



VI

# CONGRESO LATINOAMERICANO DE BIOQUIMICA CLÍNICA

II

## CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA



*¡El riesgo es que te quieras quedar!*

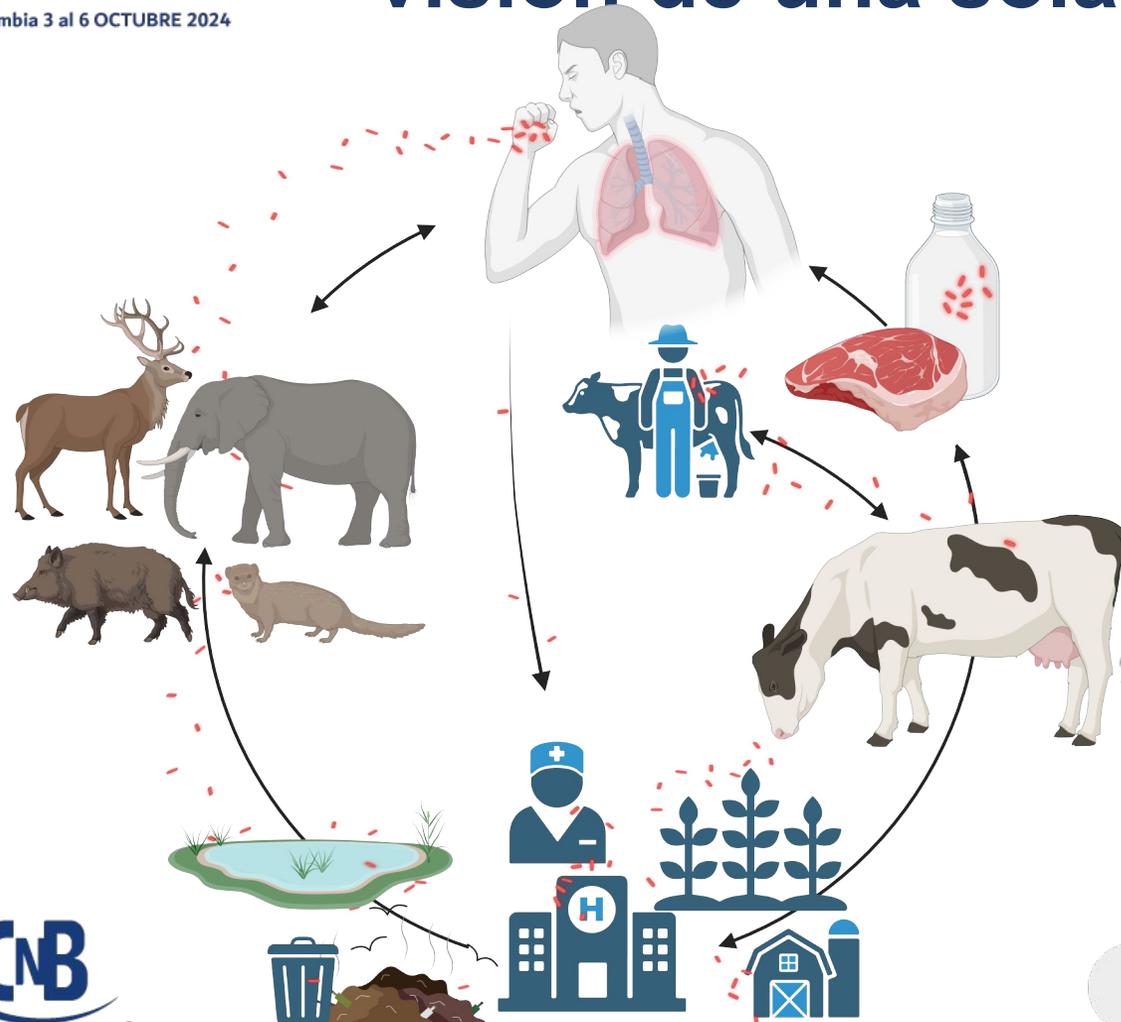
Cartagena, Colombia 3 al 6 OCTUBRE 2024

# “Descubrimiento de Biomarcadores Para el Diagnostico de Tuberculosis”

Luisa Maria Nieto Ramirez, PhD  
Research Scientist, Colorado State University



# Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) en la visión de una sola salud



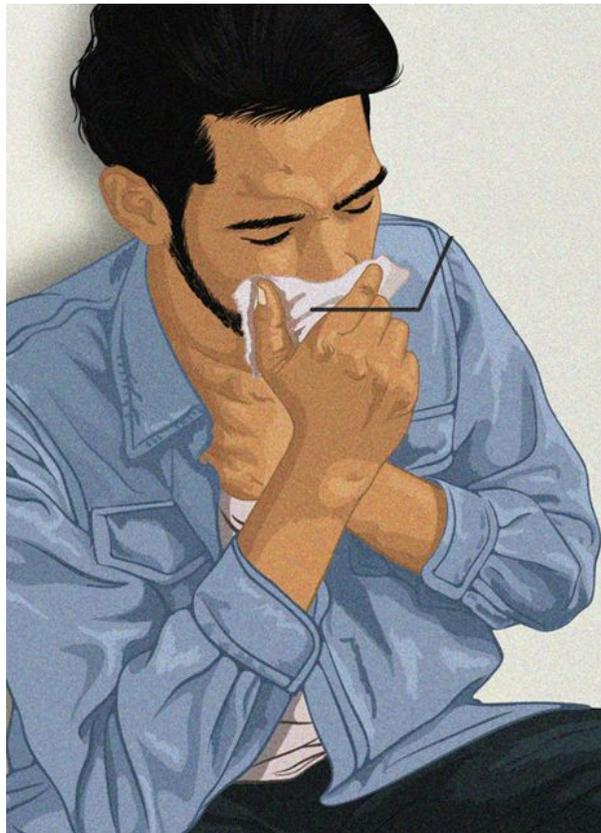
<https://www.frontiersin.org/journals/public-health/articles/10.3389/fpubh.2022.994745/full>



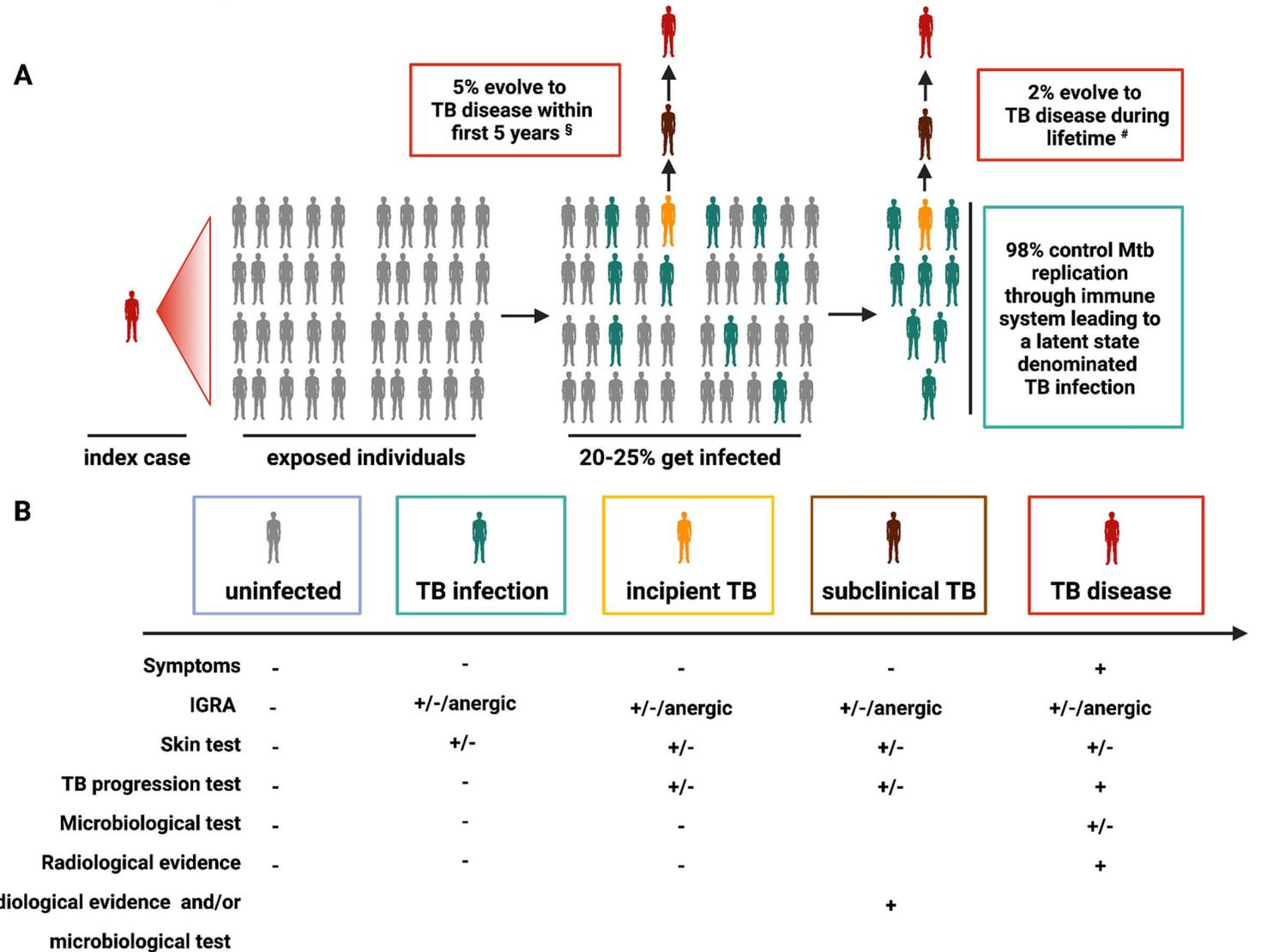
# Contenido

- Espectro clínico de la Tuberculosis (TB)
- Diagnóstico de TB y Biomarcadores
- Exosomas y biomarcadores
- Proteínas y revisión general espectrometría de masas.
- Fases en el estudio de biomarcadores
- Estudio para la detección de marcadores asociados a TB.
- Conclusiones

