. Además, basados en la misma propiedad de los bacteriófagos filamentosos y en que la inoculación subcutánea obtuvo niveles significativamente mayores de anticuerpos que la inoculación oral, se concluye que la inoculación subcutánea es mejor que la inoculación oral.
7. Finalmente, se concluye que la proteína Acr, expresada en la superficie del fago M13 en conjunto con el efecto adyuvante del péptido Co1 y de las propiedades para realizar transcitosis del mismo bacteriófago generan una respuesta inmune mucosal contra la proteína Acr de Mtb, aceptando la hipótesis investigativa.

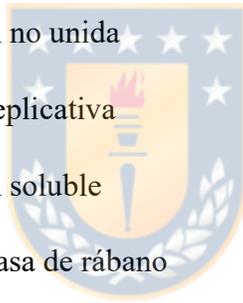


GLOSARIO

Abreviaciones y acrónimos

α	nivel de significancia
Acr	proteína <i>16-kDa alpha-crystallin</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
BCA	ácido bicinconínico
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
B _{CG}	B de centro germinal
BCG-PSN	Polisacáridos de ácidos nucleicos del bacilo de Calmette-Guérin
BCR	receptor de célula B
CAP	proteína activadora por catabolitos
CD	célula dendrítica
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	célula presentadora de antígenos
DAMP	patrones moleculares asociados a daños
DDA	dimetil-dioctadecil amonio
dNTP	desoxinucleósidos trifosfato
DO	densidad óptica

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
F ⁺	factor de fertilidad positivo
Fab	fragmento de unión a antígeno
Fc	fragmento cristalizante
FDA	Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos
FE	fracción de elución
FNU	fracción no unida
FR	forma replicativa
FS	fracción soluble
HRP	peroxidasa de rábano
HspX	<i>heat shock protein X</i>
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
Ig	inmunoglobulina
IL	interleuquina
IMAC	cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados
INF- γ	interferón gama
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	caldo de lisogenia
LBA	lavado broncoalveolar



LPS	lipopolisacárido
MPA	adyuvante de monofosforil lípido A
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MVA	virus vacuna modificado de Ankara
NK	asesina natural
OMS	Organización Mundial de la Salud
ϕ -Acr	bacteriófago M13KO7 16-kDa <i>alpha-crystallin</i>
ϕ -Acr-Co1	bacteriófago M13KO7 16-kDa <i>alpha-crystallin Co1</i>
<i>p</i>	probabilidad
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PelB	pectato liasa B
ϕ -pMAC	bacteriófago M13KO7 <i>pMAC</i>
PPM	patrón de peso molecular
ϕ -M13KO7	bacteriófago auxiliar M13KO7
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
PSA	persulfato de amonio
PVDF	fluoruro de polivinilideno

SARS-CoV-2	coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TAE	tris acetato EDTA
Taq-pol	ácido desoxirribonucleico polimerasa Taq
TB	tuberculosis
TB-MDR	tuberculosis resistente a múltiples drogas
TBS	tampón tris salino
TCR	receptor de célula T
TDM	dimicolato de trehalosa
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilediamina
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta
T _H	T cooperador
TLR	receptor tipo Toll
T _m	temperatura de conjugación de los partidores
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
ufc	unidad formadora de colonias
UV	ultravioleta

Abreviaciones y acrónimos de recurrencia

ADN(mc, bc)	ácido desoxirribonucleico (monocatenario, bicatenario)
CMH-(I, II)	complejo mayor de histocompatibilidad de clase (I, II)
DO _(450, 562, 600)	densidad óptica a (450 nm, 562nm, 600 nm)
Ig(M, A, G, E, D)	inmunoglobulina (M, A, G, E, D)
T _H (F, 1, 2, 17, 9, 22)	T cooperador (folicular, 1, 2, 17, 9, 22)



BIBLIOGRAFIA

- Abubakar, I., L. Pimpin, C. Ariti, R. Beynon, P. Mangtani, J. A. Sterne, P. E. Fine, P. G. Smith, M. Lipman, D. Elliman, J. M. Watson, L. N. Drumright, P. F. Whiting, E. Vynnycky, and L. C. Rodrigues. 2013. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guerin vaccination against tuberculosis. *Health Technol Assess* 17 (37):1-372, v-vi.
- Aghebati-Maleki, L., B. Bakhshinejad, B. Baradaran, M. Motallebnezhad, A. Aghebati-Maleki, H. Nickho, M. Yousefi, and J. Majidi. 2016. Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci* 23 (1):66.
- Aguirre-Garcia, M., A. Escalona-Montaña, A. Wilkins-Rodríguez, and L. Gutiérrez-Kobeh. 2018. Immune Evasion Strategies.
- Akkaya, M., K. Kwak, and S. K. Pierce. 2020. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol* 20 (4):229-238.
- Allen, M., C. Bailey, I. Cahatol, L. Dodge, J. Yim, C. Kassissa, J. Luong, S. Kasko, S. Pandya, and V. Venketaraman. 2015. Mechanisms of Control of Mycobacterium tuberculosis by NK Cells: Role of Glutathione. *Front Immunol* 6:508.
- Amberson, J. B. 1938. The Significance of Latent Forms of Tuberculosis. *New England Journal of Medicine* 219 (15):572-576.
- Andjelković, U., J. Giacometti, and D. Josić. 2017. Chapter 5 - Protein and peptide separations. In *Liquid Chromatography (Second Edition)*, edited by S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole and M.-L. Riekkola: Elsevier, 107-157.
- Annunziato, F., and S. Romagnani. 2009. Heterogeneity of human effector CD4+T cells. *Arthritis Research & Therapy* 11 (6):257.
- Bachmann, M. F., and G. T. Jennings. 2010. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* 10 (11):787-796.
- Balcells, M. E., and Y. Alarcón. 2017. Enfermedades infecciosas y migración. Una responsabilidad compartida. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas* 42 (2):4-6.
- Barr, J. J. 2017. A bacteriophages journey through the human body. *Immunological Reviews* 279 (1):106-122.
- Belton, M., S. Brilha, R. Manavaki, F. Mauri, K. Nijran, Y. T. Hong, N. H. Patel, M. Dembek, L. Tezera, J. Green, R. Moores, F. Aigbirhio, A. Al-Nahhas, T. D. Fryer, P. T. Elkington, and J. S. Friedland. 2016. Hypoxia and tissue destruction in pulmonary TB. *Thorax* 71 (12):1145-1153.
- Blander, J. M. 2018. Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation. *Annual Review of Immunology* 36:717-753.
- Borkotoky, S., and A. Murali. 2018. The highly efficient T7 RNA polymerase: A wonder macromolecule in biological realm. *Int J Biol Macromol* 118 (Pt A):49-56.
- Bottai, D., and R. Brosch. 2016. The BCG Strain Pool: Diversity Matters. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 24 (2):201-203.
- Brandtzaeg, P. 2013. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front Immunol* 4:222.
- Brewer, T. F. 2000. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis* 31 Suppl 3:S64-67.
- Brown, G. D., J. A. Willment, and L. Whitehead. 2018. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 18 (6):374-389.
- Busby, S., and R. H. Ebright. 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* 293 (2):199-213.
- Bussi, C., and M. G. Gutierrez. 2019. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. *FEMS Microbiol Rev* 43 (4):341-361.