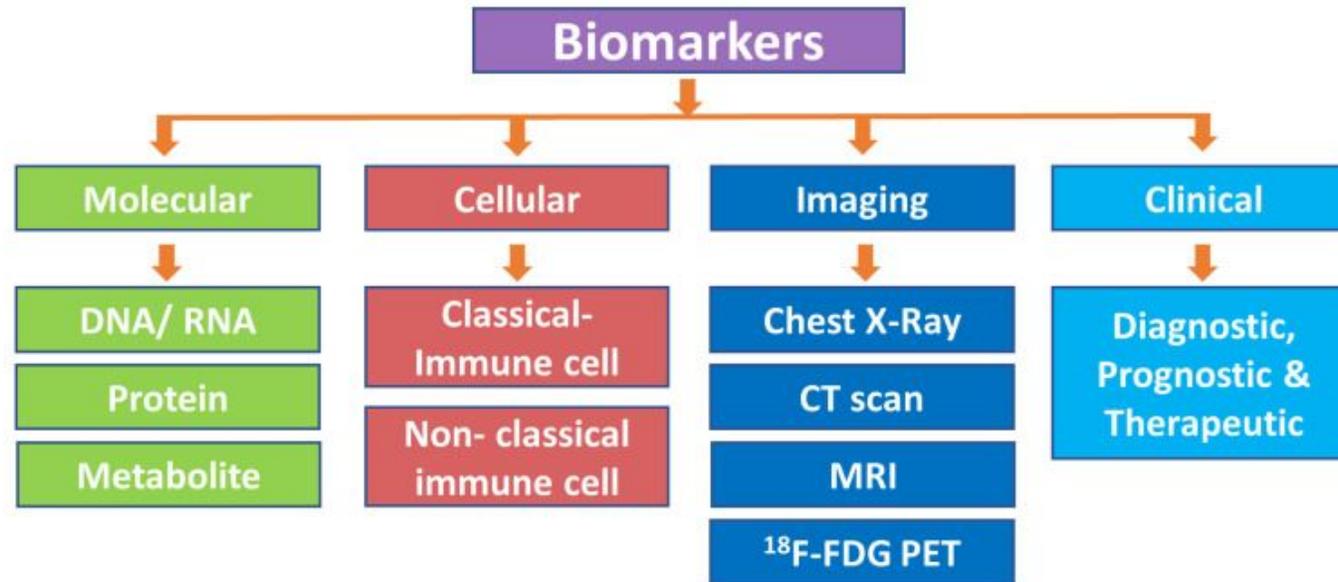




# Espectro clínico de la Tuberculosis



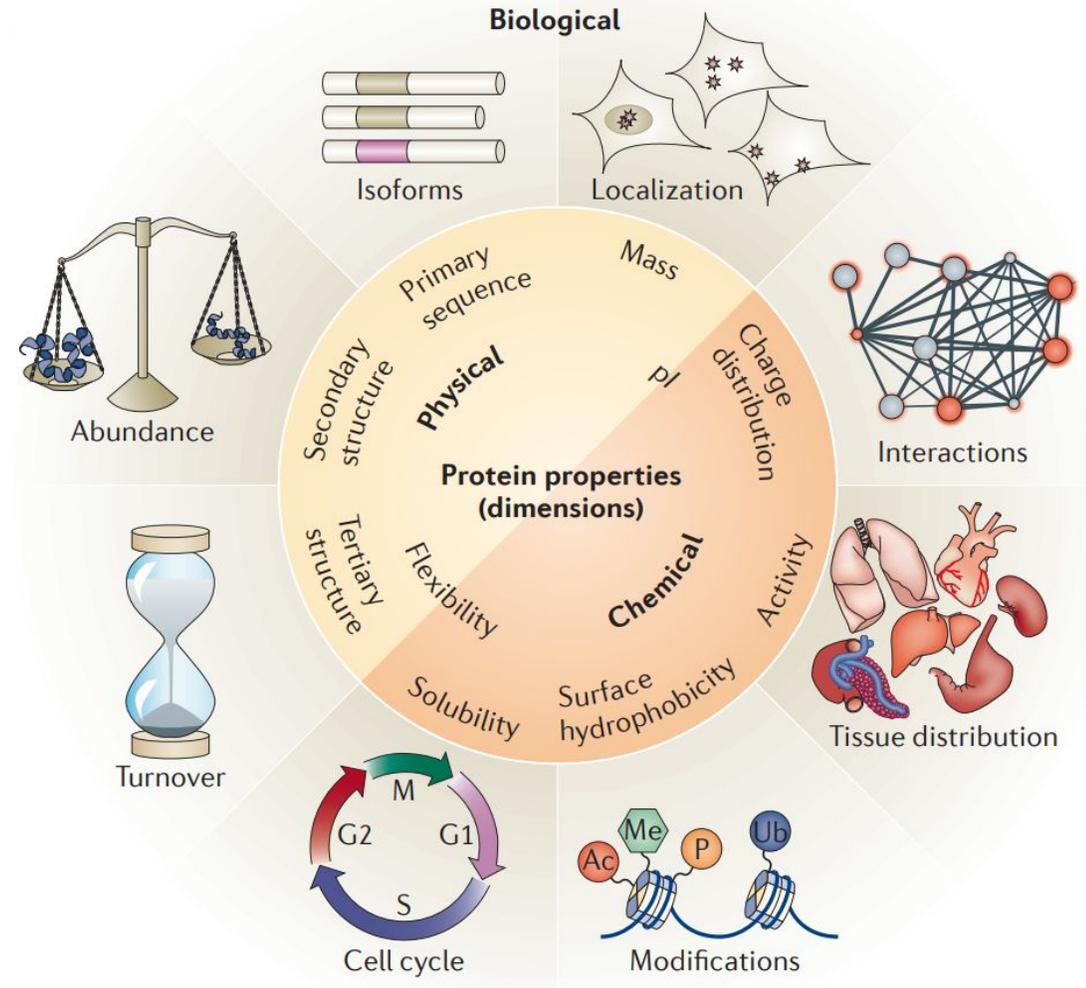
# Diagnóstico de TB



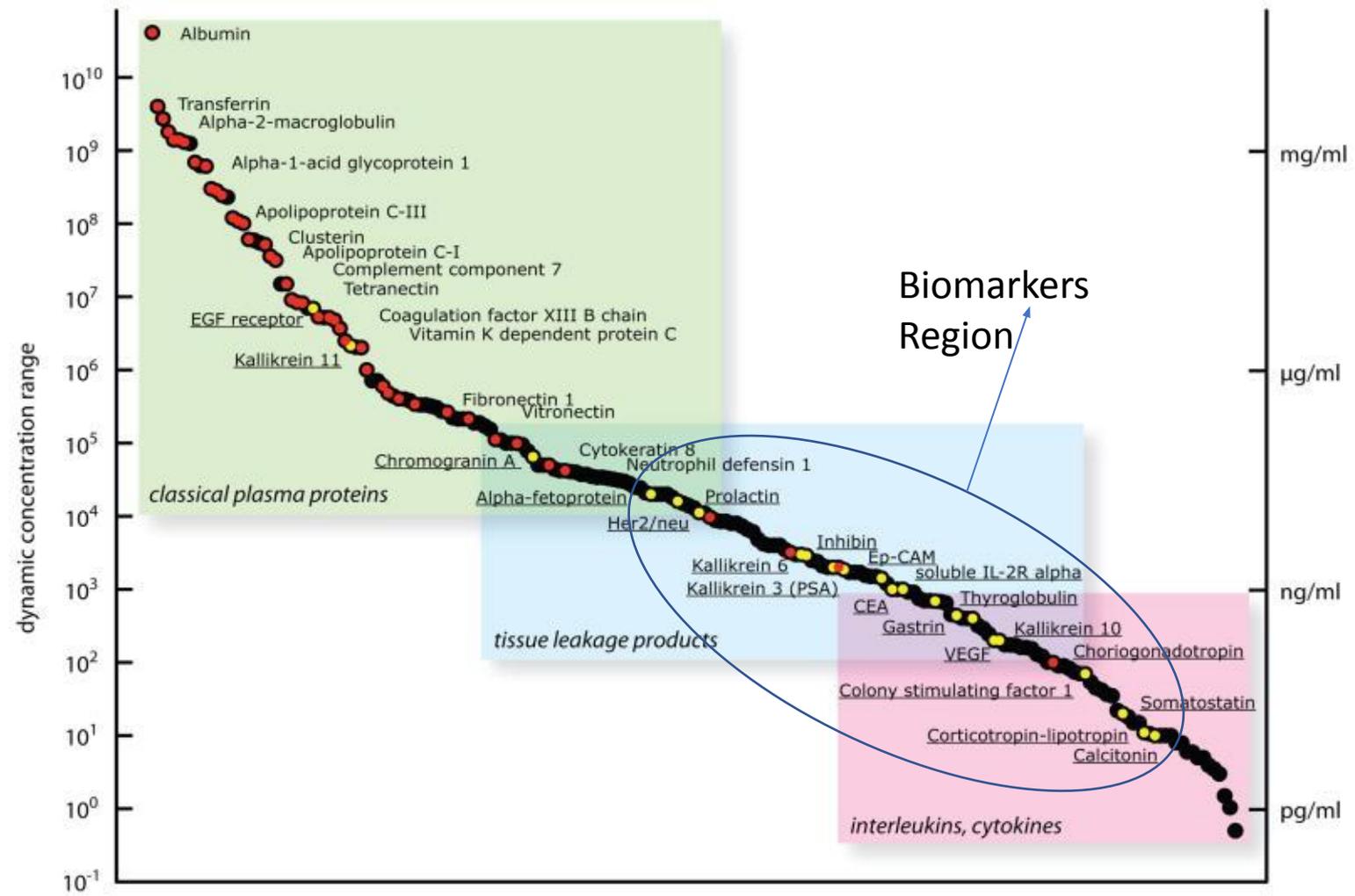
# Biomarcadores

“Medición biométrica que transmite información sobre la condición biológica del sujeto que se está examinando”.

Habilidad para discriminar entre dos o más estados biológicos: monitorear enfermedades, predecir severidad, diagnóstico, sub-clasificación de enfermedades.



# Proteínas Plasmáticas

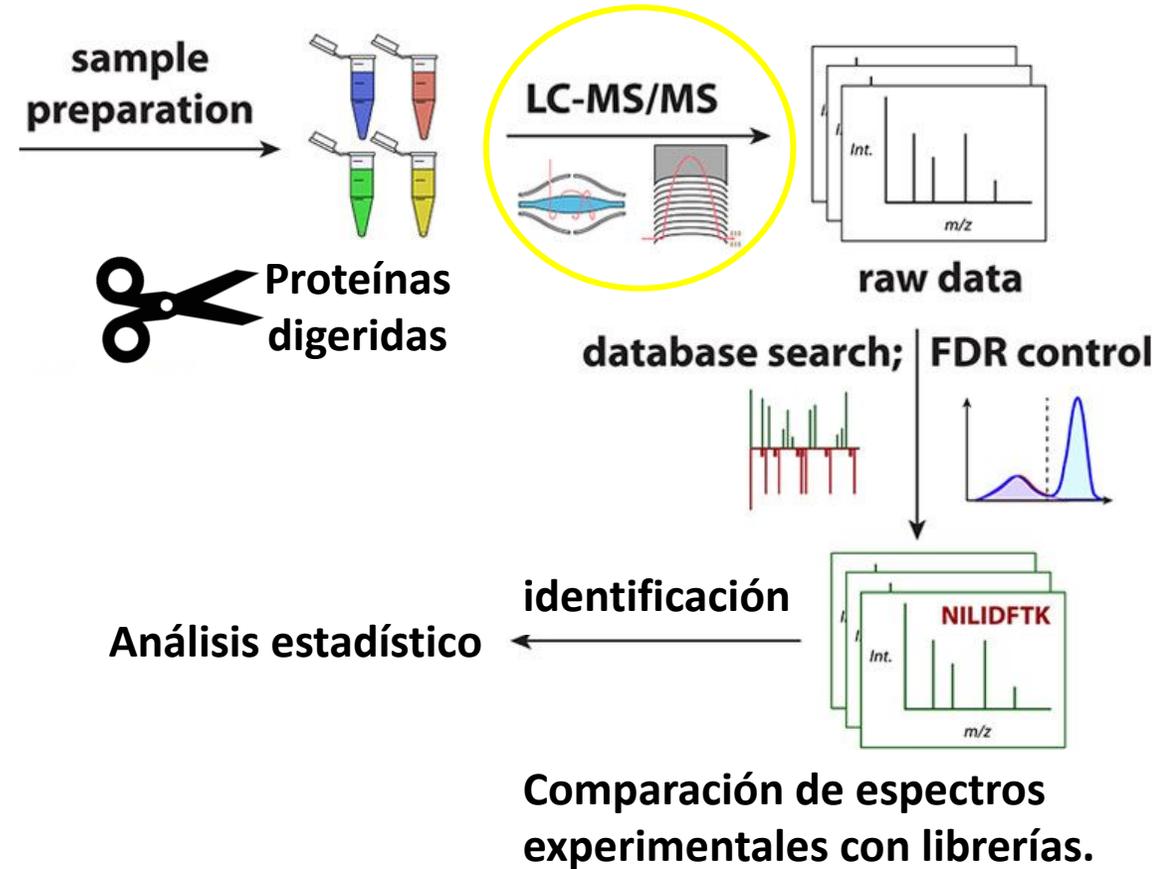


Tomado de Horvatovich, P. (2013). Biomarkers, Protein Expression.



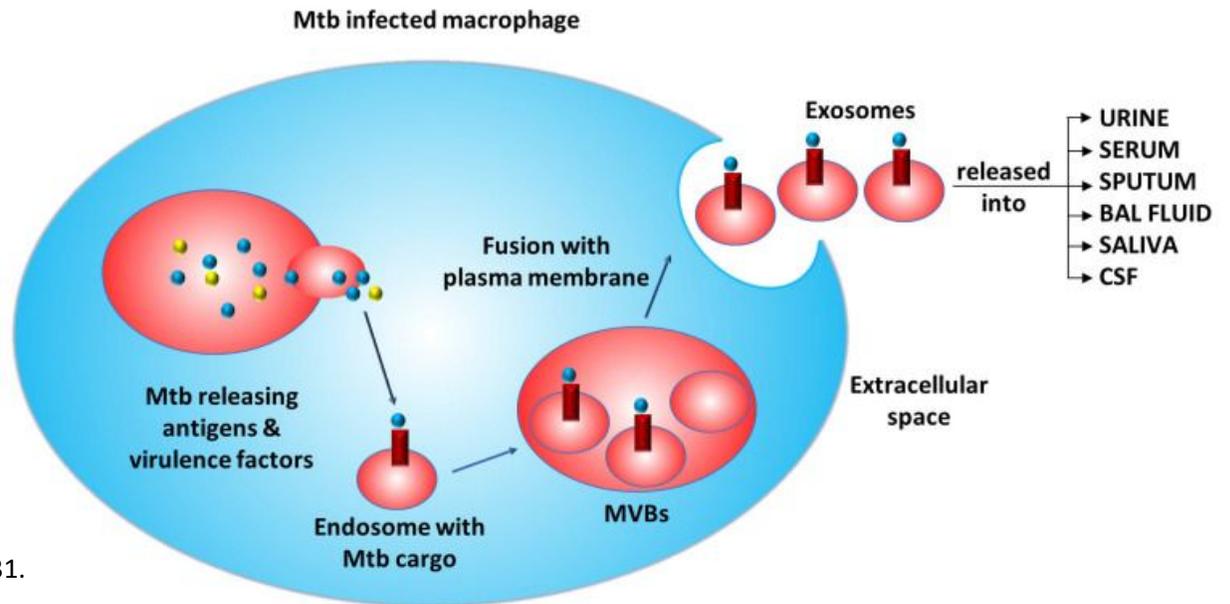
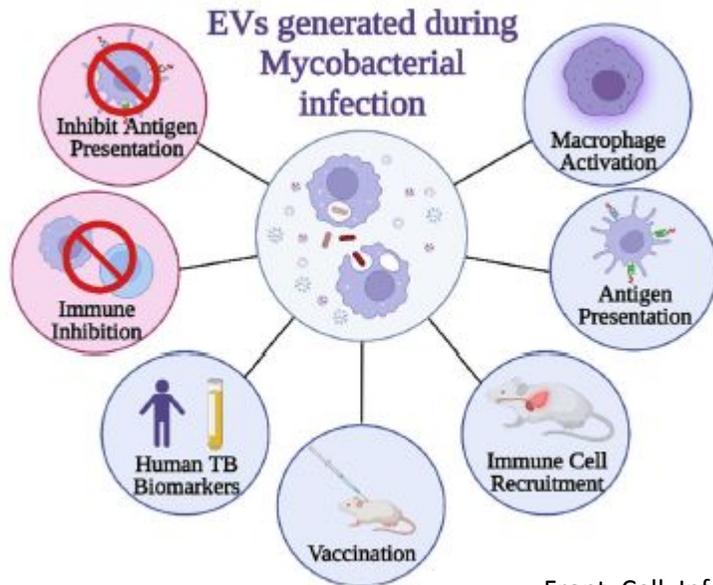
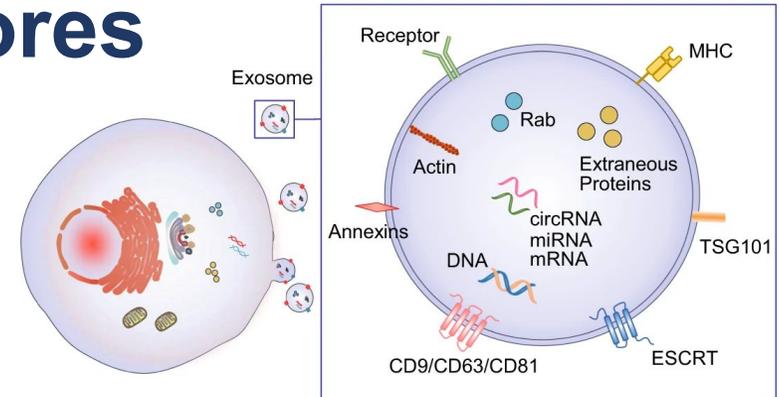
# Espectrometría de masas