- Cambier, C. J., K. K. Takaki, R. P. Larson, R. E. Hernandez, D. M. Tobin, K. B. Urdahl, C. L. Cosma, and L. Ramakrishnan. 2014. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* 505 (7482):218-222.
- Canales, A. I. 2019. La inmigración contemporánea en Chile. Entre la diferenciación étnico-nacional y la desigualdad de clases. *Papeles de población* 25:53-85.
- Cao, D., H. Li, Z. Jiang, Q. Cheng, Z. Yang, C. Xu, G. Cao, and L. Zhang. 2011. CpG oligodeoxynucleotide synergizes innate defense regulator peptide for enhancing the systemic and mucosal immune responses to pseudorabies attenuated virus vaccine in piglets in vivo. *Int Immunopharmacol* 11 (6):748-754.
- Cao, W., L. He, W. Cao, X. Huang, K. Jia, and J. Dai. 2020. Recent progress of graphene oxide as a potential vaccine carrier and adjuvant. *Acta Biomater* 112:14-28.
- Capucetti, A., F. Albano, and R. Bonecchi. 2020. Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology. *Front Immunol* 11:1259.
- Carroll-Portillo, A., and H. C. Lin. 2019. Bacteriophage and the Innate Immune System: Access and Signaling. *Microorganisms* 7 (12):625.
- Cavalcanti, Y. V., M. C. Brelaz, J. K. Neves, J. C. Ferraz, and V. R. Pereira. 2012. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. *Pulm Med* 2012:745483.
- Claesson-Welsh, L. 2015. Vascular permeability—the essentials. *Upsala Journal of Medical Sciences* 120 (3).
- Clark, J. R., K. Bartley, C. D. Jepson, V. Craik, and J. B. March. 2011. Comparison of a bacteriophage-delivered DNA vaccine and a commercially available recombinant protein vaccine against hepatitis B. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 61 (2):197-204.
- Clokic, M. R., A. D. Millard, A. V. Letarov, and S. Heaphy. 2011. Phages in nature. *Bacteriophage* 1 (1):31-45.
- Comstock, G. W., V. T. Livesay, and S. F. Woolpert. 1974. Evaluation of BCG vaccination among Puerto Rican children. *American journal of public health* 64 (3):283-291.
- Comstock, G. W., S. F. Woolpert, and V. T. Livesay. 1976. Tuberculosis studies in Muscogee County, Georgia. Twenty-year evaluation of a community trial of BCG vaccination. *Public health reports (Washington, D.C. : 1974)* 91 (3):276-280.
- Costa, L. E., M. A. Chavez-Fumagalli, V. T. Martins, M. C. Duarte, D. P. Lage, M. I. Lima, N. C. Pereira, M. Soto, C. A. Tavares, L. R. Goulart, and E. A. Coelho. 2015. Phage-fused epitopes from *Leishmania infantum* used as immunogenic vaccines confer partial protection against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology* 142 (10):1335-1347.
- Cronan, M. R., R. W. Beerman, A. F. Rosenberg, J. W. Saelens, M. G. Johnson, S. H. Oehlers, D. M. Sisk, K. L. Jurcic Smith, N. A. Medvitz, S. E. Miller, L. A. Trinh, S. E. Fraser, J. F. Madden, J. Turner, J. E. Stout, S. Lee, and D. M. Tobin. 2016. Macrophage Epithelial Reprogramming Underlies Mycobacterial Granuloma Formation and Promotes Infection. *Immunity* 45 (4):861-876.
- Crotty, S. 2019. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 50 (5):1132-1148.
- Cunningham, A. F., and C. L. Spreadbury. 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 180 (4):801-808.
- Chai, Q., Z. Lu, and C. H. Liu. 2020. Host defense mechanisms against *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Mol Life Sci* 77 (10):1859-1878.
- Chen, L., M. Xu, W.-X. Du, B.-W. Chen, Z.-Y. Wang, Y.-J. Wang, N. Dong, C. Su, X.-B. Shen, and G.-Z. Wang. 2009. [Preparation of two antigens--Ag85b and HspX of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the effects of their co-administration with adjuvants in mice]. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae* 31 (4):403-409.
- Chi, X., Y. Li, and X. Qiu. 2020. V(D)J Recombination, Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination of Immunoglobulins: Mechanism and Regulation. *Immunology*.

- Chibani, C. M., A. Farr, S. Klama, S. Dietrich, and H. Liesegang. 2019. Classifying the Unclassified: A Phage Classification Method. *Viruses* 11 (2):195.
- Dabrowska, K., K. Switała-Jelen, A. Opolski, B. Weber-Dabrowska, and A. Gorski. 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology* 98 (1):7-13.
- Dalmia, N., W. B. Klimstra, C. Mason, and A. J. Ramsay. 2015. DNA-Launched Alphavirus Replicons Encoding a Fusion of Mycobacterial Antigens Acr and Ag85B Are Immunogenic and Protective in a Murine Model of TB Infection. *PLoS One* 10 (8):e0136635.
- Davies, E. V., C. Winstanley, J. L. Fothergill, and C. E. James. 2016. The role of temperate bacteriophages in bacterial infection. *FEMS Microbiology Letters* 363 (5):fnw015.
- de Martino, M., L. Lodi, L. Galli, and E. Chiappini. 2019. Immune Response to Mycobacterium tuberculosis: A Narrative Review. *Frontiers in Pediatrics* 7 (350).
- de Sousa-Pereira, P., and J. M. Woof. 2019. IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies (Basel)* 8 (4).
- Delogu, G., M. Sali, and G. Fadda. 2013. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 5 (1):e2013070.
- Demissie, A., E. M. Leyten, M. Abebe, L. Wassie, A. Aseffa, G. Abate, H. Fletcher, P. Owiafe, P. C. Hill, R. Brookes, G. Rook, A. Zumla, S. M. Arend, M. Klein, T. H. Ottenhoff, P. Andersen, and T. M. Doherty. 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 13 (2):179-186.
- Deng, W., Q. Long, J. Zeng, P. Li, W. Yang, X. Chen, and J. Xie. 2017. Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS41 Enhances the Intracellular Survival of M. smegmatis within Macrophages Via Blocking Innate Immunity and Inhibition of Host Defense. *Sci Rep* 7 (1):46716.
- DePorter, S. M., and B. R. McNaughton. 2014. Engineered M13 bacteriophage nanocarriers for intracellular delivery of exogenous proteins to human prostate cancer cells. *Bioconjug Chem* 25 (9):1620-1625.
- DesJardin, L. E., L. G. Hayes, C. D. Sohaskey, L. G. Wayne, and K. D. Eisenach. 2001. Microaerophilic Induction of the Alpha-Crystallin Chaperone Protein Homologue (hspX) mRNA of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology* 183 (18):5311-5316.
- Dewanggana, M. N., C. Evangeline, M. D. Ketty, D. E. Waturangi, Yogiara, and S. Magdalena. 2022. Isolation, characterization, molecular analysis and application of bacteriophage DW-EC to control Enterotoxigenic Escherichia coli on various foods. *Sci Rep* 12 (1):495.
- Dlugonska, H., and M. Grzybowski. 2012. Mucosal vaccination--an old but still vital strategy. *Annals of parasitology* 58:1-8.
- Dor-On, E., and B. Solomon. 2015. Targeting glioblastoma via intranasal administration of Ff bacteriophages. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Douam, F., J. M. Gaska, B. Y. Winer, Q. Ding, M. von Schaeuwen, and A. Ploss. 2015. Genetic Dissection of the Host Tropism of Human-Tropic Pathogens. *Annual review of genetics* 49:21-45.
- Drezen, J. M., T. Josse, A. Bezier, J. Gauthier, E. Huguet, and E. A. Herniou. 2017. Impact of Lateral Transfers on the Genomes of Lepidoptera. *Genes (Basel)* 8 (11).
- Du, F., Y. Q. Liu, Y. S. Xu, Z. J. Li, Y. Z. Wang, Z. X. Zhang, and X. M. Sun. 2021. Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microb Cell Fact* 20 (1):189.
- Fajardo-Gutiérrez, A. 2017. Medición en epidemiología: prevalencia, incidencia, riesgo, medidas de impacto %J Revista alergía México. 64:109-120.
- Falero-Diaz, G., S. Challacombe, D. Rahman, M. Mistry, G. Douce, G. Dougan, A. Acosta, and J. Ivanyi. 2000. Transmission of IgA and IgG Monoclonal Antibodies to Mucosal Fluids following Intranasal or Parenteral Delivery. *Int Arch Allergy Immunol* 122 (2):143-150.
- Fatima, S., A. Kumari, G. Das, and V. P. Dwivedi. 2020. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sci* 252:117594.
- Fehres, C. M., W. W. Unger, J. J. Garcia-Vallejo, and Y. van Kooyk. 2014. Understanding the biology of antigen cross-presentation for the design of vaccines against cancer. *Front Immunol* 5:149.

- Firouzi, Z., M. R. Jaafari, M. Sankian, S. Zare, and M. Tafaghodi. 2022. A novel nanomicelle composed from PEGylated TB di-peptide could be successfully used as a BCG booster. *Iran J Basic Med Sci* 25 (2):223-231.
- Fitzgerald, K. A., and J. C. Kagan. 2020. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* 180 (6):1044-1066.
- Frenkel, D., and B. Solomon. 2002. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (8):5675.
- Furfaro, L. L., M. S. Payne, and B. J. Chang. 2018. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8:376-376.
- Gailus, V., and I. Rasched. 1994. The adsorption protein of bacteriophage fd and its neighbour minor coat protein build a structural entity. *Eur J Biochem* 222 (3):927-931.
- García-Gómez, E., and B. González-Pedrajo. 2011. Transglucosilasas líticas asociadas a los sistemas de secreción en bacterias gram negativas. *Rev Educ Bioquímica* 30 (2):45-55.
- Gaubin, M., C. Fanutti, Z. Mishal, A. Durrbach, P. De Berardinis, R. Sartorius, G. Del Pozzo, J. Guardiola, R. N. Perham, and D. Piatier-Tonneau. 2003. Processing of filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments. *DNA Cell Biol* 22 (1):11-18.
- Gefen, T., J. Vaya, S. Khatib, I. Rapoport, M. Lupo, E. Barnea, A. Admon, E. D. Heller, E. Aizenshtein, and J. Pitcovski. 2015. The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity. *Immunology* 144 (1):116-126.
- Ghosh, D., A. G. Kohli, F. Moser, D. Endy, and A. M. Belcher. 2012. Refactored M13 Bacteriophage as a Platform for Tumor Cell Imaging and Drug Delivery. *ACS Synthetic Biology* 1 (12):576-582.
- Golding, I. 2016. Single-Cell Studies of Phage λ : Hidden Treasures Under Occam's Rug. *Annu Rev Virol* 3 (1):453-472.
- Gonzalez-Galarza, Faviel F., A. McCabe, Eduardo J M. d. Santos, J. Jones, L. Takeshita, Nestor D. Ortega-Rivera, Glenda M. D. Cid-Pavon, K. Ramsbottom, G. Ghattaoraya, A. Alfirevic, D. Middleton, and Andrew R. Jones. 2019. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Res* 48 (D1):D783-D788.
- González-Mora, A., K. M. Calvillo-Rodríguez, J. Hernández-Pérez, M. Rito-Palomares, A. C. Martínez-Torres, and J. Benavides. 2021. Evaluation of the Immune Response of a Candidate Phage-Based Vaccine against *Rhipicephalus microplus* (Cattle Tick). *Pharmaceutics* 13 (12).
- Gonzalo-Asensio, J., D. Marinova, C. Martin, and N. Aguilo. 2017. MTBVAC: Attenuating the Human Pathogen of Tuberculosis (TB) Toward a Promising Vaccine against the TB Epidemic. *Front Immunol* 8:1803.
- Gopal, R., L. Monin, S. Slight, U. Uche, E. Blanchard, B. A. Fallert Junecko, R. Ramos-Payan, C. L. Stallings, T. A. Reinhart, J. K. Kolls, D. Kaushal, U. Nagarajan, J. Rangel-Moreno, and S. A. Khader. 2014. Unexpected role for IL-17 in protective immunity against hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* HN878 infection. *PLoS pathogens* 10 (5):e1004099-e1004099.
- Goswami, R., G. Subramanian, L. Silayeva, I. Newkirk, D. Doctor, K. Chawla, S. Chattopadhyay, D. Chandra, N. Chilukuri, and V. Betapudi. 2019. Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Frontiers in oncology* 9:297-297.
- Govarts, C., K. Somers, P. Stinissen, and V. Somers. 2010. Frameshifting in the p6 cDNA phage display system. *Molecules* 15 (12):9380-9390.
- Grant, M. W., H. W. Dodgen, and J. P. Hunt. 1970. The structure of nickel(II)-ethylenediaminetetra-acetic acid complexes in aqueous solution determined by ^{17}O nuclear magnetic resonance. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications* (21):1446-1447.
- Grieco, S.-H. H., S. Lee, W. S. Dunbar, R. T. A. MacGillivray, and S. B. Curtis. 2009. Maximizing filamentous phage yield during computer-controlled fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32 (6):773-779.

- Guerrini, V., B. Prideaux, L. Blanc, N. Bruiners, R. Arrigucci, S. Singh, H. P. Ho-Liang, H. Salamon, P. Y. Chen, K. Lakehal, S. Subbian, P. O'Brien, L. E. Via, C. E. Barry, 3rd, V. Dartois, and M. L. Gennaro. 2018. Storage lipid studies in tuberculosis reveal that foam cell biogenesis is disease-specific. *PLoS pathogens* 14 (8):27.
- Gupta, R. K., and R. Srivastava. 2012. Resuscitation promoting factors: a family of microbial proteins in survival and resuscitation of dormant mycobacteria. *Indian journal of microbiology* 52 (2):114-121.
- Hammerschmidt, S. I., M. Friedrichsen, J. Boelter, M. Lyszkiewicz, E. Kremmer, O. Pabst, and R. Förster. 2011. Retinoic acid induces homing of protective T and B cells to the gut after subcutaneous immunization in mice. *J Clin Invest* 121 (8):3051-3061.
- Hart, P. D., and I. Sutherland. 1977. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *British medical journal* 2 (6082):293-295.
- Hashiguchi, S., Y. Yamaguchi, O. Takeuchi, S. Akira, and K. Sugimura. 2010. Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 402 (1):19-22.
- Henry, K. A., M. Arbabi-Ghahroudi, and J. K. Scott. 2015. Beyond phage display: non-traditional applications of the filamentous bacteriophage as a vaccine carrier, therapeutic biologic, and bioconjugation scaffold. *Front Microbiol* 6:755.
- Henry, M., and L. Debarbieux. 2012. Tools from viruses: bacteriophage successes and beyond. *Virology* 434 (2):151-161.
- Herbert, D. R., B. Douglas, and K. Zullo. 2019. Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2): Type 2 Immunity and Helminth Immunity. *International journal of molecular sciences* 20 (9).
- Hilda, J. N., S. Das, S. P. Tripathy, and L. E. Hanna. 2019. Role of neutrophils in tuberculosis: A bird's eye view. *Innate Immunity* 26 (4):240-247.
- Hobbs, Z., and S. T. Abedon. 2016. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'. *FEMS Microbiol Lett* 363 (7).
- Hodyra-Stefaniak, K., P. Miernikiewicz, J. Drapała, M. Drab, E. Jończyk-Matysiak, D. Lecion, Z. Kaźmierczak, W. Beta, J. Majewska, M. Harhala, B. Bubak, A. Kłopot, A. Górski, and K. Dąbrowska. 2015. Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo. *Sci Rep* 5:14802.
- Holdsworth, S. R., and P.-Y. Gan. 2015. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 10 (12):2243-2254.
- Holmgren, J., and C. Czerkinsky. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11 (4 Suppl):S45-53.
- Hossain, K. M., and A. K. Wall. 2019. Use of Dendritic Cell Receptors as Targets for Enhancing Anti-Cancer Immune Responses. *Cancers* 11 (3).
- Houben, D., C. Demangel, J. van Ingen, J. Perez, L. Baldeón, A. M. Abdallah, L. Caleechurn, D. Bottai, M. van Zon, K. de Punder, T. van der Laan, A. Kant, R. Bossers-de Vries, P. Willemsen, W. Bitter, D. van Soolingen, R. Brosch, N. van der Wel, and P. J. Peters. 2012. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol* 14 (8):1287-1298.
- Hoyer, B. F., and A. Radbruch. 2017. Protective and pathogenic memory plasma cells. *Immunology Letters* 189:10-12.
- Hu, Y., F. Movahedzadeh, N. G. Stoker, and A. R. Coates. 2006. Deletion of the Mycobacterium tuberculosis alpha-crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo. *Infect Immun* 74 (2):861-868.
- Huh, H., S. Wong, J. St. Jean, and R. Slavcev. 2019. Bacteriophage interactions with mammalian tissue: Therapeutic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 145:4-17.
- Ilinskaya, A. N., and M. A. Dobrovolskaia. 2016. Understanding the immunogenicity and antigenicity of nanomaterials: Past, present and future. *Toxicol Appl Pharmacol* 299:70-77.
- Iwakura, Y., H. Ishigame, S. Saijo, and S. Nakae. 2011. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34 (2):149-162.