Herramienta analítica utilizada en el campo de diagnóstico y de investigación científica, que permite caracterizar y cuantificar diversos analitos/moléculas que sean susceptibles de ser ionizables.



# Exosomas en el descubrimiento de biomarcadores

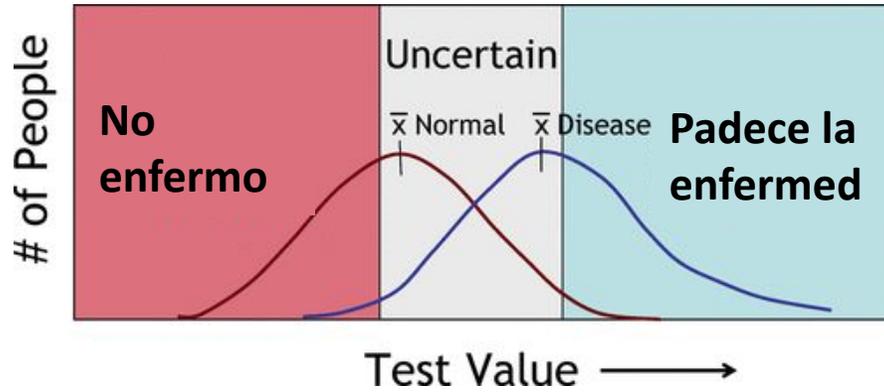
Proteínas de *M. tuberculosis* encontradas en exosomas: Complejo Antígeno 85, HspX, DnaK



Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:912831.  
doi: 10.3389/fcimb.2022.912831



# Fases en el Desarrollo de biomarcadores



Tomado de: Joshua LaBaer; J. Proteome Res. 2005, 4, 1053-1059

## Discovery phase

Identify biomarker candidates



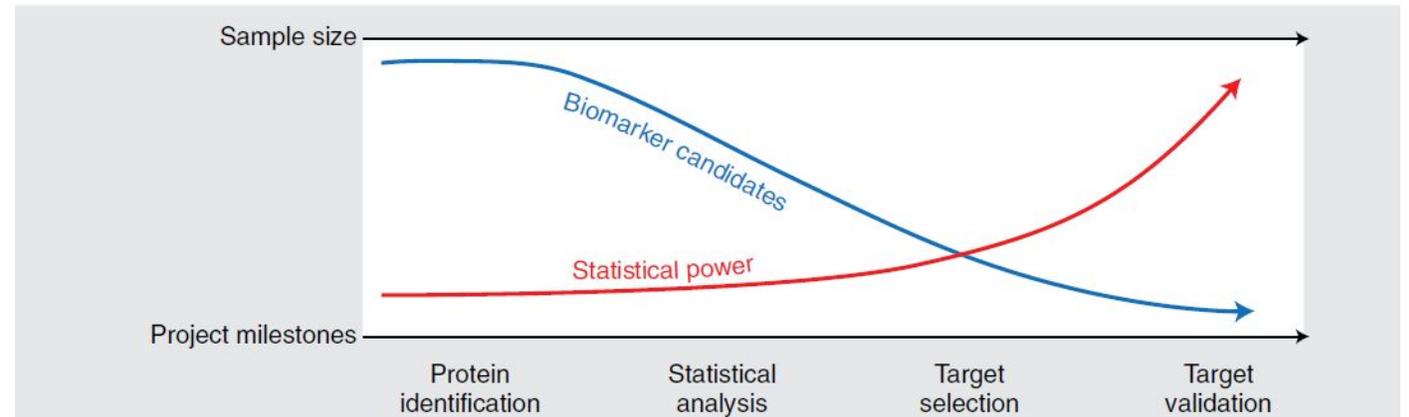
## Verification phase

Confirm identify and differential expression of candidates



## Validation phase

Validate biomarker performance in large cohorts

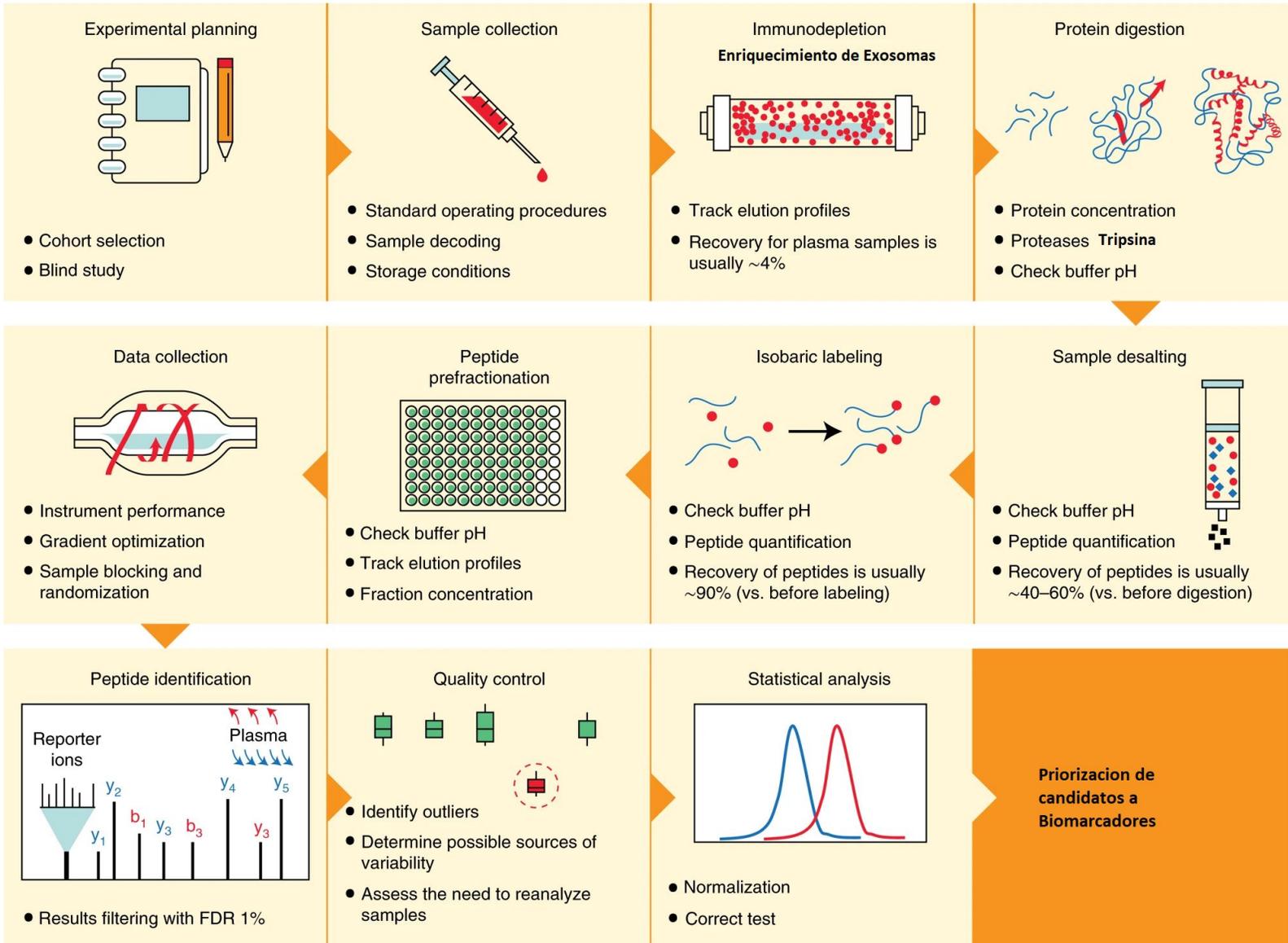


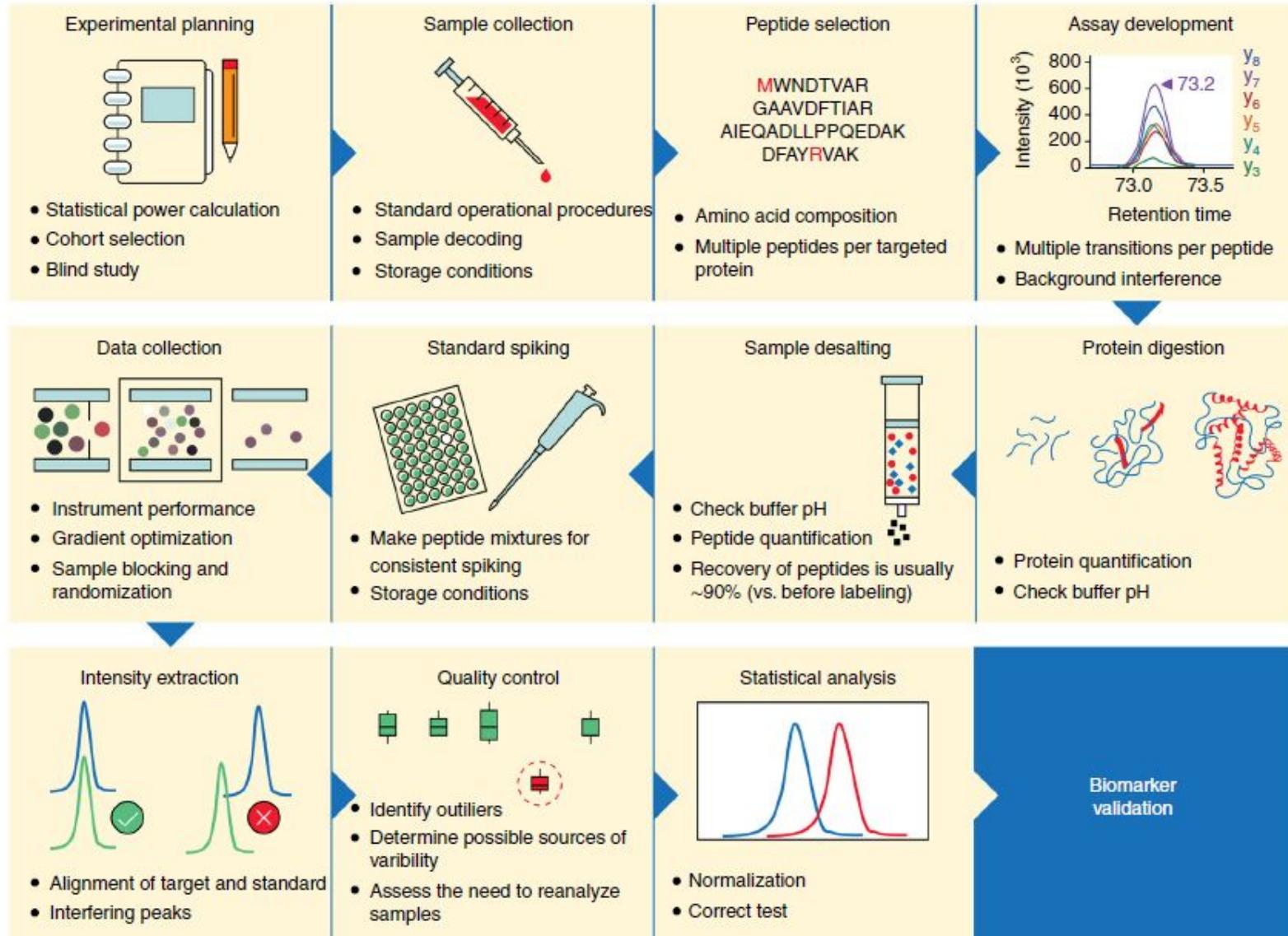
Tomado de Nakayasu, E.S et al., (2021). Tutorial: best practices and considerations for mass-spectrometry-based protein biomarker discovery and validation.



# Biomarcadores

## Fase de descubrimiento o "discovery".





## Biomarcadores

## Fase de verificación y validación





# Estudio Colorado State University

Objetivo: identificar marcadores proteicos para diferenciar casos TB tempranos, que no exhiben síntomas ni cultivos positivos y facilitar su detección.



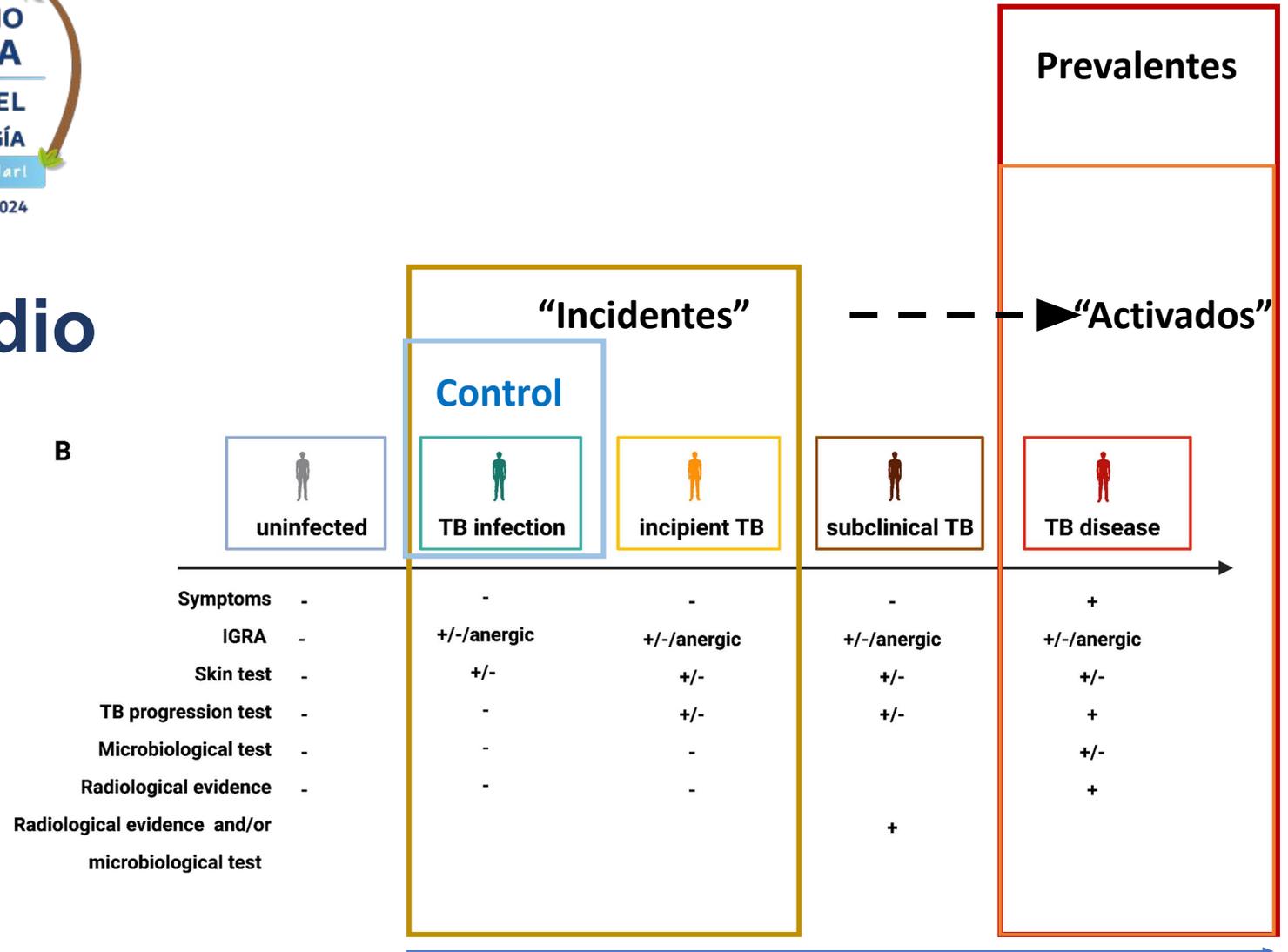
[www.congresocolabiocli.com](http://www.congresocolabiocli.com)