- Jafari, N., and S. Abediankenari. 2015. Phage Particles as Vaccine Delivery Vehicles: Concepts, Applications and Prospects. *Asian Pac J Cancer Prev* 16 (18):8019-8029.
- Jarvi, N. L., and S. V. Balu-Iyer. 2021. Immunogenicity Challenges Associated with Subcutaneous Delivery of Therapeutic Proteins. *BioDrugs* 35 (2):125-146.
- Jee, B., Y. Singh, R. Yadav, and F. Lang. 2018. Small Heat Shock Protein16.3 of *Mycobacterium tuberculosis*: After Two Decades of Functional Characterization. *Cellular Physiology and Biochemistry* 49 (1):368-380.
- Jeon, B. Y., S. C. Kim, S. Y. Eum, and S. N. Cho. 2011. The immunity and protective effects of antigen 85A and heat-shock protein X against progressive tuberculosis. *Microbes Infect* 13 (3):284-290.
- Jung, S. H., C. M. Ryu, and J. S. Kim. 2019. Bacterial persistence: Fundamentals and clinical importance. *J Microbiol* 57 (10):829-835.
- Kaiko, G. E., J. C. Horvat, K. W. Beagley, and P. M. Hansbro. 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123 (3):326-338.
- Katellaris, A. L., C. Jackson, J. Southern, R. K. Gupta, F. Drobniewski, A. Lalvani, M. Lipman, P. Mangtani, and I. Abubakar. 2020. Effectiveness of BCG Vaccination Against Mycobacterium tuberculosis Infection in Adults: A Cross-sectional Analysis of a UK-Based Cohort. *J Infect Dis* 221 (1):146-155.
- Kaufmann, S. H. 2013. Tuberculosis vaccines: time to think about the next generation. *Semin Immunol* 25 (2):172-181.
- Kaufmann, S. H. E., C. Lange, M. Rao, K. N. Balaji, M. Lotze, M. Schito, A. I. Zumla, and M. Maeurer. 2014. Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies—a state of the art review. *The Lancet Respiratory Medicine* 2 (4):301-320.
- Kehoe, J. W., and B. K. Kay. 2005. Filamentous Phage Display in the New Millennium. *Chemical Reviews* 105 (11):4056-4072.
- Kia, A., T. Yata, N. Hajji, and A. Hajitou. 2013. Inhibition of histone deacetylation and DNA methylation improves gene expression mediated by the adeno-associated virus/phage in cancer cells. *Viruses* 5 (10):2561-2572.
- Kim, S. H., Y. N. Kim, J. Kim, and Y. S. Jang. 2018. C5a receptor targeting of partial non-structural protein 3 of dengue virus promotes antigen-specific IFN- γ -producing T-cell responses in a mucosal dengue vaccine model. *Cell Immunol* 325:41-47.
- Kim, S. H., K. W. Seo, J. Kim, K. Y. Lee, and Y. S. Jang. 2010. The M cell-targeting ligand promotes antigen delivery and induces antigen-specific immune responses in mucosal vaccination. *J Immunol* 185 (10):5787-5795.
- Kim, S. H., I. Y. Yang, S. H. Jang, J. Kim, T. T. Truong, T. Van Pham, N. U. Truong, K. Y. Lee, and Y. S. Jang. 2013. C5a receptor-targeting ligand-mediated delivery of dengue virus antigen to M cells evokes antigen-specific systemic and mucosal immune responses in oral immunization. *Microbes Infect* 15 (13):895-902.
- Kim, Y. K., J. S. Shin, and M. H. Nahm. 2016. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J* 57 (1):5-14.
- Kirk, W. R. 2014. Thermodynamics of imidazole-ligand binding to Ni-nitrilotriacetate in solution and covalently attached to agarose beads: imidazole, his-6 (his-tag) peptide and a new bis-imidazolodithiane. *Protein Expr Purif* 95:1-7.
- Kuroda, E., C. Coban, and K. J. Ishii. 2013. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *Int Rev Immunol* 32 (2):209-220.
- Kurosaki, T., K. Kometani, and W. Ise. 2015. Memory B cells. *Nat Rev Immunol* 15 (3):149-159.
- Lavelle, E. C., and R. W. Ward. 2022. Mucosal vaccines - fortifying the frontiers. *Nat Rev Immunol* 22 (4):236-250.
- Ledsgaard, L., M. Kilstrup, A. Karatt-Vellatt, J. McCafferty, and A. H. Laustsen. 2018. Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins* 10 (6):236.

- Levin, C., O. Bonduelle, C. Nuttens, C. Primard, B. Verrier, A. Boissonnas, and B. Combadière. 2017. Critical Role for Skin-Derived Migratory DCs and Langerhans Cells in TFH and GC Responses after Intradermal Immunization. *Journal of Investigative Dermatology* 137 (9):1905-1913.
- Lew, M. H., M. N. Norazmi, and G. J. Tye. 2020. Enhancement of immune response against Mycobacterium tuberculosis HspX antigen by incorporation of combined molecular adjuvant (CASAC). *Mol Immunol* 117:54-64.
- Li, D., and M. Wu. 2021. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy* 6 (1):291-291.
- Li, Q., H. Yu, Y. Zhang, B. Wang, W. Jiang, Z. Da, Q. Xian, Y. Wang, X. Liu, and B. Zhu. 2011. Immunogenicity and protective efficacy of a fusion protein vaccine consisting of antigen Ag85B and HspX against Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Scand J Immunol* 73 (6):568-576.
- Liu, M., W. Li, X. Xiang, and J. Xie. 2015. Mycobacterium tuberculosis effectors interfering host apoptosis signaling. *Apoptosis* 20 (7):883-891.
- Løset, G., B. Bogen, and I. Sandlie. 2011. Expanding the versatility of phage display I: efficient display of peptide-tags on protein VII of the filamentous phage. *PLoS One* 6 (2):e14702.
- Lu, J. B., B. W. Chen, G. Z. Wang, L. L. Fu, X. B. Shen, C. Su, W. X. Du, L. Yang, and M. Xu. 2015. Recombinant tuberculosis vaccine AEC/BC02 induces antigen-specific cellular responses in mice and protects guinea pigs in a model of latent infection. *J Microbiol Immunol Infect* 48 (6):597-603.
- Luabeya, A. K., B. M. Kagina, M. D. Tameris, H. Geldenhuys, S. T. Hoff, Z. Shi, I. Kromann, M. Hatherill, H. Mahomed, W. A. Hanekom, P. Andersen, T. J. Scriba, E. Schoeman, C. Krohn, C. L. Day, H. Africa, L. Makhethhe, E. Smit, Y. Brown, S. Suliman, E. J. Hughes, P. Bang, M. A. Snowden, B. McClain, and G. D. Hussey. 2015. First-in-human trial of the post-exposure tuberculosis vaccine H56:IC31 in Mycobacterium tuberculosis infected and non-infected healthy adults. *Vaccine* 33 (33):4130-4140.
- Luca, S., and T. Mihaescu. 2013. History of BCG Vaccine. *Maedica* 8 (1):53-58.
- Ma, H., and R. O'Kennedy. 2015. The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. *Methods Mol Biol* 1348:7-11.
- Mabbott, N. A., D. S. Donaldson, H. Ohno, I. R. Williams, and A. Mahajan. 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* 6 (4):666-677.
- Makowski, L. 1994. Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Current opinion in structural biology* 4 (2):225-230.
- Man, S. M., R. Karki, and T. D. Kanneganti. 2016. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur J Immunol* 46 (2):269-280.
- Mantis, N. J., N. Rol, and B. Corthesy. 2011. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* 4 (6):603-611.
- Mao, C., F. Wang, and B. Cao. 2012. Controlling nanostructures of mesoporous silica fibers by supramolecular assembly of genetically modifiable bacteriophages. *Angew Chem Int Ed Engl* 51 (26):6411-6415.
- Mao, C. B. 2013. Brenner's Encyclopedia of Genetics, edited by S. Maloy and K. Hughes. San Diego, 39-41.
- Mayolo-Deloisa, K., L. M. Martinez, and M. Rito-Palomares. 2012. Chromatography techniques and their application to studies of conformational changes, stability and refolding of proteins. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*.
- Mearns, H., H. D. Geldenhuys, B. M. Kagina, M. Musvosvi, F. Little, F. Ratangee, H. Mahomed, W. A. Hanekom, S. T. Hoff, M. Ruhwald, I. Kromann, P. Bang, M. Hatherill, P. Andersen, and T. J. Scriba. 2017. H1:IC31 vaccination is safe and induces long-lived TNF- α (+)IL-2(+)/CD4 T cell responses in M. tuberculosis infected and uninfected adolescents: A randomized trial. *Vaccine* 35 (1):132-141.