# Población de estudio

Suráfrica  
 264 participantes  
 INF- $\gamma$  positivo  
 Control (n =192)  
 Incidentes (n=28)  
 Activados (n=14)  
 Prevalentes (n=30)

B



15 meses



# Estrategia experimental

## Preparación de las muestras de Suero para extraer exosomas

- Preparación de alícuotas/Almacenamiento  $-80^{\circ}\text{C}$
- Extracción de exosomas

## Digestión de proteínas: método en gel

- Estudios previos de optimización / tripsina
- Método en gel remueve contaminantes

## Fase de “discovery”

- Métodos de proteómica “data dependent” y “data independent Acquisition”
- Optimización de gradientes de cromatografía líquida

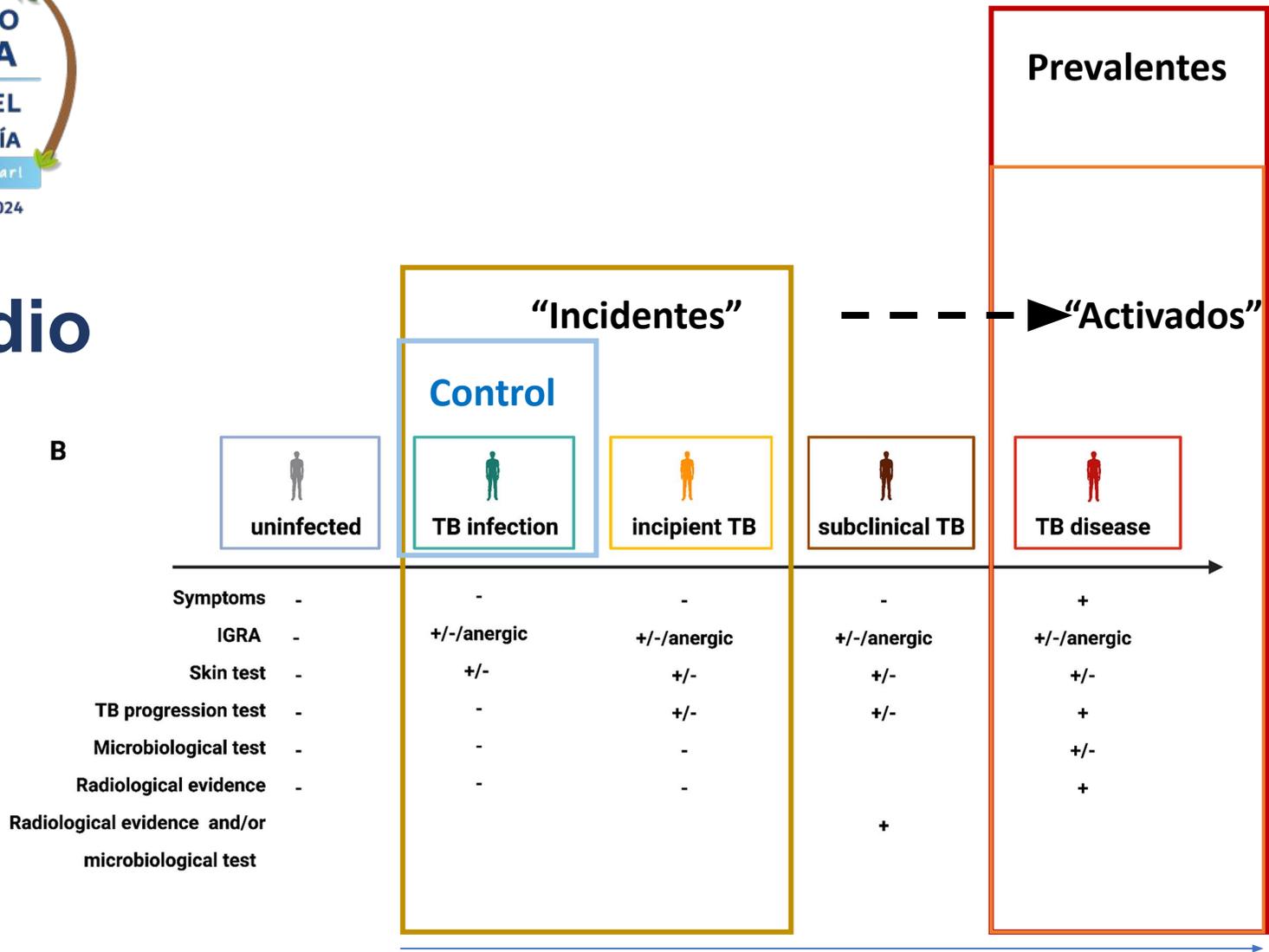
## Fase de validación

- Evaluación de péptidos identificados en estudios previos y validados con resultados de fase de “Discovery”.
- “Targeted Proteomics”: Parallel reaction monitoring o PRM



# Población de estudio

Suráfrica  
 264 participantes  
 INF- $\gamma$  positivo  
 Control (n =192)  
 Incidentes (n=28)  
 Activados (n=14)  
 Prevalentes (n=30)



15 meses

# Fase de “discovery” I - DDA



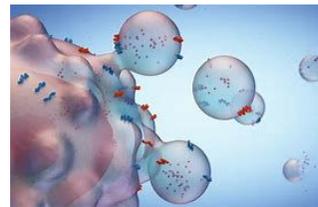
Cohorte

• Incidentes

Exosomas aislados de suero



- ExoQuickTC/
- Normalizado por Contenido de proteínas

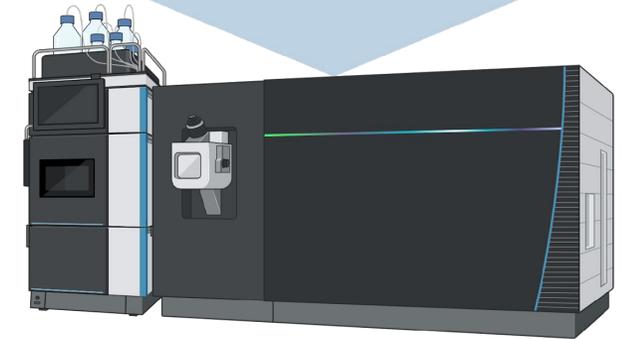
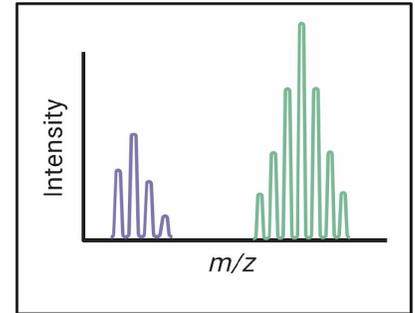


1 Optimización del gradiente de cromatografía líquida



2 Lista de exclusión de los péptidos más abundantes

Mass [m/z]	Formula [M]	Species	CS [z]	Polarity	Start [min]	End [min]	NCE	Comment
789.42122			2	Positive			25	LSSEAPALFQDLK (heavy)
498.50181			2	Positive			25	LTKLEELF (heavy)
745.32427			2	Positive			25	SFANGPQEVYYSK (heavy)
801.41150			2	Positive			25	GLPVSSVSGSEGAR (heavy)
773.89558			2	Positive			25	ELGGSVDYLDGK (heavy)
422.73636			2	Positive			25	IGDYAGIK (heavy)
486.28875			2	Positive			25	HVLTSGEK (heavy)