- Melenotte, C., M. Drancourt, J. P. Gorvel, J. L. Mège, and D. Raoult. 2019. Post-bacterial infection chronic fatigue syndrome is not a latent infection. *Médecine et Maladies Infectieuses* 49 (2):140-149.
- Merril, C. R., D. Scholl, and S. L. Adhya. 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2 (6):489-497.
- Micoli, F., R. Adamo, and P. Costantino. 2018. Protein Carriers for Glycoconjugate Vaccines: History, Selection Criteria, Characterization and New Trends. *Molecules* 23 (6):1451.
- Milone, M. C., and U. O'Doherty. 2018. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 32 (7):1529-1541.
- Min, J., H. Jung, H. H. Shin, G. Cho, H. Cho, and S. Kang. 2013. Implementation of P22 viral capsids as intravascular magnetic resonance T1 contrast conjugates via site-selective attachment of Gd(III)-chelating agents. *Biomacromolecules* 14 (7):2332-2339.
- MINSAL. 2019. Informe de situación epidemiológica y operacional del Programa Nacional de Tuberculosis 2019. Chile.
- Mir, F.-A., S. H. E. Kaufmann, and A. N. Eddine. 2009. A multicistronic DNA vaccine induces significant protection against tuberculosis in mice and offers flexibility in the expressed antigen repertoire. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 16 (10):1467-1475.
- Moradi, B., M. Sankian, Y. Amini, and Z. Meshkat. 2016. Construction of a Novel DNA Vaccine Candidate Encoding an HspX-PPE44-EsxV Fusion Antigen of Mycobacterium tuberculosis. *Reports of biochemistry & molecular biology* 4 (2):89-97.
- Moreno-Mendieta, S. A., D. Guillén, C. Espitia, R. Hernández-Pando, S. Sanchez, and R. Rodríguez-Sanoja. 2014. A novel antigen-carrier system: the Mycobacterium tuberculosis Acr protein carried by raw starch microparticles. *International journal of pharmaceutics* 474 (1-2):241-248.
- Murphy, K., and C. Weaver. 2017. Janeway's Immunobiology, 9th Edition. New York: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC., 493-531.
- Mushtaq, K., J. A. Sheikh, M. Amir, N. Khan, B. Singh, and J. N. Agrewala. 2015. Rv2031c of Mycobacterium tuberculosis: a master regulator of Rv2028-Rv2031 (HspX) operon. *Front Microbiol* 6:351.
- Nair, V. R., L. H. Franco, V. M. Zacharia, H. S. Khan, C. E. Stamm, W. You, D. K. Marciano, H. Yagita, B. Levine, and M. U. Shiloh. 2016. Microfold Cells Actively Translocate Mycobacterium tuberculosis to Initiate Infection. *Cell Rep* 16 (5):1253-1258.
- Nangpal, P., R. K. Bahal, and A. K. Tyagi. 2017. Boosting with recombinant MVA expressing M. tuberculosis α -crystallin antigen augments the protection imparted by BCG against tuberculosis in guinea pigs. *Sci Rep* 7 (1):17286.
- Narayanaswamy, R., F. Sevilla, and K. Ma. 2019. Absorbance Spectroscopy for Chemical Sensors☆. In *Encyclopedia of Ocean Sciences (Third Edition)*, edited by J. K. Cochran, H. J. Bokuniewicz and P. L. Yager. Oxford: Academic Press, 38-46.
- Nell, A. S., E. D'Lom, P. Bouic, M. Sabaté, R. Bosser, J. Picas, M. Amat, G. Churchyard, and P. J. Cardona. 2014. Safety, tolerability, and immunogenicity of the novel antituberculous vaccine RUTI: randomized, placebo-controlled phase II clinical trial in patients with latent tuberculosis infection. *PLoS One* 9 (2):e89612.
- Nemes, E., H. Geldenhuys, V. Rozot, K. T. Rutkowski, F. Ratangee, N. Bilek, S. Mabwe, L. Makhetha, M. Erasmus, A. Toefy, H. Mulenga, W. A. Hanekom, S. G. Self, L.-G. Bekker, R. Ryall, S. Gurunathan, C. A. DiazGranados, P. Andersen, I. Kromann, T. Evans, R. D. Ellis, B. Landry, D. A. Hokey, R. Hopkins, A. M. Ginsberg, T. J. Scriba, and M. Hatherill. 2018. Prevention of M. tuberculosis Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination. *New England Journal of Medicine* 379 (2):138-149.
- Nieuwenhuizen, N. E., P. S. Kulkarni, U. Shaligram, M. F. Cotton, C. A. Rentsch, B. Eisele, L. Grode, and S. H. E. Kaufmann. 2017. The Recombinant Bacille Calmette-Guérin Vaccine VPM1002: Ready for Clinical Efficacy Testing. *Front Immunol* 8:1147.
- Niu, H., L. Hu, Q. Li, Z. Da, B. Wang, K. Tang, Q. Xin, H. Yu, Y. Zhang, Y. Wang, X. Ma, and B. Zhu. 2011. Construction and evaluation of a multistage Mycobacterium tuberculosis subunit vaccine candidate Mtb10.4-HspX. *Vaccine* 29 (51):9451-9458.

- Novák, P., and V. Havlíček. 2016. 4 - Protein Extraction and Precipitation. In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)*, edited by P. Ciborowski and J. Silberring. Boston: Elsevier, 51-62.
- O'Garra, A., P. S. Redford, F. W. McNab, C. I. Bloom, R. J. Wilkinson, and M. P. R. Berry. 2013. The Immune Response in Tuberculosis. *Annual Review of Immunology* 31 (1):475-527.
- Owji, H., N. Nezafat, M. Negahdaripour, A. Hajiebrahimi, and Y. Ghasemi. 2018. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *Eur J Cell Biol* 97 (6):422-441.
- Pagan, A. J., and L. Ramakrishnan. 2014. Immunity and Immunopathology in the Tuberculous Granuloma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5 (9).
- . 2018. The Formation and Function of Granulomas. *Annu Rev Immunol* 36:639-665.
- Palm, A. E., and C. Henry. 2019. Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination. *Front Immunol* 10:1787.
- Parracho, H. M., B. H. Burrowes, M. C. Enright, M. L. McConville, and D. R. Harper. 2012. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *Journal of molecular and genetic medicine : an international journal of biomedical research* 6:279-286.
- Parrish, N. M., J. D. Dick, and W. R. Bishai. 1998. Mechanisms of latency in Mycobacterium tuberculosis. *Trends Microbiol* 6 (3):107-112.
- Paul, W. E., and J. Zhu. 2010. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature reviews. Immunology* 10 (4):225-235.
- Payne, S. 2017. Chapter 1 - Introduction to Animal Viruses. In *Viruses*, edited by S. Payne: Academic Press, 1-11.
- Penn-Nicholson, A., M. Tameris, E. Smit, T. A. Day, M. Musvosvi, L. Jayashankar, J. Vergara, S. Mabwe, N. Bilek, H. Geldenhuys, A. K. Luabeya, R. Ellis, A. M. Ginsberg, W. A. Hanekom, S. G. Reed, R. N. Coler, T. J. Scriba, and M. Hatherill. 2018. Safety and immunogenicity of the novel tuberculosis vaccine ID93 + GLA-SE in BCG-vaccinated healthy adults in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 trial. *Lancet Respir Med* 6 (4):287-298.
- Pichichero, M. E. 2013. Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials. *Hum Vaccin Immunother* 9 (12):2505-2523.
- Putra, R. D., and D. Lyrawati. 2020. Interactions between Bacteriophages and Eukaryotic Cells. *Scientifica (Cairo)* 2020:3589316.
- Qi, H., H. Lu, H. J. Qiu, V. Petrenko, and A. Liu. 2012. Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *J Mol Biol* 417 (3):129-143.
- Rakonjac, J., N. J. Bennett, J. Spagnuolo, D. Gagic, and M. Russel. 2011. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol* 13 (2):51-76.
- Rakonjac, J., M. Russel, S. Khanum, S. J. Brooke, and M. Rajic. 2017. Filamentous Phage: Structure and Biology. *Adv Exp Med Biol* 1053:1-20.
- Rakover, I. S., N. Zabavnik, R. Kopel, M. Paz-Rozner, and B. Solomon. 2010. Antigen-specific therapy of EAE via intranasal delivery of filamentous phage displaying a myelin immunodominant epitope. *Journal of Neuroimmunology* 225 (1):68-76.
- Rampersad, S., and P. Tennant. 2018. Replication and Expression Strategies of Viruses.55-82.
- Ravin, K. A., and M. Loy. 2016. The Eosinophil in Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 50 (2):214-227.
- Rehwinkel, J., and M. U. Gack. 2020. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology* 20 (9):537-551.
- Reyes, A., M. Haynes, N. Hanson, F. E. Angly, A. C. Heath, F. Rohwer, and J. I. Gordon. 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466:334.
- Reyes, F., O. Otero, F. Camacho, M. E. Sarmiento, and A. Acosta. 2013. Purification of an IgA Monoclonal Antibody Specific for the Acr Protein of Mycobacterium tuberculosis by Immunoaffinity Chromatography. *Malays J Med Sci* 20 (5):16-22.
- Rioux, G., C. Mathieu, A. Russell, M. Bolduc, M. E. Laliberté-Gagné, P. Savard, and D. Leclerc. 2014. PapMV nanoparticles improve mucosal immune responses to the trivalent inactivated flu vaccine. *J Nanobiotechnology* 12:19.

- Rittershaus, E. S. C., S.-H. Baek, and C. M. Sasseti. 2013. The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell host & microbe* 13 (6):643-651.
- Roh, J. S., and D. H. Sohn. 2018. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune network* 18 (4):e27-e27.
- Rosenberg, J., and J. Huang. 2018. CD8(+) T Cells and NK Cells: Parallel and Complementary Soldiers of Immunotherapy. *Current opinion in chemical engineering* 19:9-20.
- Roux, M. 2011. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. Note by M. F. d'Herelle, presented by M. Roux. *Comptes Rendus Academie des Sciences* 1917; 165:373-5. *Bacteriophage* 1 (1):3-5.
- Roy, A., M. Eisenhut, R. J. Harris, L. C. Rodrigues, S. Sridhar, S. Habermann, L. Snell, P. Mangtani, I. Adetifa, A. Lalvani, and I. Abubakar. 2014. Effect of BCG vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 349:g4643.
- Saini, N. K., A. Baena, T. W. Ng, M. M. Venkataswamy, S. C. Kennedy, S. Kunnath-Velayudhan, L. J. Carreño, J. Xu, J. Chan, M. H. Larsen, W. R. Jacobs, Jr., and S. A. Porcelli. 2016. Suppression of autophagy and antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS47. *Nat Microbiol* 1 (9):16133.
- Salmond, G. P., and P. C. Fineran. 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* 13 (12):777-786.
- Sanchez-Trincado, J. L., M. Gomez-Perosanz, and P. A. Reche. 2017. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *J Immunol Res* 2017:2680160.
- Saqib, M., R. Khatri, B. Singh, A. Gupta, A. Kumar, and S. Bhaskar. 2016. Mycobacterium indicus pranii as a booster vaccine enhances BCG induced immunity and confers higher protection in animal models of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 101:164-173.
- Sartorius, R., L. D'Apice, A. Prisco, and P. De Berardinis. 2019. Arming Filamentous Bacteriophage, a Nature-Made Nanoparticle, for New Vaccine and Immunotherapeutic Strategies. *Pharmaceutics* 11 (9):437.
- Sartorius, R., L. D'Apice, M. Trovato, F. Cuccaro, V. Costa, M. G. De Leo, V. M. Marzullo, C. Biondo, S. D'Auria, M. A. De Matteis, A. Ciccodicola, and P. De Berardinis. 2015. Antigen delivery by filamentous bacteriophage displaying an anti-DEC-205 single-chain variable fragment confers adjuvant activity by triggering a TLR9-mediated immune response. *EMBO molecular medicine* 7 (7):973-988.
- Schmid, F.-X. 2001. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. In *eLS*.
- Schrager, L. K., J. Vekemens, N. Drager, D. M. Lewinsohn, and O. F. Olesen. 2020. The status of tuberculosis vaccine development. *Lancet Infect Dis* 20 (3):e28-e37.
- Secor, Patrick R., Johanna M. Sweere, Lia A. Michaels, Andrey V. Malkovskiy, D. Lazzareschi, E. Katznelson, J. Rajadas, Michael E. Birnbaum, A. Arrigoni, Kathleen R. Braun, Stephen P. Evanko, David A. Stevens, W. Kaminsky, Pradeep K. Singh, William C. Parks, and Paul L. Bollyky. 2015. Filamentous Bacteriophage Promote Biofilm Assembly and Function. *Cell host & microbe* 18 (5):549-559.
- Sergeeva, M. V., A. Pulkina, K. Vasilev, E. A. Romanovskaya-Romanko, A. Komissarov, O. Kuchur, A. Egorov, L. Tsybalova, and M. Stukova. 2017. Safety and immunogenicity of cold-adapted recombinant influenza vector expressing ESAT-6 and Ag85A antigens of M. tuberculosis. *Voprosy Virusologii* 62:266-272.
- Shah, M., and C. Reed. 2014. Complications of tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 27 (5):403-410.
- Sharma, S. K., and A. Mohan. 2017. Miliary Tuberculosis. *Microbiol Spectr* 5 (2).
- Shi, C., L. Chen, Z. Chen, Y. Zhang, Z. Zhou, J. Lu, R. Fu, C. Wang, Z. Fang, and X. Fan. 2010. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant BCG over-expressing HspX protein. *Vaccine* 28 (32):5237-5244.
- Shlomchik, M. J., and F. Weisel. 2012. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev* 247 (1):52-63.
- Simmonds, P., M. J. Adams, M. Benkő, M. Breitbart, J. R. Brister, E. B. Carstens, A. J. Davison, E. Delwart, A. E. Gorbalenya, B. Harrach, R. Hull, A. M. King, E. V. Koonin, M. Krupovic, J. H. Kuhn, E. J.