# Fase de "discovery" II -DIA

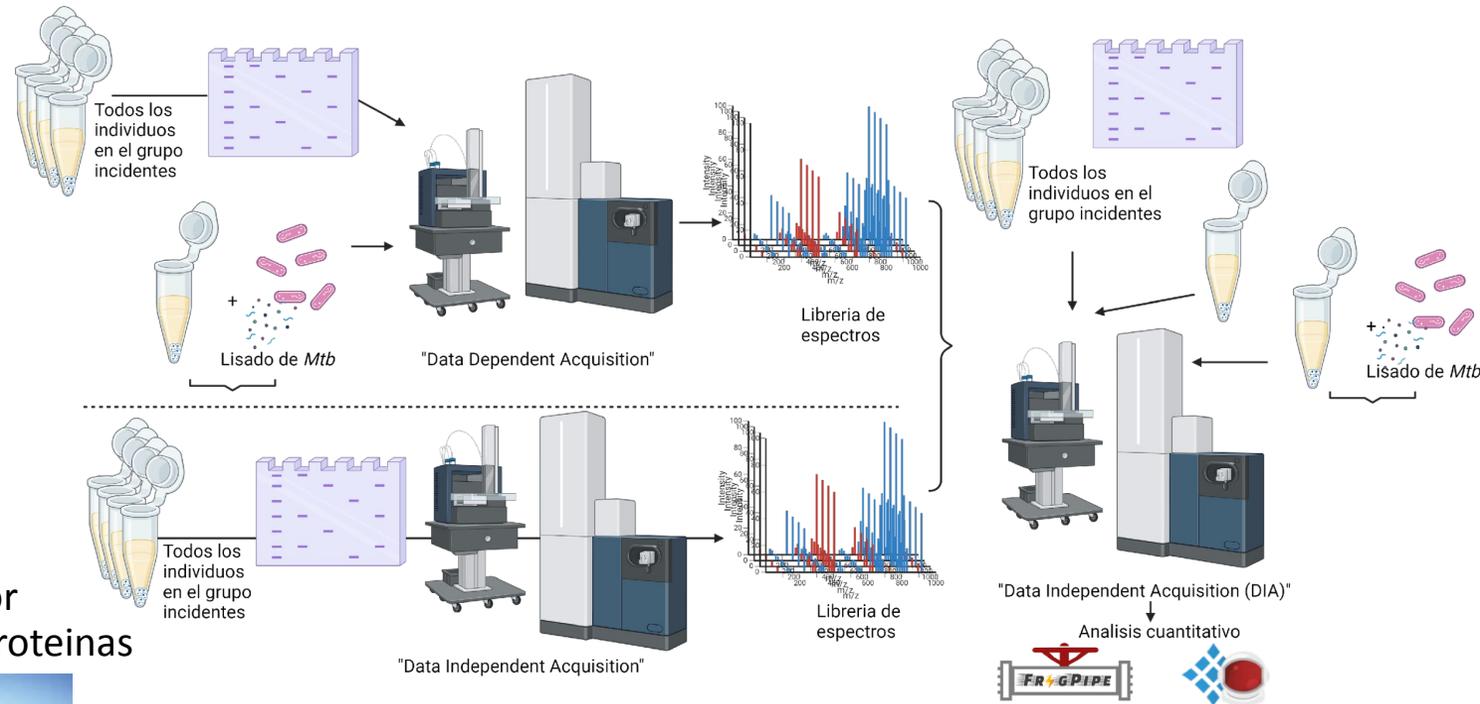
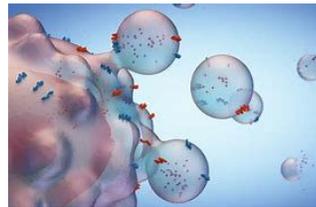


Cohorte

• Incidentes

Exosomas aislados de suero

- ExoQuickTC/
- Normalizado por Contenido de proteínas





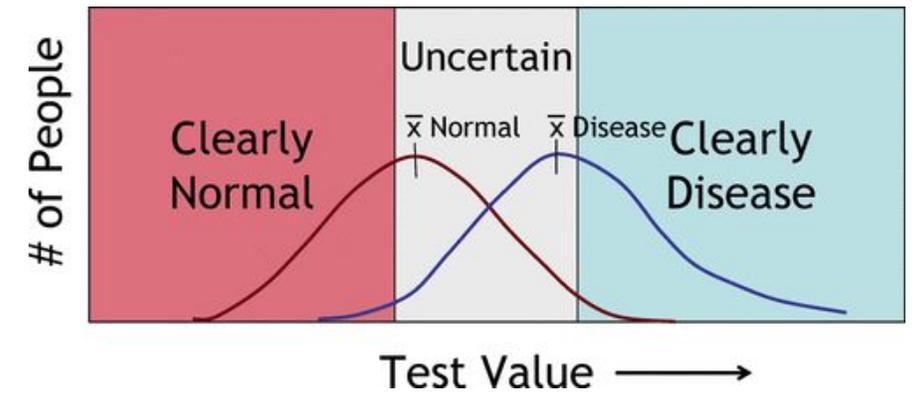
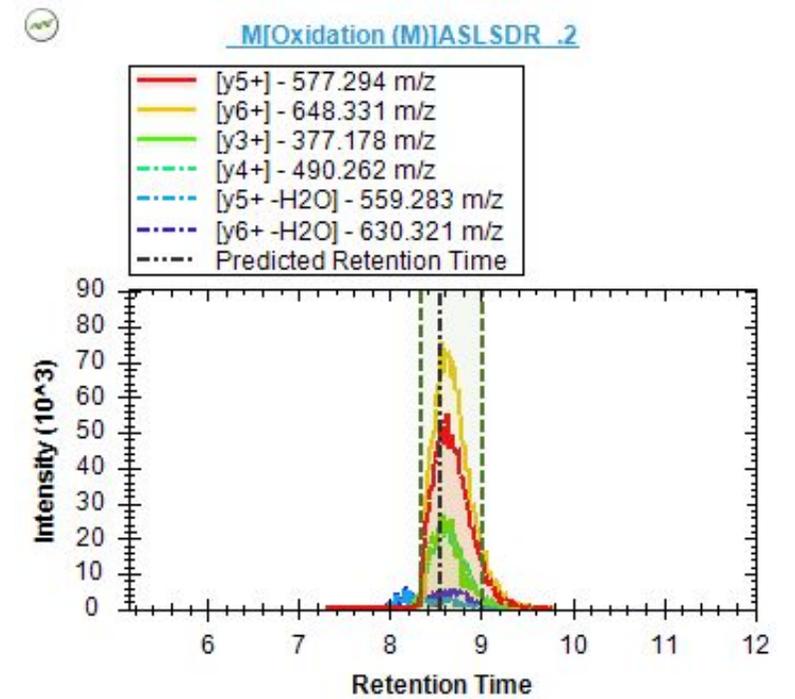
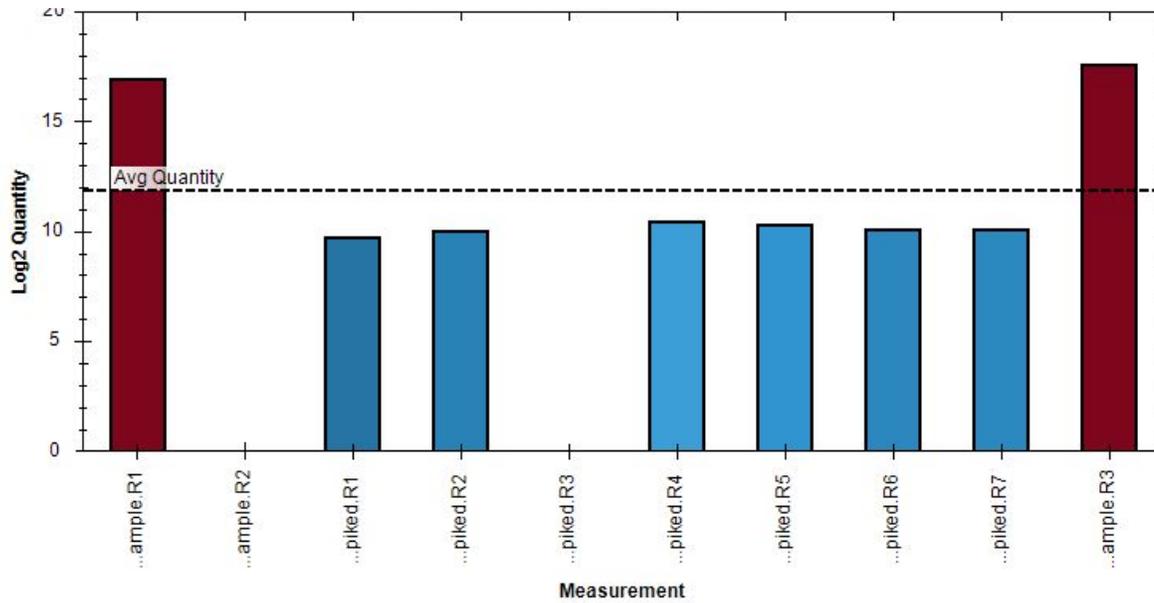
# Resultados



# Optimización de métodos de espectrometría de masas para “Biomarker Discovery”

Numero	Método	Proteínas Totales	Proteínas Mtb	Proporción de Mtb ID (%)
1	DDA-Rutina (comparador)	522	4	0.8
2	Modificando el gradiente de elución para favorecer iones hidrofóbicos	309	12	<b>3.7</b>
3	DDA rutina con lista de exclusión	318	26	<b>7.6</b>
4	Fraccionamiento en gel y método DIA	446	48	10.8
			42 proteínas en al menos 2 fracciones	
5	Método DIA en muestras “spiked” o enriquecidas con lisado de células de Mtb (Librería con 225 humanas y 3.028 proteínas de Mtb)	258*	101	39.3
		206**	14 con $\geq 2$ péptidos	9.0





Tomado de: Joshua LaBaer; J. Proteome Res. 2005, 4, 1053-1059

## Que falta?

- Emplear el mejor método de espectrometría de masas para el análisis individual de las muestras de la cohorte, incluyendo incidentes, prevalentes, activados y controles --> Fortalecer los hallazgos de la fase Discovery.
- Optimizar la lista de candidatos de proteínas/péptidos para incluir en un análisis cuantitativo.