- Lefkowitz, M. L. Nibert, R. Orton, M. J. Roossinck, S. Sabanadzovic, M. B. Sullivan, C. A. Suttle, R. B. Tesh, R. A. van der Vlugt, A. Varsani, and F. M. Zerbini. 2017. Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nat Rev Microbiol* 15 (3):161-168.
- Singh, P., L. Sharma, S. R. Kulothungan, B. V. Adkar, R. S. Prajapati, P. S. Ali, B. Krishnan, and R. Varadarajan. 2013. Effect of signal peptide on stability and folding of *Escherichia coli* thioredoxin. *PLoS One* 8 (5):e63442.
- Singh, R., S. P. Dwivedi, U. S. Gaharwar, R. Meena, P. Rajamani, and T. Prasad. 2020. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Appl Microbiol* 128 (6):1547-1567.
- Singh, V., and K. Chibale. 2021. Strategies to Combat Multi-Drug Resistance in Tuberculosis. *Acc Chem Res* 54 (10):2361-2376.
- Sk, R., and S. Sw. 2011. *Mycobacterium Tuberculosis* Heat Shock Protein 16 as a Potential Marker for Latent TB: A Preliminary Findings. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 2 (5).
- Smaill, F., and Z. Xing. 2014. Human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine: is the respiratory route of delivery the future? *Expert Rev Vaccines* 13 (8):927-930.
- Small, J. C., and H. C. Ertl. 2011. Viruses - from pathogens to vaccine carriers. *Curr Opin Virol* 1 (4):241-245.
- Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228 (4705):1315-1317.
- Smith, G. P., and V. A. Petrenko. 1997. Phage Display. *Chemical Reviews* 97 (2):391-410.
- Sokullu, E., H. Soleymani Abyaneh, and M. A. Gauthier. 2019. Plant/Bacterial Virus-Based Drug Discovery, Drug Delivery, and Therapeutics. *Pharmaceutics* 11 (5).
- Solomon, B. 2008. Filamentous Bacteriophage as a Novel Therapeutic Tool for Alzheimer's Disease Treatment. *Journal of Alzheimer's Disease* 15:193-198.
- Speck, P., and A. Smithyman. 2016. Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. *FEMS Microbiol Lett* 363 (3).
- St John, A. L., and A. P. S. Rathore. 2019. Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. *Nat Rev Immunol* 19 (4):218-230.
- Stanfield, R. L., and I. A. Wilson. 2014. Antibody Structure. *Microbiol Spectr* 2 (2).
- Steiner, D., P. Forrer, M. T. Stumpp, and A. Plückthun. 2006. Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display. *Nat Biotechnol* 24 (7):823-831.
- Stylianou, E., K. L. Griffiths, H. C. Poyntz, R. Harrington-Kandt, M. D. Dicks, L. Stockdale, G. Betts, and H. McShane. 2015. Improvement of BCG protective efficacy with a novel chimpanzee adenovirus and a modified vaccinia Ankara virus both expressing Ag85A. *Vaccine* 33 (48):6800-6808.
- Su, F., G. B. Patel, S. Hu, and W. Chen. 2016. Induction of mucosal immunity through systemic immunization: Phantom or reality? *Hum Vaccin Immunother* 12 (4):1070-1079.
- Suan, D., C. Sundling, and R. Brink. 2017. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Curr Opin Immunol* 45:97-102.
- Sunderland, K. S., M. Yang, and C. Mao. 2017. Phage-Enabled Nanomedicine: From Probes to Therapeutics in Precision Medicine. *Angew Chem Int Ed Engl* 56 (8):1964-1992.
- Tait, D. R., M. Hatherill, O. Van Der Meeren, A. M. Ginsberg, E. Van Brakel, B. Salaun, T. J. Scriba, E. J. Akite, H. M. Ayles, A. Bollaerts, M. A. Demoitić, A. Diacon, T. G. Evans, P. Gillard, E. Hellström, J. C. Innes, M. Lempicki, M. Malahleha, N. Martinson, D. Mesia Vela, M. Muyoyeta, V. Nduba, T. G. Pascal, M. Tameris, F. Thienemann, R. J. Wilkinson, and F. Roman. 2019. Final Analysis of a Trial of M72/AS01(E) Vaccine to Prevent Tuberculosis. *N Engl J Med* 381 (25):2429-2439.
- Tanaka, K., M. Nishimura, Y. Yamaguchi, S. Hashiguchi, S. Takiguchi, M. Yamaguchi, H. Tahara, T. Gotanda, R. Abe, Y. Ito, and K. Sugimura. 2011. A mimotope peptide of A β 42 fibril-specific antibodies with A β 42 fibrillation inhibitory activity induces anti-A β 42 conformer antibody response by a displayed form on an M13 phage in mice. *J Neuroimmunol* 236 (1-2):27-38.

- Tian, Y., M. Wu, X. Liu, Z. Liu, Q. Zhou, Z. Niu, and Y. Huang. 2015. Probing the Endocytic Pathways of the Filamentous Bacteriophage in Live Cells Using Ratiometric pH Fluorescent Indicator. *Advanced Healthcare Materials* 4 (3):413-419.
- Tkachuk, A. P., V. A. Gushchin, V. D. Potapov, A. V. Demidenko, V. G. Lunin, and A. L. Gintsburg. 2017. Multi-subunit BCG booster vaccine GamTBvac: Assessment of immunogenicity and protective efficacy in murine and guinea pig TB models. *PLoS One* 12 (4):e0176784.
- Urdahl, K. B., S. Shafiani, and J. D. Ernst. 2011. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunol* 4 (3):288-293.
- Van Belleghem, J. D., K. Dabrowska, M. Vaneechoutte, J. J. Barr, and P. L. Bollyky. 2018. Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. *Viruses* 11 (1).
- Vieira, J., and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* 153:3-11.
- Villa-Mancera, A., H. Quiroz-Romero, D. Correa, F. Ibarra, M. Reyes-Perez, H. Reyes-Vivas, G. Lopez-Velazquez, K. Gazarian, T. Gazarian, and R. A. Alonso. 2008. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology* 135 (12):1437-1445.
- Vinuesa, C. G., M. A. Linterman, D. Yu, and I. C. MacLennan. 2016. Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol* 34:335-368.
- von Reyn, C. F., T. Lahey, R. D. Arbeit, B. Landry, L. Kailani, L. V. Adams, B. C. Haynes, T. Mackenzie, W. Wieland-Alter, R. I. Connor, S. Tvaroha, D. A. Hokey, A. M. Ginsberg, and R. Waddell. 2017. Safety and immunogenicity of an inactivated whole cell tuberculosis vaccine booster in adults primed with BCG: A randomized, controlled trial of DAR-901. *PLoS One* 12 (5):e0175215.
- Walker, P. J., S. G. Siddell, E. J. Lefkowitz, A. R. Mushegian, E. M. Adriaenssens, P. Alfenas-Zerbini, A. J. Davison, D. M. Dempsey, B. E. Dutilh, M. L. García, B. Harrach, R. L. Harrison, R. C. Hendrickson, S. Junglen, N. J. Knowles, M. Krupovic, J. H. Kuhn, A. J. Lambert, M. Łobocka, M. L. Nibert, H. M. Oksanen, R. J. Orton, D. L. Robertson, L. Rubino, S. Sabanadzovic, P. Simmonds, D. B. Smith, N. Suzuki, K. Van Doerslaer, A.-M. Vandamme, A. Varsani, and F. M. Zerbini. 2021. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2021). *Archives of Virology* 166 (9):2633-2648.
- Wanat, K. A., M. Rosenbach, A. F. Zoiber, P. J. Zhang, and A. Schaffer. 2014. E-cadherin is expressed by mono- and multinucleated histiocytes in cutaneous sarcoidal and foreign body granulomas. *The American Journal of dermatopathology* 36 (8):651-654.
- Wang, G., M. Sun, J. Fang, Q. Yang, H. Tong, and L. Wang. 2006. Protective immune responses against systemic candidiasis mediated by phage-displayed specific epitope of *Candida albicans* heat shock protein 90 in C57BL/6J mice. *Vaccine* 24 (35-36):6065-6073.
- Wang, H., H. Jiang, R. M. B. Teles, Y. Chen, A. Wu, J. Lu, Z. Chen, F. Ma, M. Pellegrini, and R. L. Modlin. 2020. Cellular, Molecular, and Immunological Characteristics of Langhans Multinucleated Giant Cells Programmed by IL-15. *J Invest Dermatol*.
- Wang, J., M. Yang, Y. Zhu, L. Wang, A. P. Tomsia, and C. Mao. 2014a. Phage nanofibers induce vascularized osteogenesis in 3D printed bone scaffolds. *Adv Mater* 26 (29):4961-4966.
- Wang, T., W. C. Hartner, J. W. Gillespie, K. P. Praveen, S. Yang, L. A. Mei, V. A. Petrenko, and V. P. Torchilin. 2014b. Enhanced tumor delivery and antitumor activity in vivo of liposomal doxorubicin modified with MCF-7-specific phage fusion protein. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 10 (2):421-430.
- Wang, X. N., L. Wang, D. Z. Zheng, S. Chen, W. Shi, X. Y. Qiao, Y. P. Jiang, L. J. Tang, Y. G. Xu, and Y. J. Li. 2018. Oral immunization with a *Lactobacillus casei*-based anti-porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) vaccine expressing microfold cell-targeting peptide Co1 fused with the COE antigen of PEDV. *Journal of Applied Microbiology* 124 (2):368-378.
- Weiss, G., and U. E. Schaible. 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev* 264 (1):182-203.