## Que falta?

- Ampliar el número de péptidos y muestras a analizar en un estudio ciego con mas de 1,000 pacientes: En proceso.
- Incluir péptidos de humanos (de mayor abundancia) para validar el método y evaluar su utilidad en un análisis múltiple.



# Conclusiones

- La búsqueda de biomarcadores proteicos basados en la detección de péptidos derivados de exosomas ofrecen oportunidad diagnóstica en moléculas de muy baja abundancia.
- Los péptidos derivados de la bacteria representan un reto metodológico en el análisis de proteómica dirigida, dada la ausencia de péptidos endógenos.
- Se deben evaluar las condiciones epidemiológicas de la población de estudio, especialmente para la selección de controles o voluntarios sanos (prueba de IFN $\gamma$ ).
- Nuevas metodologías con alta sensibilidad y resolución permiten el análisis de múltiples metabolitos para hacer análisis que integren múltiples biomarcadores.





**Karen Dobos, Ph.D.**  
 Lab Principal Investigator [PI]  
 Professor  
 Scientific Director, CSU Regional Biocontainment Laboratory  
 Co-Director, Mycobacteria Research Laboratories



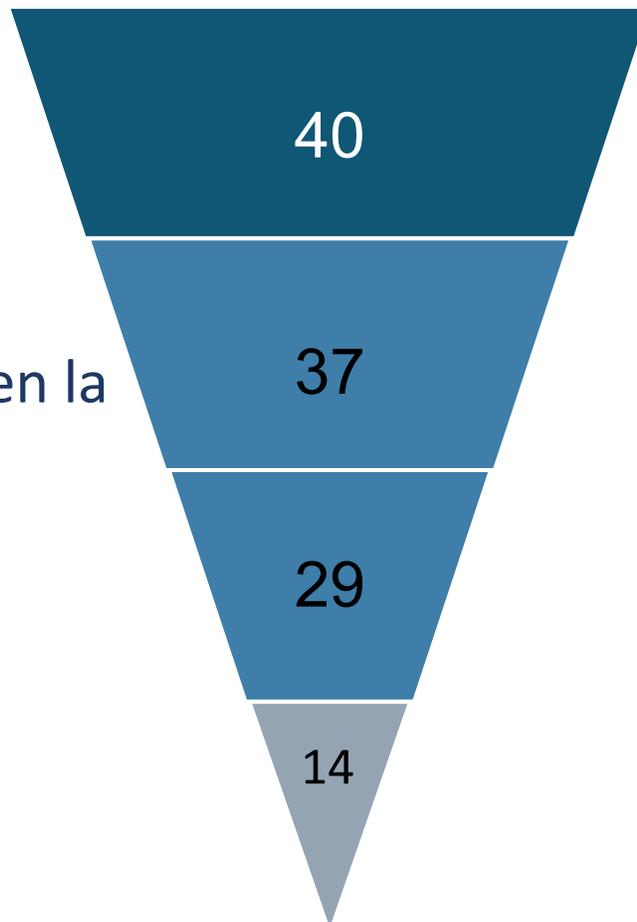
**“En medio de la oscuridad de la tuberculosis, seamos la luz que guíe a nuestras comunidades hacia un futuro más saludable y brillante .” - Dr. Paul Farmer**

Preguntas?



# Análisis “Targeted” o proteómica dirigida para validación

1. Seleccionar péptidos proteotípicos.
2. Calidad del cromatograma
  1. 3 o más transiciones (iones en la Segunda fragmentación)
3. Cuantificables
  1. Límite de detección
  2. Límite de cuantificación
  3. Rango dinámico (lineal)



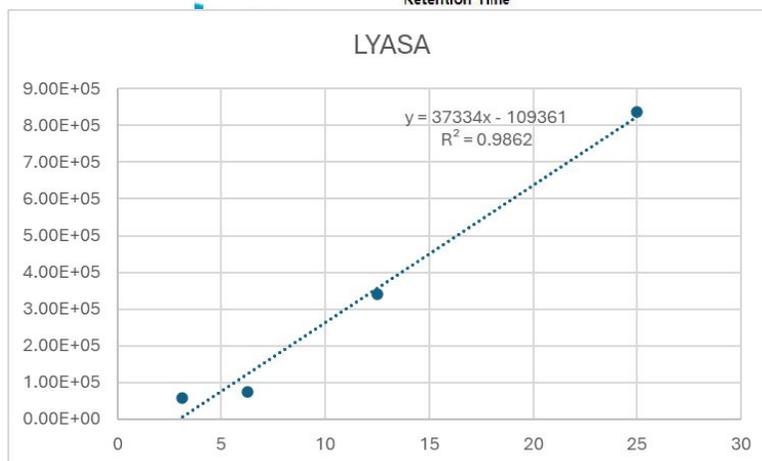
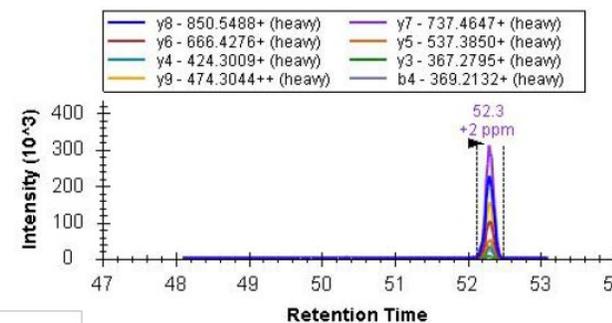
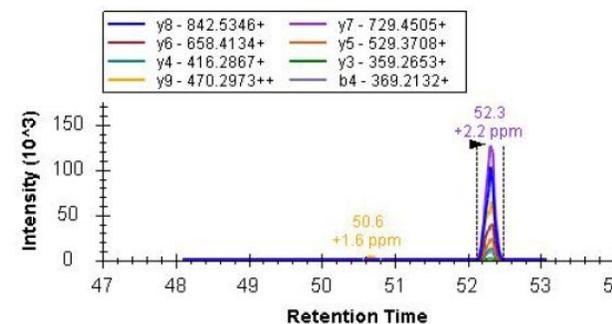
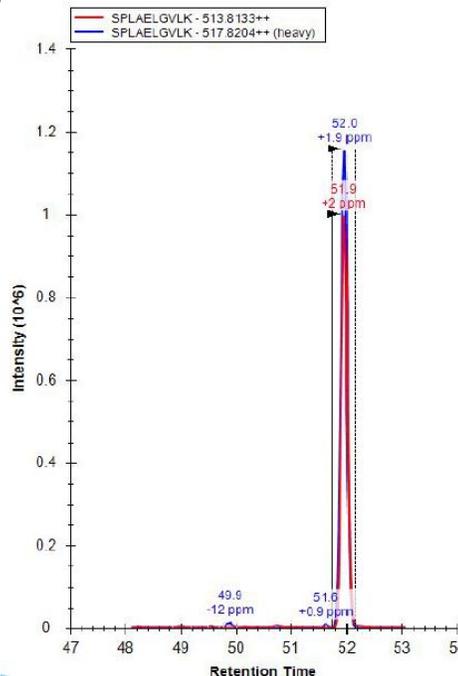
Rv0009 ppiA	Rv1860 Apa Mpt32
Rv0066c icd2	Rv1886c Ag85b
Rv0125 pepA	Rv1908c KatG
Rv0129c Ag85c	Rv1926c Mpt63
Rv0350 DnaK	Rv1932 Cfp20 Tpx
Rv0363c Fba	Rv1980c Mpt64
Rv1270c lprA	Rv2031c HspX
Rv1469 CtpD	Rv2220 GlnA1
Rv1827 GarA Cfp17	Rv2244 AcpM
Rv2780 Ald	Rv2376c Cfp2
Rv2878c Mpt53	Rv3804c Ag85a
Rv3248c SahH	Rv3841 BfrB
Rv3418c GroES	Rv3874 CFP10
Rv3441c MrsA	
Rv3803c Mpt51 fbpD	
Rv3804c Ag85a	

Mehaffy C, et al. 2020. J. Clin. Microbiol. 58, e00393-20.  
doi: 10.1128/JCM.00393-20



# Análisis “Targeted” para validación

1. Seleccionar péptidos proteotípicos.
2. Sintetizar péptidos marcado.
3. Calidad del cromatograma
  1. 3 o más transiciones (iones en la Segunda fragmentación)
4. Cuantificables
  1. Límite de detección
  2. Límite de cuantificación
  3. Rango dinámico (lineal)



# Resultados preliminares

Set de 3 muestras aleatorias de cada condición, se cuantificaron 13 péptidos de Mtb.

Péptidos #3 y 4 pertenecen a la misma proteína.