- Wells, J. M., and A. Mercenier. 2008. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6 (5):349-362.
- WHO. 2010. *Treatment of Tuberculosis: Guidelines*. 4 ed. Ginebra.
- . 2019. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Ginebra.
- . 2021a. Global tuberculosis report 2021. Ginebra: World Health Organization.
- . 2021b. World health statistics 2021. Ginebra: World Health Organization.
- Williams, O., and S. Fatima. 2022. Granuloma. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Xie, X., F. Li, J.-W. Chen, and J. Wang. 2014. Risk of tuberculosis infection in anti-TNF- α biological therapy: From bench to bedside. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 47 (4):268-274.
- Xiong, X., H. M. Zhang, T. T. Wu, L. Xu, Y. L. Gan, L. S. Jiang, L. Zhang, and S. L. Guo. 2014. Titer dynamic analysis of D29 within MTB-infected macrophages and effect on immune function of macrophages. *Exp Lung Res* 40 (2):86-98.
- Xu, H., B. Cao, Y. Li, and C. Mao. 2020. Phage nanofibers in nanomedicine: Biopanning for early diagnosis, targeted therapy, and proteomics analysis. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*:e1623.
- Yang, G.-B., Y. Wang, K. Babaahmady, J. Schøller, D. Rahman, E. Bunnik, R. Spallek, C.-M. Zong, J.-Z. Duan, C. Qin, H. Jiang, M. Singh, R. Vaughan, L. A. Bergmeier, H. Schuitemaker, Y. Shao, and T. Lehner. 2012. Immunization with recombinant macaque major histocompatibility complex class I and II and human immunodeficiency virus gp140 inhibits simian-human immunodeficiency virus infection in macaques. *The Journal of general virology* 93 (Pt 7):1506-1518.
- Yang, J., Y. Li, S. Jin, J. Xu, P. C. Wang, X.-J. Liang, and X. Zhang. 2015. Engineered biomaterials for development of nucleic acid vaccines. *Biomaterials research* 19:5-5.
- Yang, L., C. Zhang, Y. Zhao, N. Zhao, P. Wu, H. Zhang, and C. Shi. 2018. Effects of Mycobacterium tuberculosis Mutant Strain Hsp16.3 Gene on Murine RAW 264.7 Macrophage Autophagy. *DNA Cell Biol* 37 (1):7-14.
- Yang, X. Y., Q. F. Chen, Y. P. Li, and S. M. Wu. 2011. Mycobacterium vaccae as adjuvant therapy to anti-tuberculosis chemotherapy in never-treated tuberculosis patients: a meta-analysis. *PLoS One* 6 (9):e23826.
- Yuan, W., N. Dong, L. Zhang, J. Liu, S. Lin, Z. Xiang, H. Qiao, W. Tong, and C. Qin. 2012. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine expressing a fusion protein of Ag85B-Esat6-HspX in mice. *Vaccine* 30 (14):2490-2497.
- Yuan, Y., D. D. Crane, and C. E. Barry, 3rd. 1996. Stationary phase-associated protein expression in Mycobacterium tuberculosis: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 178 (15):4484-4492.
- Yuan, Y., D. D. Crane, R. M. Simpson, Y. Q. Zhu, M. J. Hickey, D. R. Sherman, and C. E. Barry, 3rd. 1998. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of Mycobacterium tuberculosis is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (16):9578-9583.
- Zhang, F., Z. Zhang, X. Li, J. Li, J. Lv, Z. Ma, and L. Pan. 2021. Immune Responses to Orally Administered Recombinant Lactococcus lactis Expressing Multi-Epitope Proteins Targeting M Cells of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Viruses* 13 (10).
- Zhang, L., H.-W. Ru, F.-Z. Chen, C.-Y. Jin, R.-F. Sun, X.-Y. Fan, M. Guo, J.-T. Mai, W.-X. Xu, Q.-X. Lin, and J. Liu. 2016. Variable Virulence and Efficacy of BCG Vaccine Strains in Mice and Correlation With Genome Polymorphisms. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 24 (2):398-405.
- Zhang, S. 2018. The role of transforming growth factor β in T helper 17 differentiation. *Immunology* 155 (1):24-35.
- Zhang, X., Q. Yang, Y. Lang, X. Jiang, and P. Wu. 2020. Rationale of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as the Chromogenic Substrate in Colorimetric Analysis. *Analytical Chemistry* 92 (18):12400-12406.

- Zhu, Q., Z. Chen, P. K. Paul, Y. Lu, W. Wu, and J. Qi. 2021. Oral delivery of proteins and peptides: Challenges, status quo and future perspectives. *Acta Pharm Sin B* 11 (8):2416-2448.
- Zimmermann, N., V. Thormann, B. Hu, A.-B. Köhler, A. Imai-Matsushima, C. Locht, E. Arnett, L. S. Schlesinger, T. Zoller, M. Schürmann, S. H. Kaufmann, and H. Wardemann. 2016. Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO molecular medicine* 8 (11):1325-1339.
- Zou, J., M. T. Dickerson, N. K. Owen, L. A. Landon, and S. L. Deutscher. 2004. Biodistribution of filamentous phage peptide libraries in mice. *Mol Biol Rep* 31 (2):121-129.



ANEXOS

Anexo 1: Composición de geles SDS-PAGE en tampón tris-glicina.

La preparación de los geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico para electroforesis en tampón tris-glicina se rigió bajo las siguientes tablas.

		Concentración											
		10%				12%				15%			
Número de geles		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Compuesto	Unidad	Volumen											
H ₂ O	mL	2,4	4,7	7,1	9,6	2	4	6	8	1,4	2,8	4,2	5,6
Acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%	mL	2	4	6	8	2,4	4,8	7,2	9,6	3	6	9	12
Tris-HCl, pH 8,8 1,5 M	mL	1,5	3	4,5	6	1,5	3	4,5	6	1,5	3	4,5	6
PSA 10%	μL	60	120	180	240	60	120	180	240	60	120	180	240
SDS 10%	μL	60	120	180	240	60	120	180	240	60	120	180	240
TEMED	μL	6	12	18	24	6	12	18	24	6	12	18	24
Volumen TOTAL	mL	6	12	18	24	6	12	18	24	6	12	18	24

Tabla 3. Receta para geles resolutorios SDS-PAGE de 1 mm de grosor.

Número de geles		1	2	3	4
Compuesto	Unidad	Volumen			
H ₂ O	mL	1,3	2,6	3,9	5,2
Acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%	mL	0,5	1	1,5	2
Tris-HCl, pH 6,8 0,5 M	mL	0,625	1,25	1,875	2,5
PSA 10%	μL	25	50	75	100
SDS 10%	μL	25	50	75	100
TEMED	μL	2,5	5	7,5	10
Volumen TOTAL	mL	2,5	5	7,5	10

Tabla 4. Receta para geles concentradores SDS-PAGE de 1 mm de grosor.